

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292063** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.10.14

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

(22) Дата подачи заявки
2021.01.06

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR8 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/957,758; 62/985,152; 63/198,803**

(32) **2020.01.06; 2020.03.04; 2020.11.13**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/012329**

(87) **WO 2021/142002 2021.07.15**

(71) Заявитель:
ВАКСИНЕКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Холланд Памела М., Лейк Эндрю,
Дбюлэк Остин, Смит Эрнест,
Скривенс Мария, Харви Кэрри, Кирк
Рене, Балх Лесли, Дас Соня Г., Уэллс
Кристофер Конверс (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В. (RU)**

(57) Данное изобретение направлено на антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают CCR8 человека, на кодирующие их полинуклеотиды и векторы и на содержащие их фармацевтические композиции. В некоторых аспектах данное изобретение направлено на способы лечения заболевания или патологического состояния, включающие в себя введение указанного антитела против CCR8 субъекту, нуждающемуся в этом.

A1

202292063

202292063

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR8 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 62/957758, поданной 6 января 2020 года; предварительной заявки на патент США № 62/985152, поданной 4 марта 2020 года; и предварительной заявки на патент США № 63/198803, поданной 13 ноября 2020 года, содержимое которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей (с названием «4416_010PC03_Seqlisting_ST25»; размер: 91925 байт; дата создания: 4 января 2021 года), поданного вместе с данной заявкой, включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В данном изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие части, которые специфически связываются с CCR8 человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Иммуноterapia является быстро развивающимся и чрезвычайно многообещающим подходом к лечению различных форм онкологических заболеваний, который в последнее время обеспечил множество успехов. Тем не менее, у некоторых пациентов ответ на современные иммунотерапевтические средства отсутствует или ограничен, а у других наблюдается рецидив после первоначальной реакции.

[0005] Иммунная система человека включает в себя системы контролей и противовесов, которые служат для того, чтобы предотвратить вред организму от сверхактивной иммунной системы. Регуляторные Т-клетки («Трег») играют жизненно важную роль в поддержании функциональности иммунной системы путем супрессии иммунного ответа. Тем не менее, способность Трег, особенно инфильтрирующих опухоль Трег, ослаблять иммунный ответ может блокировать естественный иммунный ответ на опухоль.

[0006] Отчасти из-за важной роли иммунокомпетентных клеток было очень трудно разработать способы лечения, которые специфически нацелены на Трег, и, в частности, на инфильтрирующие опухоль Трег. Таким образом, сохраняется потребность в способах лечения, которые способны специфически воздействовать на Трег и ингибировать их активность в микроокружении опухоли.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В определенных аспектах данное изобретение направлено на антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с одной или большим числом аминокислот в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело способно: (a) усиливать иммунный ответ на опухоль; (b) снижать или истощать уровень инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («Трег»), или уничтожать их; (c) индуцировать интернализацию CCR8 в инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клетках («Трег»); (d) активировать NK-клетки; (e) индуцировать опосредованное NK-клетками уничтожение инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («Трег»); (f) связываться с CCR8 яванской макаки («ЯМ»); (g) связываться с CCR8 человека с показателем K_D , равным 10

nM или меньше, измеренным с помощью анализа BIACORE™; или (h) любая комбинация вышеперечисленного.

[0008] В некоторых аспектах данного изобретения указанный N-концевой внеклеточный домен CCR8 человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело связывается с по меньшей мере двумя, с по меньшей мере тремя, с по меньшей мере четырьмя, с по меньшей мере пятью, с по меньшей мере шестью, с по меньшей мере семью, с по меньшей мере восемью, с по меньшей мере девятью или с по меньшей мере десятью аминокислотами, указанными в последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело связывается с по меньшей мере двумя, с по меньшей мере тремя, с по меньшей мере четырьмя, с по меньшей мере пятью, с по меньшей мере шестью, с по меньшей мере семью, с по меньшей мере восемью, с по меньшей мере девятью или с по меньшей мере десятью последовательно расположенными аминокислотами, указанными в последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело связывается с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 180 - 200.

[0009] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело дополнительно связывает CCR8 яванской макаки.

[0010] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело связывает CCR8 человека с показателем K_D , равным 10 нМ или меньше, как измерено с помощью анализа BIACORE™. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело связывает CCR8 человека с показателем K_D , равным 1 нМ или меньше, как измерено с помощью анализа BIACORE™.

[0011] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ, англ. «ADCC») у субъекта после введения указанного антитела против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным 1 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным 0,1 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части.

[0012] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело способно индуцировать активацию NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело способно индуцировать повышение уровня 4-1BB, ICAM-1 или как 4-1BB, так и ICAM-1, на поверхности NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело способно индуцировать снижение уровня CD16 на поверхности NK-клеток у указанного субъекта.

[0013] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело способно индуцировать опосредованное NK-клетками уничтожение инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток у указанного субъекта. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело индуцирует истощение уровня инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток у субъекта после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток до указанного введения. В некоторых аспектах данного изобретения уровень инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток истощается по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45% или по меньшей мере на около 50% по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток до указанного введения. В некоторых аспектах данного

изобретения указанное антитело индуцирует интернализацию CCR8 инфильтрирующими опухоль T_{рег}-клетками.

[0014] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело содержит вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую область, определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH; при этом указанная CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157 и 167.

[0015] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156 и 166.

[0016] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155 и 165.

[0017] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 и 170.

[0018] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159 и 169.

[0019] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158 и 168.

[0020] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело не связывает CCR8 яванской макаки.

[0021] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело содержит вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую область, определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH; при этом указанная CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 47, 107, 117, 137 и 147.

[0022] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 46, 106, 116, 136 и 146.

[0023] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 45, 105, 115, 135 и 145.

[0024] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 50, 110, 120, 140 и 150.

[0025] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 49, 109, 119, 139 и 149.

[0026] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 48, 108, 118, 138 и 148.

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 131, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 132; или (e) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 141, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 142.

[0030] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело связывает CCR8 человека и CCR8 яванской макаки.

[0031] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело содержит вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую область, определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH; при этом указанная CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 67, 77, 87, 97, 127, 157 и 167.

[0032] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 56, 66, 76, 86, 96, 126, 156 и 166.

[0033] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 55, 65, 75, 85, 95, 125, 155 и 165.

[0034] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 130, 160 и 170.

[0035] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 59, 69, 79, 89, 99, 129, 159 и 169.

[0036] В некоторых аспектах данного изобретения указанная CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 58, 68, 78, 88, 98, 128, 158 и 168.

[0037] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело содержит: (a) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10; (b) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20; (c) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28, CDR2 VL, содержащую аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 161, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 162.

[0040] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело человека, гуманизованное антитело или химерное антитело. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) антитела.

[0041] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть являются афукозилированными.

[0042] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело, привлекающий T-клетки биспецифический активатор (BiTE), мультиспецифическое антитело, бипаратопное антитело, иммуноконъюгат, конъюгат антитело – лекарственный препарат или любую их комбинацию.

[0043] В определенных аспектах данное изобретение направлено на биспецифическое антитело, содержащее представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть.

[0044] В определенных аспектах данное изобретение направлено на BiTe, содержащий представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть.

[0045] В определенных аспектах данное изобретение направлено на мультиспецифическое антитело, содержащее представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть.

[0046] В определенных аспектах данное изобретение направлено на бипаратопное антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающую часть, представленные в данном документе.

[0047] В некоторых аспектах данного изобретения указанные биспецифическое антитело, BiTe, мультиспецифическое антитело или бипаратопное антитело содержат первый домен VH, содержащий первую CDR1 VH, первую CDR2 VH и первую CDR3 VH; первый домен VL, содержащий первую CDR1 VL, первую CDR2 VL и первую CDR3 VL; второй домен VH, содержащий вторую CDR1 VH, вторую CDR2 VH и вторую CDR3 VH; и второй домен VL, содержащий вторую CDR1 VL, вторую CDR2 VL и вторую CDR3 VL; при этом (a) указанная первая CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 45, 105, 115, 135 и 145; (b) указанная первая CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 46, 106, 116, 136 и 146; и (c) указанная первая CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 47, 107, 117, 137 и 147.

[0048] В некоторых аспектах данного изобретения (a) указанная первая CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 48, 108, 118, 138 и 148; (b) указанная первая CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 49, 109, 119, 139 и 149; и (c) указанная первая CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 50, 110, 120, 140 и 150. В некоторых аспектах данного изобретения (a) указанная вторая CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в 5, 15, 25, 35, 55, 65, 75, 85, 95, 125, 155 и 165; (b) указанная вторая CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 56, 66, 76, 86, 96, 126, 156 и 166; и (c) указанная вторая CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 67, 77, 87, 97, 127, 157 и 167.

В некоторых аспектах данного изобретения (а) указанная вторая CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 58, 68, 78, 88, 98, 128, 158 и 168; (b) указанная вторая CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 59, 69, 79, 89, 99, 129, 159 и 169; и (c) указанная вторая CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 130, 160 и 170.

[0049] В определенных аспектах данное изобретение направлено на иммуноконъюгат, содержащий представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых аспектах данного изобретения указанный иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело – лекарственный препарат.

[0050] В определенных аспектах данное изобретение направлено на химерный антигенный рецептор (ХАР), содержащий представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть.

[0051] В определенных аспектах данное изобретение направлено на Т-клеточный рецептор (ТКР), содержащий представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть.

[0052] В определенных аспектах данное изобретение направлено на молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленный в данном документе BiTE, представленное в данном документе мультиспецифическое антитело, представленное в данном документе бипаратопное антитело, представленный в данном документе иммуноконъюгат, представленный в данном документе ХАР или представленный в данном документе ТКР.

[0053] В определенных аспектах данное изобретение направлено на вектор или набор векторов, содержащих представленные в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот.

[0054] В определенных аспектах данное изобретение направлено на клетку, содержащую представленный в данном документе ХАР, представленный в данном документе ТКР, представленные в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, или представленные в данном документе вектор или набор векторов. В некоторых аспектах данного изобретения указанная клетка представляет собой клетку-хозяина. В некоторых аспектах данного изобретения указанная клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку. В некоторых аспектах данного изобретения указанная клетка представляет собой Т-клетку.

[0055] В определенных аспектах данное изобретение направлено на фармацевтическую композицию, содержащую представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленный в данном документе BiTE, представленное в данном документе мультиспецифическое антитело, представленное в данном документе бипаратопное антитело, представленный в данном документе иммуноконъюгат, представленный в данном документе ХАР, представленный в данном документе ТКР, представленные в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, представленные в данном документе вектор или набор векторов, или представленную в данном документе клетку, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0056] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способ лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту представленного в данном документе антитела или его антигенсвязывающей части, представленного в данном документе

биспецифического антитела, представленного в данном документе биспецифического антитела, представленного в данном документе BiTE, представленного в данном документе мультиспецифического антитела, представленного в данном документе бипаратопного антитела, представленного в данном документе иммуноконъюгата, представленного в данном документе ХАР, представленного в данном документе ТКР, представленных в данном документе молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновых кислот, представленных в данном документе вектора или набора векторов, представленной в данном документе клетки или представленной в данном документе фармацевтической композиции.

[0057] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способ снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («T_{reg}-клеток»), или их уничтожения, включающий в себя приведение Treg-клеток в контакт с представленным в данном документе антителом или его антигенсвязывающей частью, представленным в данном документе биспецифическим антителом, представленным в данном документе биспецифическим антителом, представленным в данном документе BiTE, представленным в данном документе мультиспецифическим антителом, представленным в данном документе бипаратопным антителом, представленным в данном документе иммуноконъюгатом, представленным в данном документе ХАР, представленным в данном документе ТКР, представленными в данном документе молекулой или набором молекул нуклеиновых кислот, представленными в данном документе вектором или набором векторов, представленной в данном документе клеткой или представленной в данном документе фармацевтической композицией.

[0058] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способ активации NK-клеток или индукции опосредованного NK-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («T_{reg}-клеток»), включающий в себя приведение T_{reg}-клеток в контакт с представленным в данном документе антителом или его антигенсвязывающей частью, представленным в данном документе биспецифическим антителом, представленным в данном документе биспецифическим антителом, представленным в данном документе BiTE, представленным в данном документе мультиспецифическим антителом, представленным в данном документе бипаратопным антителом, представленным в данном документе иммуноконъюгатом, представленным в данном документе ХАР, представленным в данном документе ТКР, представленными в данном документе молекулой или набором молекул нуклеиновых кислот, представленными в данном документе вектором или набором векторов, представленной в данном документе клеткой или представленной в данном документе фармацевтической композицией.

[0059] В некоторых аспектах данного изобретения указанное приведение в контакт осуществляется *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых аспектах данного изобретения указанное приведение в контакт осуществляется *in vivo*.

[0060] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют активацию NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть повышают уровень 4-1BB, ICAM-1 или как 4-1BB, так и ICAM-1, на поверхности NK-клеток.

[0061] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют снижение уровня CD16 на поверхности NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют опосредованное NK-клетками уничтожение инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть истощают уровень инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток в отсутствие указанного антитела или его

антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антители или его антигенсвязывающая часть истощают уровень инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45% или по меньшей мере на около 50% по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток в отсутствие указанного антителя или его антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антители или его антигенсвязывающая часть индуцируют интернализацию CCR8 инфильтрирующими опухоль T_{reg}-клетками.

[0062] В некоторых аспектах данного изобретения опухоль выбрана из группы, состоящей из следующего: саркома Капоши, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, мантийноклеточная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, лимфома Беркитта и В-клеточная лимфома маргинальной зоны, истинная полицитемия, лимфома, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, солидные опухоли, саркомы и карциномы, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосаркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, саркома толстой кишки, колоректальная карцинома, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, немелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитома, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менангиома, меланома, нейробластома, ретинобластома, карцинома носоглотки, карцинома пищевода, базальноклеточная карцинома, рак желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарцинома, колоректальный рак, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаза, рак органов головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого (мелкоклеточный, крупноклеточный), меланома, нейробластома; рак полости рта (например, рак губы, языка, рта и глотки), рак яичника, рак поджелудочной железы, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак прямой кишки; рак дыхательной системы, саркома, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы, или любая комбинация вышеперечисленного. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является рефрактерной или рецидивирующей. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является запущенной, местно-распространенной или метастатической.

[0063] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя введение дополнительного противоопухолевого агента. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент выбран из малой молекулы, полипептида,

лучевой терапии, хирургического вмешательства и их комбинации. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя химиотерапию. В некоторых аспектах данного изобретения химиотерапия включает в себя химиотерапию на основе препарата платины. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя антагонист PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор TIM-3, ингибитор LAG-3, ингибитор TIGIT, ингибитор CD112R, ингибитор TAM, агонист STING, агонист 4-1BB, ингибитор CCL22, агент, индуцирующий активацию NK-клеток, или их комбинацию. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя антагонист PD-1. В некоторых аспектах данного изобретения указанный антагонист PD-1 выбран из группы, состоящей из PDR001, ниволумаба, пембролизумаба, пидилизумаба, MEDI0680, REGN2810, TSR-042, PF-06801591 и AMP-224. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор PD-L1. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ингибитор PD-L1 выбран из группы, состоящей из FAZ053, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и BMS-936559. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя противоопухолевый агент, выбранный из группы, состоящей из сунитиниба (SUTENT[®]), кабозантиниба (CABOMETYX[®]), акситиниба (INLYTA[®]), ленватиниба (LENVIMA[®]), эверолимуса (AFINITOR[®]), бевацизумаба (AVASTIN[®]), эпакадостата, NKTR-214 (агониста смещенной активности к CD-122), тивозаниба (FOTIVDA[®]), абексिनостата, ипилимумаба (YERVOY[®]), тремелимумаба, пазопаниба (VOTRIENT[®]), сорафениба (NEXAVAR[®]), темсиролимуса (TORISEL[®]), рамуцирумаба (CYRAMZA[®]), нирапариба, саволитиниба, вороланиба (X-82), регорафениба (STIVARGO[®]), донафениба (мультикиназного ингибитора), камрелизумаба (SHR-1210), пексастимогена девацирепвека (JX-594), рамуцирумаба (CYRAMZA[®]), апатиниба (YN968D1), инкапсулированного доксорубина (THERMODOX[®]), тивантиниба (ARQ197), ADI-PEG 20, биниметиниба, апатиниба мезилата, нинтеданиба, лирилумаба, ниволумаба (OPDIVO[®]), пембролизумаба (KEYTRUDA[®]), атезолизумаба (TECENTRIQ[®]), авелумаба (BAVENCIO[®]), дурвалумаба (IMFIMZI[®]), цемиплимаба-rwlc (LIBTAYO[®]), тислелизумаба, спартализумаба и любой их комбинации. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор TIM-3. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ингибитор TIM-3 представляет собой MGB453 или TSR-022. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор LAG-3. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ингибитор LAG-3 выбран из группы, состоящей из LAG525, BMS-986016 и TSR-033. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор TIGIT. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор CD112R. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор TAM (Axl, Mer, Tyro). В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя агонист 4-1BB. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор тирозинкиназы (ИТК, англ. «TKI»). В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя агент, который индуцирует активацию NK-клеток и, следовательно, усиливает активность АЗКЦ. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор CCL2. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя агент, который индуцирует активацию NK-клеток.

[0064] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антители или его антигенсвязывающая часть вводятся до введения указанного дополнительного противоопухолевого агента. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антители или его антигенсвязывающая часть вводятся после введения указанного дополнительного противоопухолевого агента. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антители или его антигенсвязывающая часть и указанный дополнительный противоопухолевый агент вводятся совместно.

[0065] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способ получения антители или его антигенсвязывающей части, включающий в себя культивирование клеток, представленных в данном документе, в подходящих условиях. В некоторых аспектах данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя выделение указанного антители или его антигенсвязывающей части.

[0066] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антители или его антигенсвязывающая часть являются афукозилированными.

[0067] В определенных аспектах данное изобретение направлено на применение представленного в данном документе антители или его антигенсвязывающей части, представленного в данном документе биспецифического антители, представленного в данном документе биспецифического антители, представленного в данном документе ViTE, представленного в данном документе мультиспецифического антители, представленного в данном документе бипаратопного антители, представленного в данном документе иммуноконъюгата, представленного в данном документе XAP, представленного в данном документе ТКР, представленных в данном документе молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновых кислот, представленных в данном документе вектора или набора векторов, представленной в данном документе клетки или представленной в данном документе фармацевтической композиции для производства медицинского препарата для лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

[0068] В определенных аспектах данное изобретение направлено на применение представленного в данном документе антители или его антигенсвязывающей части, представленного в данном документе биспецифического антители, представленного в данном документе биспецифического антители, представленного в данном документе ViTE, представленного в данном документе мультиспецифического антители, представленного в данном документе бипаратопного антители, представленного в данном документе иммуноконъюгата, представленного в данном документе XAP, представленного в данном документе ТКР, представленных в данном документе молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновых кислот, представленных в данном документе вектора или набора векторов, представленной в данном документе клетки или представленной в данном документе фармацевтической композиции для производства медицинского препарата для снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток, или их уничтожения, у субъекта, нуждающегося в этом.

[0069] В определенных аспектах данное изобретение направлено на применение представленного в данном документе антители или его антигенсвязывающей части, представленного в данном документе биспецифического антители, представленного в данном документе биспецифического антители, представленного в данном документе ViTE, представленного в данном документе мультиспецифического антители, представленного в данном документе бипаратопного антители, представленного в данном документе иммуноконъюгата, представленного в данном документе XAP, представленного в данном документе ТКР, представленных в данном документе молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновых кислот, представленных в данном документе вектора или набора векторов, представленной в данном документе клетки или представленной в данном документе фармацевтической композиции для

производства медицинского препарата для активации NK-клеток или индукции опосредованного NK-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток у субъекта, нуждающегося в этом.

[0070] В определенных аспектах данное изобретение направлено на представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленный в данном документе ViTE, представленное в данном документе мультиспецифическое антитело, представленное в данном документе бипаратопное антитело, представленный в данном документе иммуноконъюгат, представленный в данном документе XAP, представленный в данном документе ТКР, представленные в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, представленные в данном документе вектор или набор векторов, представленную в данном документе клетку или представленную в данном документе фармацевтическую композицию для применения в способе лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

[0071] В определенных аспектах данное изобретение направлено на представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленный в данном документе ViTE, представленное в данном документе мультиспецифическое антитело, представленное в данном документе бипаратопное антитело, представленный в данном документе иммуноконъюгат, представленный в данном документе XAP, представленный в данном документе ТКР, представленные в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, представленные в данном документе вектор или набор векторов, представленную в данном документе клетку или представленную в данном документе фармацевтическую композицию для применения в способе снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток, или их уничтожения, у субъекта, нуждающегося в этом.

[0072] В определенных аспектах данное изобретение направлено на представленное в данном документе антитело или его антигенсвязывающую часть, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленный в данном документе ViTE, представленное в данном документе мультиспецифическое антитело, представленное в данном документе бипаратопное антитело, представленный в данном документе иммуноконъюгат, представленный в данном документе XAP, представленный в данном документе ТКР, представленные в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, представленные в данном документе вектор или набор векторов, представленную в данном документе клетку или представленную в данном документе фармацевтическую композицию для применения в способе активации NK-клеток или индукции опосредованного NK-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток у субъекта, нуждающегося в этом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0073] Фиг. 1A - 1L представляют собой графическое отображение связывания с CCR8 человека (HuCCR8-ECD-Fc) или с CCR8 яванской макаки (CyCCR8-ECD-Fc), измеренное на основании поглощения флуоресценции (фиг. 1A, 1C, 1E, 1G, 1I и 1K), и относительное связывание вторичного антитела с клетками 293T, экспрессирующими CCR8 человека, CCR8 яванской макаки, CCR2 человека, CCR8 мыши, и клетками 293T отрицательного контроля (как указано; фиг. 1B, 1D, 1F, 1H, 1J и 1L), и иллюстрируют связывание

антитела-1 против CCR8 (фиг. 1A - 1B), антитела-1-1 против CCR8 (фиг. 1C - 1D), антитела-1-2 против CCR8 (фиг. 1E - 1F), антитела-1-3 против CCR8 (фиг. 1G - 1H), антитела-1-4 против CCR8 (фиг. 1I - 1J) и антитела-1-5 против CCR8 (фиг. 1K - 1L).

[0074] Фиг. 2A - 2R представляют собой графическое отображение связывания с CCR8 человека (HuCCR8-ECD-Fc) или с CCR8 яванской макаки (CyCCR8-ECD-Fc), измеренное на основании поглощения флуоресценции (фиг. 2A, 2C, 2E, 2G, 2I, 2K, 2M, 2O, 2Q, 2S и 2U), и относительное связывание вторичного антитела с клетками 293Т, экспрессирующими CCR8 человека, CCR8 яванской макаки, CCR2 человека, CCR8 мышцы, и клетками 293Т отрицательного контроля (как указано; фиг. 2B, 2D, 2F, 2H, 2J, 2L, 2N, 2P, 2R, 2T и 2V), и иллюстрируют связывание антитела-2 против CCR8 (фиг. 2A - 2B), антитела-2-1 против CCR8 (фиг. 2C - 2D), антитела-2-2 против CCR8 (фиг. 2E - 2F), антитела-2-3 против CCR8 (фиг. 2G - 2H), антитела-2-4 против CCR8 (фиг. 2I - 2J), антитела-2-5 против CCR8 (фиг. 2K - 2L), антитела-2-6 против CCR8 (фиг. 2M - 2N), антитела-2-7 против CCR8 (фиг. 2O - 2P), антитела-2-8 против CCR8 (фиг. 2Q - 2R), антитела-2-9 против CCR8 (фиг. 2S - 2T) и антитела-2-10 против CCR8 (фиг. 2U - 2V).

[0075] Фиг. 3A - 3B представляют собой столбчатые диаграммы, иллюстрирующие аффинность на поверхности клетки (K_D) антитела-1 против CCR8 (фиг. 3A) или антитела-2 против CCR8 (фиг. 3B) в отношении CCR8 человека, CCR8 яванской макаки и в отношении различных отрицательных контролей (подобного предшественнику амилоида белка 2 (APLP2), альфа-1-антихимотрипсина (SERPINA3), представителя 9 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A9) и фосфолипидфосфатазы 3 (PLPP3)).

[0076] Фиг. 4A представляет собой графическое отображение, показывающее связывание антитела-1 против CCR8 и антитела-2 против CCR8 с выделенными инфильтрирующими опухоль лейкоцитами (ИОЛ, англ. «TIL») из образцов опухоли молочной железы и опухоли почки, обозначенных квадратом и треугольником, соответственно. Фиг. 4B представляет собой графическое отображение, показывающее относительное связывание изотипического контроля, антитела-1 против CCR8, антитела-2 против CCR8 и положительного контроля – антитела против CCR8 – с выделенными регуляторными Т-клетками (Трег-клетками) из образцов почечно-клеточной карциномы, как указано.

[0077] Фиг. 5 представляет собой столбчатую диаграмму, иллюстрирующую передачу сигналов АЗКЦ в клетках 293Т с принудительной экспрессией CCR8 человека или яванской макаки (ЯМ) после контакта либо с антителом-1 против CCR8, либо с антителом-2 против CCR8, как указано.

[0078] Фиг. 6A - 6B представляют собой столбчатые диаграммы, иллюстрирующие АЗКЦ, о чем свидетельствует процентное содержание клеток 293Т, экспрессирующих CCR8 человека (фиг. 6A) или CCR8 яванской макаки (фиг. 6B), оставшихся после контакта либо с антителом-1 против CCR8, либо с антителом-2 против CCR8, как указано, в образцах от двух доноров (D1 и D2).

[0079] Фиг. 7A - 7B представляют собой линейные графики, иллюстрирующие процентное содержание мертвых целевых клеток Raji, экспрессирующих CCR8 человека (фиг. 7A) или пустой вектор (ПВ; фиг. 7B), после контакта либо с антителом-1 против CCR8, либо с антителом-2 против CCR8, как указано.

[0080] Фиг. 8A представляет собой линейный график, иллюстрирующий процентное содержание клеток 4-1ВВ⁺/CD16⁻ (NK-клеток) в культуре с клетками Raji, принудительно экспрессирующими CCR8, после приведения указанной культуры в контакт либо с антителом-1 против CCR8, либо с антителом-2 против CCR8, как указано. Фиг. 8B представляет собой столбчатую диаграмму, иллюстрирующую число клеток Raji, экспрессирующих поверхностную целевую молекулу CCR8 (черные столбцы) после воздействия либо антитела-1 против CCR8, либо антитела-2 против CCR8, по сравнению с изотипическим контролем. Фиг. 8C

представляет собой столбчатую диаграмму, иллюстрирующую уровень экспрессии 4-1BB (по сравнению с изотипическими контролями) на NK-клетках $CD3^+ NKp46^+$ в культуре с клетками Raji, принудительно экспрессирующими CCR8 (столбцы слева). Контрольные клетки Raji, не экспрессирующие поверхностную целевую молекулу CCR8, представлены столбцами справа (фиг. 8B - 8C).

[0081] Фиг. 9 представляет собой графическое отображение относительного числа (%) клеток FOXP3⁺ из общего числа ИОЛ $CD3^+/CD4^+$, выделенных из недавно удаленных опухолей человека и инкубированных либо с антителом-1 против CCR8, либо с антителом-2 против CCR8, как указано.

[0082] Фиг. 10 представляет собой столбчатую диаграмму, иллюстрирующую интернализацию CCR8 в клетках 293T с принудительной экспрессией CCR8 человека или пустого вектора.

[0083] Фиг. 11 представляет собой линейный график, иллюстрирующий конкурентное связывание моноклонального антитела, которое связывает CCR8 человека (приобретено у BIOLEGEND®; номер по каталогу: 360603), и либо антитела-1 против CCR8, либо антитела-2 против CCR8, на основании измерения с помощью проточной цитометрии.

[0084] Фиг. 12A - 12B представляют собой линейные графики, показывающие активность АЗКЦ относительно концентрации антител в АЗКЦ-репортерных клетках Jurkat CD16VV (фиг. 12A) или CD16FF (фиг. 12B) после инкубации с возрастающими концентрациями антитела-1 против CCR8 дикого типа, афукозилированного антитела-1 против CCR8, антитела-2 против CCR8 дикого типа, афукозилированного антитела-2 против CCR8 и с изотипическим контролем, как указано.

[0085] Фиг. 13A - 13B представляют собой графическое отображение, иллюстрирующее связывание антитела-1 против CCR8 с опухолевыми Treg. Treg были идентифицированы с помощью проточной цитометрии в ИОЛ, выделенных из опухолей, как $CD3^+/FoxP3^+$. Связывание антитела-1 против CCR8 измеряли на гейтированных клетках опухоли почки и опухоли молочной железы с использованием вторичного антитела, конъюгированного с аллофикоцианином (АФЦ, англ. «APC»). Фиг. 13A представляет собой график рассеяния, показывающий соотношение связывания указанного антитела и положительного контроля на Treg-клетках, приведенных в контакт с антителом-1 против CCR8, с положительным контролем и с только вторичным антителом (отрицательным контролем). На фиг. 13B показаны две гистограммы, изображающие окрашивание с помощью АФЦ-А на гейтированных Treg-клетках из опухолей почки человека с частотой, нормализованной относительно модального значения флуоресценции изотипического IgG1-контроля (серая кривая) или антитела-1 против CCR8 (черная кривая). Фиг. 13C представляет собой график рассеяния, показывающий процентное содержание выделенных ИОЛ-клеток $CD3^+$ из опухолей, инкубированных с аллогенными клетками – естественными киллерами (NK-клетками) и приведенных в контакт с контрольным антителом, антителом-1 против CCR8 или антителом положительного контроля. Для каждого антитела: группа с левой стороны представляет собой процентное содержание клеток $CD3^+$, которые являются клетками FoxP3⁻ (например, не-Treg), а группа с правой стороны представляет собой нормализованное процентное содержание клеток $CD3^+$, которые являются клетками FoxP3⁺ (например, Treg).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0086] В определенных аспектах данное изобретение направлено на антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают CCR8 («антитело против CCR8»). В определенных аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 специфически связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR8 человека. В других аспектах данное изобретение направлено на способы лечения субъекта,

нуждающегося в этом, включающие в себя введение представленных в данном документе антител против ССR8.

I. Определения

[0087] Для того чтобы данное изобретение стало более понятным далее даны определения конкретных терминов. При употреблении в контексте данного документа, если иное прямо не предусмотрено в данном документе, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное ниже. Дополнительные определения приводятся в других частях данного документа.

[0088] Термин, обозначающий объект в единственном числе, относится к одному или большему числу указанных объектов; например, термин «нуклеотидная последовательность» следует понимать как обозначающий одну или большее число нуклеотидных последовательностей. Таким образом, термины в единственном числе, «один (одна, одно) или большее число» и «по меньшей мере один (одна, одно)» в данном документе могут употребляться взаимозаменяемо.

[0089] Кроме того, при употреблении в контексте данного документа «и (или)» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и (или)» при употреблении во фразе данного документа, такой как «А и (или) В», предназначен для включения «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Подобным образом, термин «и (или)» при употреблении во фразе, такой как «А, В и (или) С», предназначен для охвата каждого из следующих вариантов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0090] При употреблении в контексте данного документа термин «около» применяется в значении «примерно», «приблизительно», «ориентировочно», или «в районе». Когда термин «около» употребляется в сочетании с числовым диапазоном, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных числовых значений. Как правило, термин «около» в данном контексте модифицирует числовое значение выше и ниже указанного значения на величину отклонения 10%, плюс или минус (в сторону увеличения или в сторону уменьшения).

[0091] Следует понимать, что когда в тексте данного документа аспекты описаны с термином «содержащий (-ая, -ее, -ие)», также представлены в остальном аналогичные аспекты, описанные с применением терминов «состоящий (-ая, -ее, -ие) из» и (или) «состоящий (-ая, -ее, -ие) по существу из».

[0092] Если не определено иное, все технические и научные термины, употребляемые в данном документе, имеют значение, обычно понимаемое рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Например, *The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; *The Dictionary of Cell and Molecular Biology*, 3rd ed., 1999, Academic Press; и *The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised*, 2000, Oxford University Press, предоставляют рядовому специалисту общий словарь многих терминов, употребляемых в данном документе.

[0093] Единицы измерения, префиксы и символы обозначаются в их общепринятой форме в соответствии с Международной системой единиц (СИ; фр. «Système International de Unites, SI»). Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие указанный диапазон. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записаны слева направо в направлении от 5'- к 3'-концу. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от аминогруппы к карбоксильной группе. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов данного

изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на данное описание в целом. Соответственно, термины, определенные ниже, более полно определяются ссылкой на данное описание в целом.

[0094] При употреблении в контексте данного документа термин «количество» или «уровень» используется в самом широком смысле и относится к количеству, концентрации или содержанию соединения (например, метаболита, малой молекулы, белка, мРНК, маркера). Когда речь идет о метаболите или малой молекуле (например, лекарственном средстве), термины «количество», «уровень» и «концентрация» обычно используются взаимозаменяемо и обычно относятся к поддающемуся обнаружению количеству в биологическом образце. Термины «повышенные уровни» или «увеличенные уровни» относятся к увеличению количества, концентрации или содержания соединения в образце по сравнению с контрольным образцом, например, у индивидуума или индивидуумов, не страдающих данным заболеванием или нарушением (например, онкологическим заболеванием), или по сравнению с внутренним контролем. В некоторых аспектах данного изобретения повышенный уровень соединения (например, лекарственного средства) в образце относится к увеличению количества указанного соединения на около 5%, на около 10%, на около 15%, на около 20%, на около 25%, на около 30%, на около 35%, на около 40%, на около 45%, на около 50%, на около 55%, на около 60%, на около 65%, на около 70%, на около 75%, на около 80%, на около 85%, на около 90%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% по сравнению с количеством указанного соединения в контрольном образце, как определено с помощью методик, известных в данной области техники (например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии – ВЭЖХ). Термин «сниженный уровень» относится к уменьшению количества, концентрации или содержания соединения (например, лекарственного средства) у индивидуума по сравнению с контролем, например, у индивидуума или индивидуумов, не страдающих данным заболеванием или нарушением (например, онкологическим заболеванием), или по сравнению с внутренним контролем. В некоторых аспектах данного изобретения сниженный уровень представляет собой малое или не поддающееся обнаружению количество, концентрацию или содержание. В некоторых аспектах данного изобретения сниженный уровень соединения (например, лекарственного средства) в образце относится к снижению количества указанного соединения на около 5%, на около 10%, на около 15%, на около 20%, на около 25%, на около 30%, на около 35%, на около 40%, на около 45%, на около 50%, на около 55%, на около 60%, на около 65%, на около 70%, на около 75%, на около 80%, на около 85%, на около 90%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% по сравнению с количеством указанного соединения в контрольном образце, как определено с помощью методик, известных в данной области техники (например, с помощью ВЭЖХ).

[0095] Когда речь идет о белке, мРНК или маркере, таких как описанные в данном документе, термины «уровень экспрессии» или «экспрессионный уровень» в целом употребляются взаимозаменяемо и обычно относятся к поддающемуся выявлению количеству белка, мРНК или маркера в биологическом образце. В некоторых аспектах данного изобретения поддающееся выявлению количество или поддающийся выявлению уровень белка, мРНК или маркера связаны с вероятностью реакции на агент, такой как описанные в данном документе. Термин «экспрессия» в общем смысле относится к процессу, посредством которого информация, содержащаяся в гене, преобразуется в структуры (например, белковый маркер, такой как PD-L1), присутствующие и действующие в указанной клетке. Следовательно, при употреблении в контексте данного документа термин «экспрессия» может относиться к транскрипции в полинуклеотид, трансляции в полипептид или даже к модификациям полинуклеотида и (или) полипептида (например, посттрансляционная модификация полипептида). Фрагменты транскрибируемого полинуклеотида, транслируемого полипептида

или модификации полинуклеотида и (или) полипептида (например, посттрансляционная модификация полипептида) также должны рассматриваться как экспрессированные, независимо от того, происходят ли они из транскрипта, полученного путем альтернативного сплайсинга, или из деградированного транскрипта, или вследствие посттрансляционного процессинга полипептида, например, путем протеолиза. Термин «экспрессированные гены» включает в себя те гены, которые транскрибируются в полинуклеотид в виде мРНК и затем транслируются в полипептид, а также те гены, которые транскрибируются в РНК, но не транслируются в полипептид (например, транспортные и рибосомные РНК). Термины «повышенная экспрессия», «повышенные уровни экспрессии» или «повышенные уровни» относятся к повышенной экспрессии или повышенным уровням соединения в образце по сравнению с контрольным образцом, например, у индивидуума или индивидуумов, не страдающих данным заболеванием или нарушением (например, онкологическим заболеванием), или по сравнению с внутренним контролем. В некоторых аспектах данного изобретения повышенная экспрессия соединения (например, белкового маркера, такого как PD-L1) в образце относится к увеличению количества указанного соединения на около 5%, на около 10%, на около 15%, на около 20%, на около 25%, на около 30%, на около 35%, на около 40%, на около 45%, на около 50%, на около 55%, на около 60%, на около 65%, на около 70%, на около 75%, на около 80%, на около 85%, на около 90%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% по сравнению с количеством указанного соединения в контрольном образце, как определено с помощью методик, известных в данной области техники (например, с помощью клеточной сортировки с активацией флуоресценции – FACS). Термины «сниженная экспрессия», «сниженные уровни экспрессии» или «сниженные уровни» относятся к сниженной экспрессии или сниженным уровням соединения (например, белкового маркера) у индивидуума по сравнению с контролем, например, у индивидуума или индивидуумов, не страдающих данным заболеванием или нарушением (например, онкологическим заболеванием), или по сравнению с внутренним контролем. В некоторых аспектах данного изобретения сниженная экспрессия представляет собой небольшую экспрессию или ее отсутствие. В некоторых аспектах данного изобретения сниженная экспрессия соединения (например, белкового маркера) в образце относится к снижению количества указанного соединения на около 5%, на около 10%, на около 15%, на около 20%, на около 25%, на около 30%, на около 35%, на около 40%, на около 45%, на около 50%, на около 55%, на около 60%, на около 65%, на около 70%, на около 75%, на около 80%, на около 85%, на около 90%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% по сравнению с количеством указанного соединения в контрольном образце, как определено с помощью методик, известных в данной области техники (например, с помощью FACS).

[0096] При употреблении в контексте данного документа термин «антагонист» относится к любой молекуле, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность нативного полипептида, описанного в данном документе. Подходящие молекулы-антагонисты, в частности, включают в себя антитела-антагонисты или фрагменты таких антител, фрагменты или варианты аминокислотной последовательности нативных полипептидов, пептидов или белков. В некоторых аспектах данного изобретения ингибирование в присутствии антагониста имеет дозозависимый характер. В некоторых аспектах данного изобретения измеряемый сигнал (например, показатель биологической активности) по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей

мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или по меньшей мере на около 100% ниже сигнала, измеренного в образце отрицательного контроля при сопоставимых условиях. Также в данном документе представлены способы идентификации антагонистов, пригодных для применения в способах согласно данному изобретению. Например, такие способы включают в себя, но не ограничиваются ими, анализы связывания, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА, англ. «ELISA»), системы ForteBio®, радиоиммуноанализ (РИА, англ. «RIA»), анализ по технологии Meso Scale Discovery (например, электрохемилюминесцентный анализ по технологии Meso Scale Discovery (ЭХЛ-MSD, англ. «MSD-ECL»)) и анализ Luminex® на основе гранул. Такие анализы определяют способность антагониста связывать полипептид, представляющий интерес (например, рецептор или лиганд), и, следовательно, указывают на способность такого антагониста ингибировать, нейтрализовать или блокировать активность указанного полипептида. Эффективность антагониста также можно определить с помощью функциональных анализов, таких как способность антагониста ингибировать функцию данного полипептида или агониста. Например, функциональный анализ может включать в себя приведение полипептида в контакт с молекулой – потенциальным антагонистом и измерение обнаруживаемого изменения одной или большего числа биологических активностей, обычно ассоциированных с указанным полипептидом. Активность антагониста, как правило, определяют по его значению IC_{50} (концентрация, необходимая для ингибирования 50% ответа агониста). Чем ниже значение IC_{50} , тем выше активность антагониста и тем ниже концентрация, необходимая для ингибирования максимального биологического ответа.

[0097] При употреблении в контексте данного документа термин «антитело против CCR8» обозначает антитело, которое специфически связывается с CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 ингибирует биологическую активность CCR8 и (или) путь (пути) ниже по каскаду, опосредованный (-е) передачей сигналов через CCR8 или другой опосредованной CCR8 функцией. Антитело против CCR8 включает в себя, но не ограничивается ими, антитела, которые блокируют, проявляют антагонизм, подавляют, ингибируют или снижают биологическую активность CCR8 (например, связывание лиганда, активацию передачи сигналов посредством G-белка), включая пути ниже по каскаду, опосредованные передачей сигналов через CCR8 или его функцией, например, связывание рецептора и (или) инициацию клеточного ответа на CCR8 или его метаболиты (например, иммуносупрессию). В некоторых аспектах данного изобретения антитело против CCR8, представленное в данном документе, связывается с CCR8 человека и предотвращает, блокирует или ингибирует связывание CCR8 человека с лигандом (например, с CCL1), или взаимодействие между CCR8 и G-белком. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 предотвращает, блокирует или ингибирует связывание CCR8 человека с CCL1. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 предотвращает, блокирует или ингибирует связывание CCR8 человека с CCL8. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 предотвращает, блокирует или ингибирует связывание CCR8 человека с CCL16. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 предотвращает, блокирует или ингибирует связывание CCR8 человека с CCL18.

[0098] При употреблении в контексте данного документа термин «антитело» относится к целому антителу, содержащему два полипептида легкой цепи и два полипептида тяжелой цепи. Целые антитела включают в себя различные изоформы антител, включительно с антителами IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Термин «антитело» включает в себя поликлональное антитело, моноклональное антитело, химеризированное или химерное антитело, гуманизированное антитело, приматизированное антитело, деиммунизированное антитело и

полностью человеческое антитело. Антитело может быть получено из или произведено от любого из множества видов, например, млекопитающих, таких как человек, высшие приматы, отличные от человека (например, орангутанги, бабуины или шимпанзе), лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, кролики, морские свинки, песчанки, хомяки, крысы и мыши. Антитело может представлять собой очищенное или рекомбинантное антитело. При употреблении в контексте данного документа термины «фрагмент антитела», «антигенсвязывающий фрагмент» или аналогичные термины относятся к фрагменту антитела, который сохраняет способность связываться с целевым антигеном (например, CCR8) и ингибировать активность указанного целевого антигена. Такие фрагменты включают в себя, например, одноцепочечное антитело, одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), фрагмент Fd, фрагмент Fab, фрагмент Fab' или фрагмент F(ab')₂. Фрагмент scFv представляет собой единую полипептидную цепь, которая включает в себя переменные области как тяжелой, так и легкой цепей антитела, из которого получен указанный scFv. Кроме того, интрадела, минитела, триатела и диатела также включены в определение антитела и подходят для применения в способах, описанных в данном документе. См., например, работы Todorovska et al., (2001) *J. Immunol. Methods* 248 (1): 47 - 66; Hudson and Kortt, (1999) *J. Immunol. Methods* 231 (1): 177 - 189; Poljak, (1994) *Structure* 2 (12): 1121 - 1123; Rondon and Marasco, (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 257 - 283, содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0099] При употреблении в контексте данного документа термин «фрагмент антитела» также включает в себя, например, однодоменные антитела, такие как верблюжьи однодоменные антитела. См., например, работы Muyldermans et al., (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26: 230 - 235; Nuttall et al., (2000) *Curr. Pharm. Biotech.* 1: 253 - 263; Reichmann et al., (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 25 - 38; международные патентные публикации PCT № WO 94/04678 и WO 94/25591; и патент США № 6005079, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых аспектах данного изобретения представлены однодоменные антитела, содержащие два домена VH, с модификациями, в результате которых образуются однодоменные антитела.

[0100] В некоторых аспектах данного изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает в себя переменную область полипептида тяжелой цепи и переменную область полипептида легкой цепи. В некоторых аспектах данного изобретения антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, содержит CDR полипептида легкой цепи и полипептида тяжелой цепи антитела.

[0101] При употреблении в контексте данного документа термин «биспецифическое антитело» или «бифункциональное антитело» означает искусственное гибридное антитело, содержащее две различные пары тяжелой/легкой цепей и два различных сайта связывания. Биспецифические антитела можно получить с помощью различных способов, включая слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, работы Songsivilai & Lachmann, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315 - 321; Kostelny et al., (1992) *J. Immunol.* 148: 1547 - 1553.

[0102] Традиционно, рекомбинантное продуцирование биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар легкая цепь/тяжелая цепь иммуноглобулина, при этом указанные две пары легкая цепь/тяжелая цепь имеют разную специфичность (Milstein and Cuello, (1983) *Nature* 305: 537 - 539). Переменные домены антител с желательной специфичностью связывания (участки антитела, соединяющиеся с антигеном) могут быть слиты с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Слияние переменной области тяжелой цепи предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, областей CH₂ и CH₃. Для получения дополнительной информации об иллюстративных известных в данное время способов создания

биспецифических антител см., например, работы Suresh et al., (1986) *Methods Enzymol.* 121: 210; международную патентную публикацию № WO 96/27011; работы Brennan et al., (1985) *Science* 229: 81; Shalaby et al., *J. Exp. Med.* (1992) 175: 217 - 225; Kostelny et al., (1992) *J. Immunol.* 148 (5): 1547 - 1553; Hollinger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444 - 6448; Gruber et al., (1994) *J. Immunol.* 152: 5368; и Tutt et al., (1991) *J. Immunol.* 147: 60. Биспецифические антитела включают в себя перекрестно-сшитые или гетероконъюгатные антитела. Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с применением любых подходящих способов перекрестного сшивания. Подходящие перекрестно-сшивающие агенты хорошо известны в данной области техники и представлены в патенте США № 4676980 вместе с рядом методик перекрестного сшивания.

[0103] В литературе описаны также различные методики получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Например, биспецифические антитела были получены с использованием лейциновых застежек. См., например, работу Kostelny et al. (1992) *J Immunol* 148 (5): 1547 - 1553. Пептиды лейциновой застежки из белков Fos и Jun могут быть связаны с частями Fab' двух разных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител могут быть восстановлены в шарнирной области с образованием мономеров, а затем повторно окислены с образованием гетеродимеров антител. Данный способ можно также применять для получения гомодимеров антител. Технология «диатела», описанная в работе Hollinger et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6444 - 6448, обеспечивает альтернативный механизм для получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить соединение между двумя доменами на одной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены соединяться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих участка. Также сообщалось о другой стратегии получения фрагментов биспецифических антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (scFv). См., например, работу Gruber et al. (1994) *J Immunol* 152: 5368. В качестве альтернативы, антитела могут представлять собой «линейные антитела», как описано, например, в работе Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8 (10): 1057 - 1062. Кратко, эти антитела составляют пару тандемных сегментов Fd (VH - CH1 - VH - CH1), которые образуют пару антигенсвязывающих участков. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

[0104] Антитела с больше чем двумя валентностями (например, триспецифические антитела) рассматриваются и описаны, например, в работе Tutt et al. (1991) *J Immunol* 147: 60.

[0105] При употреблении в контексте данного документа термин «бипаратопное» относится к антителу, которое способно связывать два эпитопа на одном антигене, например полипептиде, целевой молекуле. В некоторых аспектах данного изобретения бипаратопное антитело содержит первую антигенсвязывающую область и вторую антигенсвязывающую область, при этом указанная первая антигенсвязывающая область связывает первый эпитоп, и указанная вторая антигенсвязывающая область связывает второй эпитоп того же антигена.

[0106] Данное изобретение также охватывает вариантыные формы мультиспецифических антител, такие как молекулы иммуноглобулина с двойным переменным доменом (ДВД-Ig, англ. «DVD-Ig»), описанные в работе Wu et al. (2007) *Nat Biotechnol* 25 (11): 1290 - 1297. Молекулы ДВД-Ig сконструированы таким образом, что два разных переменных домена легкой цепи (VL) из двух разных родительских антител связаны в тандеме напрямую или через короткий линкер с помощью методик рекомбинантной ДНК, за которыми следует константный домен легкой цепи. Подобным образом, тяжелая цепь содержит два различных переменных домена тяжелой цепи (VH), соединенных в тандеме, за которыми следуют константный домен

СН1 и область Fc. Способы получения молекул ДВД-Ig из двух родительских антител дополнительно описаны, например, в международных патентных публикациях РСТ № WO 08/024188 и WO 07/024715. В некоторых аспектах данного изобретения биспецифическое антитело представляет собой иммуноглобулин Fab-в-тандеме, в котором переменная область легкой цепи со второй специфичностью слита с переменной областью тяжелой цепи целого антитела. Такие антитела описаны, например, в международной патентной публикации № WO 2015/103072.

[0107] При употреблении в контексте данного документа термин «раковый антиген» относится к: (i) опухолеспецифическим антигенам; (ii) ассоциированным с опухолью антигенам; (iii) клеткам, которые экспрессируют опухолеспецифические антигены; (iv) клеткам, которые экспрессируют ассоциированные с опухолью антигены; (v) эмбриональные антигены на опухолях; (vi) аутологичные опухолевые клетки; (vii) опухолеспецифические мембранные антигены; (viii) ассоциированные с опухолью мембранные антигены; (ix) рецепторы факторов роста; (x) лиганды факторов роста; и (xi) любой другой тип антигена, антигенпрезентирующей клетки или материала, ассоциированного с онкологическим заболеванием.

[0108] При употреблении в контексте данного документа термин «иммунный ответ в отношении рака» относится к иммунному ответу, индуцированному присутствием опухолей, раковых клеток или раковых антигенов. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ответ включает в себя пролиферацию лимфоцитов, специфичных в отношении ракового антигена. В определенных аспектах данного изобретения указанный ответ включает в себя экспрессию и активацию антител и рецепторов Т-клеток, а также образование и высвобождение лимфокинов, хемокинов и цитокинов. И врожденная, и приобретенная иммунные системы взаимодействуют, чтобы инициировать антигенные ответы против опухолей, раковых клеток или раковых антигенов. В некоторых аспектах данного изобретения иммунный ответ в отношении рака представляет собой Т-клеточный ответ.

[0109] Термин «карцинома» признан в данной области техники и относится к злокачественным новообразованиям эпителиальных или эндокринных тканей, включая карциномы дыхательной системы, карциномы желудочно-кишечного тракта, карциномы мочеполовой системы, карциномы яичка, карциномы молочной железы, карциномы предстательной железы, карциномы эндокринной системы и меланомы. Антитела против CCR8, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения пациентов, которые имеют, у которых подозревается наличие или которые могут иметь высокий риск развития любого типа онкологического заболевания, включая карциному почки или меланому, или любого вирусного заболевания. Иллюстративные карциномы включают в себя карциномы, образующиеся из ткани шейки матки, легкого, предстательной железы, молочной железы, головы и шеи, толстой кишки и яичника. Данный термин также включает в себя карциносаркомы, которые включают в себя злокачественные опухоли, состоящие из карциноматозных и саркоматозных тканей. Термин «аденокарцинома» относится к карциноме, происходящей из железистой ткани или в которой опухолевые клетки образуют узнаваемые железистые структуры.

[0110] При употреблении в контексте данного документа термин «CCR8» или «хемокиновый рецептор С-С типа 8» относится к рецептору, сопряженному с G-белком. Известно, что CCR8 имеет по крайней мере четыре лиганда: CCL1, CCL8, CCL16 и CCL18. Считается, что CCL1 потенцирует Treg-клетки человека, индуцируя экспрессию CCR8, FOXP3, CD39, гранзима В и ИЛ-10 STAT3-зависимым образом. См., например, работу Barsheshet et al., *PNAS* 114 (23): 6086 - 91 (June 6, 2017). CCR8 экспрессируется главным образом на Treg-клетках и в меньшей степени на небольших фракциях TH2-клеток, моноцитарных клеток, NK-клеток и клеток CD8⁺. CCR8 представляет собой трансмембранный рецептор, имеющий семь трансмембранных доменов, внеклеточный N-концевой домен (SEQ ID NO: 172) и внутриклеточный C-концевой домен, который

взаимодействует с G-белком. Аминокислотная последовательность CCR8 человека (UniProt P51685; SEQ ID NO: 171) показана в таблице 1 ниже.

Таблица 1: последовательность CCR8 человека. N-концевой внеклеточный домен (SEQ ID NO: 172) подчеркнут.

<p><u>MDYTLDL SVTTVTDYYYPDIFSSPCDAELIQ TNGK LLLAVFYCLLFVFSLLGNSLVILVLVVCKK LRS</u> ITDVYLLNLALS DLLFVFSFPFQTYLLDQWVFGTVMCKVVS GFYYIGFYSSMFFITLMSVDRYLAV VHAVYALKVRTIRMGTTLCLAVWLTAIMATIPLLVFYQVASEDGV LQCYSFYNNQQLKWKIFTNFK MNILGLLIPFTIFMFCYIKILHQLKRCQNHNKTKAIRLV LIVVIASLLFWVPFNVLFLTSLHSMHILD GCSISQQLTYATHVTEIISFTHCCVNPVIYAFVGEKFKKHLSEIFQKSCSQIFNYLGRQMPRESCEKSSS CQQHSSRSSSVDYIL (SEQ ID NO: 171)</p>
--

[0111] При употреблении в контексте данного документа термин «конкурировать», когда он употребляется в контексте антигенсвязывающих белков (например, иммуноглобулинов, антител или их антигенсвязывающих фрагментов), которые конкурируют за связывание с одним и тем же эпитопом, относится к взаимодействию между антигенсвязывающими белками, как определено с помощью анализа (например, анализ конкурентного связывания; анализ перекрестного блокирования), при этом тестируемый антигенсвязывающий белок (например, тестируемое антитело) ингибирует (например, снижает или блокирует) специфическое связывание референсного антигенсвязывающего белка (например, референсного антитела) с общим антигеном (например, CCR8 или его фрагментом).

[0112] Полипептид, или аминокислотная последовательность, «полученный (-ая) из» обозначенного белка или полипептида относится к происхождению полипептида. Предпочтительно полипептидная или аминокислотная последовательность, полученная из конкретной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична этой последовательности или ее части, при этом указанная часть состоит по меньшей мере из 10-20 аминокислот, предпочтительно – меньшей мере из 20-30 аминокислот, более предпочтительно – по меньшей мере из 30-50 аминокислот, или которая иным образом идентифицируется специалистом в данной области техники как происходящая из указанной последовательности. Полипептиды, полученные из другого пептида, могут иметь одну или большее число мутаций по отношению к исходному полипептиду, например, один или большее число аминокислотных остатков, которые были заменены другим аминокислотным остатком, или которые имеют одну или большее число вставок или делеций аминокислотных остатков.

[0113] Полипептид может содержать аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. Такие варианты обязательно меньше чем на 100% идентичны или сходны с последовательностью исходной молекулы. В определенных аспектах данного изобретения указанный вариант будет иметь аминокислотную последовательность, которая на от около 75% до меньше чем 100% идентична или сходна с аминокислотной последовательностью исходного полипептида, более предпочтительно – на от около 80% до меньше чем 100%, более предпочтительно – на от около 85% до меньше чем 100%, более предпочтительно – на от около 90% до меньше чем 100% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) и наиболее предпочтительно – на от около 95% до меньше чем 100%, идентична или сходна с аминокислотной последовательностью исходного полипептида, например, по всей протяженности указанной вариантной молекулы.

[0114] В определенных аспектах данного изобретения антитела согласно данному изобретению кодируются нуклеотидной последовательностью. Нуклеотидные последовательности согласно данному изобретению могут быть пригодны для ряда применений, включая клонирование, генную терапию, экспрессию и очистку белков, введение мутаций, ДНК-вакцинацию хозяина, нуждающегося в этом, создание антител, например, для пассивной иммунизации, ПЦР, генерацию праймеров и зондов, и т. п.

[0115] Специалисту в данной области техники также будет понятно, что антитела, подходящие для применения в представленных в данном документе способах, могут быть изменены таким образом, что их последовательность будет отличаться от встречающихся в природе или нативных последовательностей, из которых они были получены, с сохранением при этом желательной активности, свойственной указанным нативным последовательностям. Например, могут быть сделаны нуклеотидные или аминокислотные замены, приводящие к консервативным заменам или изменениям в «заменяемых» аминокислотных остатках. Мутации можно ввести с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, например, сайт-специфического мутагенеза и опосредованного полимеразной цепной реакцией (ПЦР) мутагенеза.

[0116] Антитела, подходящие для применения в представленных в данном документе способах, могут содержать консервативные аминокислотные замены в одном или большем числе аминокислотных остатков, например, в незаменимых или заменимых аминокислотных остатках. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой один аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные 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, заменимый аминокислотный остаток в связывающем полипептиде предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В определенных аспектах данного изобретения последовательность аминокислот может быть консервативно заменена структурно подобной последовательностью, которая отличается по порядку и (или) составу аминокислот – членов семейства боковых цепей. В качестве альтернативы, в некоторых аспектах данного изобретения мутации могут быть введены случайным образом по всей продолжительности или части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть включены в связывающие полипептиды согласно данному изобретению и подвергнуты скринингу на их способность связываться с желаемой целевой молекулой.

[0117] При употреблении в контексте данного документа термин «перекрестно реагирует» относится к способности антитела согласно данному изобретению связываться с CCR8 другого вида. Например, антитело согласно данному изобретению, которое связывает CCR8 человека, может также связывать CCR8 других видов. При употреблении в контексте данного документа перекрестную реактивность измеряют путем обнаружения специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, поверхностный плазмонный резонанс – ППП, англ. «SPR»; ТИФА) или по связыванию или иному функциональному взаимодействию с клетками, физиологически экспрессирующими CCR8. Способы определения перекрестной реактивности включают в себя стандартные анализы связывания, как описано в данном документе, например, с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

BIACORE™ с использованием анализатор BIACORE™ 2000 SPR (Biacore AB, г. Уппсала, Швеция), или с помощью методик проточной цитометрии.

[0118] При употреблении в контексте данного документа термин «ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ)» относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. Ответы ЦТЛ опосредованы главным образом CD8⁺ Т-клетками.

[0119] При употреблении в контексте данного документа термин «EC₅₀» относится к такой концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которая индуцирует ответ либо в анализе *in vitro*, либо в анализе *in vivo*, составляющий 50% от максимального ответа, т. е. находящийся посередине между максимальным ответом и базовым уровнем.

[0120] При употреблении в контексте данного документа термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. Термин «терапевтически эффективная доза» определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичного прерывания заболевания и его осложнений у пациента, который уже страдает от данного заболевания. Количества, эффективные для такого применения, зависят от тяжести заболевания, подлежащего лечению, и общего состояния собственной иммунной системы пациента.

[0121] При употреблении в контексте данного документа термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к участку на антигене, с которым специфически связываются иммуноглобулин или антитело. Термин «картирование эпитопов» относится к процессу или способу идентификации сайта связывания, или эпитопа, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента на его целевом белковом антигене. В данном документе представлены способы и методики картирования эпитопов. «Эпитопы» могут быть образованы как последовательно расположенными аминокислотами, так и не последовательно расположенными аминокислотами, расположенными рядом в результате сворачивания белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате сворачивания в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, с какими эпитопами связывается данное антитело (т. е. картирование эпитопов), хорошо известны в данной области техники и включают в себя, например, иммуноблоттинг и анализы иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды из CCR8 исследуют на предмет их реактивности с данным антителом против CCR8. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают в себя способы, известные в данной области техники, и способы, описанные в данном документе, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерно-магнитный резонанс (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

[0122] Данное изобретение также охватывает антитела, которые связываются с эпитопом на CCR8, который содержит весь или часть эпитопа, распознаваемого конкретными антителами, описанными в данном документе (например, тот же самый или перекрывающийся участок, или участок, находящийся в пределах такого участка или охватывающий его).

[0123] Данное изобретение также охватывает антитела, которые связывают один и тот же эпитоп, и (или) антитела, которые конкурируют с антителами, описанными в данном документе, за связывание с CCR8 человека. Антитела, которые распознают один и тот же эпитоп или конкурируют за связывание, могут быть

идентифицированы с использованием рутинных методик. Такие методики включают в себя, например, иммуноанализ, который показывает способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, т. е. анализ конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном, таким как ССR8. Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), сэндвич-конкурентный анализ (см. работу Stahl *et al.*, *Methods in Enzymology* 9: 242 (1983)); твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА (см. работу Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137: 3614 (1986)); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. работу Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный РИА прямым мечением с использованием метки I-125 (см. работу Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25 (1): 7 (1988)); твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА (см. работу Cheung *et al.*, *Virology* 176: 546 (1990)); и РИА с прямым мечением. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32: 77 (1990)). Как правило, такие способы анализа включают в себя применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из них, немеченого исследуемого иммуноглобулина и меченого референсного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование оценивают путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Как правило, исследуемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Как правило, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, на 55-60%, на 60-65%, на 65-70%, на 70-75% или больше.

[0124] Другие методики включают в себя, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген – антитело, обеспечивающие атомарное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрию в сочетании с водородно-дейтериевым (H/D) обменом, которая изучает конформацию и динамику взаимодействия антиген – антитело. Другие способы исследуют связывание антитела с фрагментами антигена или мутантными вариациями антигена, при этом потеря связывания из-за модификации аминокислотного остатка в последовательности данного антигена часто считается признаком наличия эпитопного компонента. Кроме того, можно применять вычислительные комбинаторные способы для картирования эпитопов. Эти способы основаны на способности представляющего интерес антитела аффинно изолировать специфические короткие пептиды из комбинаторных библиотек фаговых дисплеев. Затем такие пептиды рассматриваются как основа для определения эпитопа, соответствующего антителу, использованному для скрининга указанной библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, картируют конформационные прерывистые эпитопы.

[0125] При употреблении в контексте данного документа термин «Fc-опосредованные эффекторные функции» или «эффекторные функции Fc» относится к биологическим активностям антитела, отличной от основной функции и назначения данного антитела. Например, эффекторные функции терапевтического агонистического антитела представляют собой проявления биологической активности, отличные от активации целевого белка или пути. Примеры эффекторных функций антитела включают в себя связывание С1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение уровня экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора); отсутствие активации тромбоцитов, экспрессирующих рецептор Fc; и активацию В-клеток. Многие эффекторные функции начинаются со связывания Fc с

рецептором Fc γ . В некоторых аспектах данного изобретения нацеленное на опухолевый антиген антитело обладает эффекторной функцией, например, активностью АЗКЦ. В некоторых аспектах данного изобретения нацеленное на опухолевый антиген антитело, описанное в данном документе, содержит вариантную константную область, обладающую повышенной эффекторной функцией (например, повышенной способностью опосредовать АЗКЦ) по сравнению с немодифицированной формой константной области.

[0126] При употреблении в контексте данного документа термин «рецептор Fc» относится к полипептиду, обнаруживаемому на поверхности эффекторных клеток иммунной системы, который связывается с областью Fc антитела. В некоторых аспектах данного изобретения рецептор Fc представляет собой рецептор Fc γ . Существуют три подкласса рецепторов Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) и Fc γ RIII (CD16). Все четыре изотипа IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) связывают и активируют рецепторы Fc γ RI, Fc γ RIIA и Fc γ RIIIA. Fc γ RIIB представляет собой ингибиторный рецептор, поэтому связывание антител с этим рецептором не вызывает активацию комплемента и клеточные ответы. Fc γ RI представляет собой высокоаффинный рецептор, который связывается с IgG в мономерной форме, тогда как Fc γ RIIA и Fc γ RIIIA представляет собой низкоаффинные рецепторы, которые связывают IgG только в мультимерной форме и имеют несколько более низкую аффинность. Связывание антитела с рецептором Fc и (или) с C1q регулируется специфическими остатками или доменами в областях Fc. Связывание также зависит от остатков, расположенных в шарнирной области и в части CH2 антитела. В некоторых аспектах данного изобретения агонистическая и (или) терапевтическая активности антител, описанных в данном документе, зависят от связывания области Fc с рецептором Fc (например, с Fc γ R). В некоторых аспектах данного изобретения агонистическая и (или) терапевтическая активности антител, описанных в данном документе, усиливаются вследствие связывания области Fc с рецептором Fc (например, с Fc γ R).

[0127] При употреблении в контексте данного документа термин «антитело человека» включает в себя антитела, имеющие переменные и константные области (при их наличии), происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека согласно данному изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или с помощью соматической мутации *in vivo*) (см., например, работы Lonberg et al., (1994) *Nature* 368 (6474): 856 - 859); Lonberg, (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49 - 101; Lonberg & Huszar, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65 - 93; и Harding & Lonberg, (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536 - 546). Тем не менее, при употреблении в контексте данного документа термин «антитело человека» не включает в себя антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевых линий других видов млекопитающих, таких как мыши, были вставлены в каркасные последовательности человека (т. е. гуманизированные антитела).

[0128] При употреблении в контексте данного документа термин «гуманизированное» относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR антитела не человека заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR были заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одного или большего числа участков CDR не изменились. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот допустимы, если они не

лишают антитело способности связываться с конкретным антигеном. «Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, сходную со специфичностью исходного антитела.

[0129] «Химерное антитело» относится к антителу, в котором вариабельные области происходят от одного вида, а константные области происходят от другого вида, например, к антителу, в котором вариабельные области происходят от антитела мыши, а константные области происходят от антитела человека.

[0130] При употреблении в контексте данного документа термин «гетерологичное антитело» определяется в отношении трансгенного, отличного от человека организма, продуцирующего такое антитело. Данный термин относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность или кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующие тем, которые обнаруживаются в организме, не являющемся трансгенным животным, отличным от человека, и, как правило, из вида, отличного от вида трансгенного животного, отличного от человека.

[0131] Термины «индуцирование иммунного ответа» и «усиление иммунного ответа» употребляются взаимозаменяемо и относятся к стимуляции иммунного ответа (т. е. либо пассивного, либо адаптивного) на конкретный антиген. Термин «индуцировать», употребляемый в отношении индуцирования КЗЦ или АЗКЦ, относится к стимуляции конкретных механизмов прямого уничтожения клеток.

[0132] При употреблении в контексте данного документа термин «иммуногенная гибель клеток» (также известный как «иммуногенный апоптоз») относится к способу гибели клеток, связанному с активацией одного или большего числа сигнальных путей, которые индуцируют предсмертную экспрессию и испускание молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (МФАП, англ. «DAMP») (например, аденозинтрифосфат, АТФ) из опухолевой клетки, что приводит к повышению иммуногенности указанной опухолевой клетки и гибели указанной опухолевой клетки иммуногенным образом (например, путем фагоцитоза). При употреблении в контексте данного документа термин «агент, индуцирующий иммуногенную гибель клеток» относится к химическому, биологическому или фармакологическому агенту, который индуцирует процесс, путь или способ иммуногенной гибели клеток.

[0133] При употреблении в контексте данного документа термины «ингибирует», «снижает» или «блокирует» (например, в отношении ингибирования или снижения фосфорилирования STAT1 и (или) STAT3 в клетке, опосредованного CCR8 человека) употребляются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Ингибирование/блокирование CCR8 снижает или изменяет нормальный уровень или тип активности, которые наблюдались бы при отсутствии ингибирования или блокирования. Ингибирование и блокирование также включают в себя любое измеримое снижение аффинности связывания CCR8 при его контакте с антителом против CCR8 по сравнению с CCR8, не находящимся в контакте с антителом против CCR8, например, связывание CCR8 ингибируется по меньшей мере на около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100%.

[0134] При употреблении в контексте данного документа термин «ингибирует рост» (например, в отношении опухолевых клеток, например, раковых клеток) предназначен для включения в себя любого измеримого снижения роста опухолевой клетки, например, ингибирование роста опухолевой клетки по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 100%.

[0135] При употреблении в контексте данного документа термин «нуждающийся в профилактике», «нуждающийся в лечении» или «нуждающийся в этом» относится к субъекту, который по мнению соответствующего медицинского сотрудника (например, врача, медсестры или практикующей медсестры – в

случае людей; ветеринара – в случае млекопитающих, отличных от человека), получит надлежащую пользу от данного лечения (например, лечения композицией, содержащей антитело против CCR8).

[0136] Термин «*in vivo*» относится к процессам, происходящим в живом организме.

[0137] При употреблении в контексте данного документа термин «выделенное антитело» предназначен для обозначения антитела, которое по существу не содержит другие антитела, имеющие другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CCR8 человека, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от CCR8). Тем не менее, выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, может иметь перекрестную реактивность с другими белками CCR8 из разных видов. Тем не менее, указанное антитело продолжает демонстрировать специфическое связывание с CCR8 человека в анализе специфического связывания, как описано в данном документе. В дополнение к этому, выделенное антитело, как правило, по существу не содержит другого клеточного материала и (или) других химических соединений. В некоторых аспектах данного изобретения комбинация «выделенных» антител, обладающих различной специфичностью в отношении CCR8, объединена в четко определенную композицию.

[0138] При употреблении в контексте данного документа термин «молекула выделенной нуклеиновой кислоты» относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитело или части антител (например, V_H , V_L , CDR3), которые связываются с CCR8, и предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, в которой нуклеотидные последовательности, кодирующие указанное антитело или его часть, не содержат других нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или части антител, которые связывают антигены, отличные от CCR8, при этом другие последовательности могут естественным образом фланкировать указанную нуклеиновую кислоту в геномной ДНК человека. Например, последовательность, выбранная из набора последовательностей, представленного в **таблице 8**, соответствует нуклеотидным последовательностям, содержащим переменные области тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L) моноклональных антител против CCR8, описанных в данном документе.

[0139] При употреблении в контексте данного документа термин «изотип» относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. В некоторых аспектах данного изобретения моноклональное антитело человека согласно данному изобретению относится к изотипу IgG1. В некоторых аспектах данного изобретения моноклональное антитело человека согласно данному изобретению относится к изотипу IgG2. В некоторых аспектах данного изобретения моноклональное антитело человека согласно данному изобретению относится к изотипу IgG3. В некоторых аспектах данного изобретения моноклональное антитело человека согласно данному изобретению относится к изотипу IgG4. Как очевидно квалифицированному специалисту в данной области техники, идентификация изотипов антител (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE) является рутинной в данной области техники и, как правило, включает в себя комбинацию выравнивания последовательностей с известными антителами, опубликованными последовательностями вариантов по Fc и консервативными последовательностями.

[0140] При употреблении в контексте данного документа термин « K_D » или « K_D » относится к равновесной константе диссоциации в реакции связывания между антителом и антигеном. Значение K_D представляет собой числовое отображение отношения константы скорости диссоциации антитела (k_d) к константе скорости ассоциации антитела (k_a). Величина K_D обратно пропорциональна аффинности связывания антитела с антигеном. Чем меньше значение K_D , тем выше аффинность антитела к его антигену. Аффинность представляет собой силу связывания отдельной молекулы с ее лигандом и обычно измеряется и отображается

с помощью равновесной константы диссоциации (K_D), которая используется для оценки и ранжирования силы бимолекулярных взаимодействий.

[0141] При употреблении в контексте данного документа термин «kd» или « k_d » (в качестве альтернативы – «koff» или « k_{off} ») предназначен для обозначения константы скорости диссоциации антитела из комплекса антитело – антиген. Значение k_d представляет собой числовое отображение доли комплексов, которые распадаются или диссоциируют в секунду, и выражается в единицах сек^{-1} .

[0142] При употреблении в контексте данного документа термин «ka» или « k_a » (в качестве альтернативы – «kon» или « k_{on} ») предназначен для обозначения константы скорости ассоциации антитела с антигеном. Значение k_a представляет собой числовое отображение числа комплексов антитело – антиген, образующихся за секунду в 1-молярном (1M) растворе антитела и антигена, и выражается в единицах $M^{-1}\text{с}^{-1}$.

[0143] При употреблении в контексте данного документа термин «лимфоциты» относится к типу белых клеток крови, или лейкоцитов, которые участвуют в иммунной защите организма. Существует два основных типа лимфоцитов: В-клетки и Т-клетки. При употреблении в контексте данного документа термин «инфильтрирующий опухоль лимфоцит» (сокращенно «ИОЛ») или «инфильтрирующая опухоль Трег-клетка» относится к лимфоциту или Трег-клетке, соответственно, которые ассоциированы с опухолевыми клетками, например, которые локализованы в пределах опухолевой массы.

[0144] При употреблении в контексте данного документа термины «связанный (-ая, -ое, -ые)», «слитый (-ая, -ое, -ые)» или «слияние» употребляются взаимозаменяемо. Данные термины относятся к соединению двух или большего числа элементов, компонентов или доменов любыми способами, включая химическую конъюгацию или рекомбинантные способы. Способы химической конъюгации (например, с использованием гетеробифункциональных перекрестно-сшивающих агентов) известны в данной области техники.

[0145] При употреблении в контексте данного документа термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Соответственно, термин «моноклональное антитело человека» относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность связывания и которое имеет переменные и необязательные константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В некоторых аспектах данного изобретения моноклональные антитела человека продуцируются гибридомой, которая включает в себя В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека, слитые с иммортализованной клеткой.

[0146] При употреблении в контексте данного документа термин «естественные клетки-киллеры (NK)» относится к типу цитотоксических лимфоцитов. Это крупные, как правило зернистые, не-Т-, не-В-лимфоциты, убивающие определенные опухолевые клетки и играющие важную роль во врожденном иммунитете к вирусам и другим внутриклеточным патогенам, а также в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

[0147] При употреблении в контексте данного документа термин «встречающийся в природе» применительно к объекту относится к тому факту, что данный объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательности, присутствующие в организме (включая вирусы), которые могут быть выделены из источника в природе и которые не были преднамеренно изменены человеком в лаборатории, встречаются в природе.

[0148] При употреблении в контексте данного документа термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одно-, либо в двухцепочечной форме.

Если не указаны специальные ограничения, данный термин включает в себя нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают связывающими свойствами, сходными со свойствами референсной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются способом, сходным с таковым для встречающихся в природе нуклеотидов. Если не указано иное, подразумевается, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает в себя ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности так же, как и явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов можно получить путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или большего числа выбранных (или всех) кодонов замещено смешанным основанием и (или) остатками дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081, 1991; Ohtsuka et al., *Biol. Chem.* 260: 2605 - 2608, 1985; и Cassol et al, 1992; Rossolini et al, *Mol. Cell. Probes* 8: 91 - 98, 1994). Для аргинина и лейцина модификации второго основания также могут быть консервативными. Термин «нуклеиновая кислота» употребляется в данном документе взаимозаменяемо в отношении гена, кДНК и мРНК, кодируемых геном.

[0149] Используемые в данном изобретении полинуклеотиды могут состоять из любых полирибонуклеотидов или полидезоксирибонуклеотидов, которые могут представлять собой немодифицированные РНК или ДНК, или модифицированные РНК или ДНК. Например, полинуклеотиды могут состоять из одноцепочечной и двухцепочечной ДНК, представляющей собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных участков, одноцепочечной и двухцепочечной РНК, а также РНК, представляющей собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных участков, гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, что более типично, двухцепочечными, или смесью одноцепочечных и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотид может состоять из трехцепочечных участков, содержащих РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Полинуклеотид может также содержать одно или большее число модифицированных оснований, или каркасы ДНК или РНК, модифицированные для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания включают в себя, например, триптированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; таким образом, «полинуклеотид» включает в себя химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

[0150] Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию указанной последовательности. Что касается последовательностей, регулирующих транскрипцию, термин «функционально связанные» означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными и, если необходимо для соединения двух областей, кодирующих белок, являются смежными и находятся в рамке считывания. Для последовательностей переключателей термин «функционально связанные» указывает на то, что указанные последовательности способны осуществлять рекомбинацию переключателей.

[0151] При употреблении в контексте данного документа «парентеральное введение», «вводят парентерально» и другие грамматически эквивалентные фразы относятся к способам введения, не являющимися энтеральным и местным введением, обычно выполняемым путем инъекции и включающим в себя, без ограничений, внутривенные, интраназальные, внутриглазные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсулярные, внутриглазничные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные,

субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные, интрацеребральные, внутрочерепные, интракаротидные или внутригрудные инъекции и инфузии.

[0152] При употреблении в контексте данного документа термин «пациент» включает в себя людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

[0153] Термин «процент идентичности», при употреблении в контексте двух или большего числа последовательностей нуклеиновых кислот или последовательностей полипептидов, относится к двум или большему числу последовательностей или подпоследовательностей, которые имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с применением одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, BLASTP и BLASTN или других алгоритмов, доступных специалистам в данной области техники), или при визуальной оценке. В зависимости от применения «процент идентичности» может существовать в области сравниваемой последовательности, например, в функциональном домене, или, в качестве альтернативы, может существовать по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Для сравнения последовательностей, как правило, одну последовательность рассматривают как референсную последовательность, с которой сравнивают исследуемые последовательности. В случае применения алгоритма для сравнения последовательностей исследуемую и референсную последовательности вносят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей, и устанавливают параметры программы – алгоритма для сравнения последовательностей. Алгоритм для сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности для исследуемой последовательности (-ей) относительно референсной последовательности на основе указанных параметров программы.

[0154] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии согласно Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), с помощью алгоритма гомологичного выравнивания согласно Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), с помощью способа поиска подобия согласно Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мадисон, штат Висконсин, США) или с помощью визуальной оценки (см. в общих чертах Ausubel et al., ниже).

[0155] Одним из примеров алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в работе Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализов по алгоритму BLAST общедоступно на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (англ. «National Center for Biotechnology Information»).

[0156] При употреблении в контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый» в общем используется для обозначения таких соединений, материалов, композиций и (или) лекарственных составов, которые с медицинской точки зрения являются подходящими для применения в контакте с тканями, органами и (или) физиологическими жидкостями человека и животных, без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, пропорционально разумному соотношению польза/риск.

[0157] При употреблении в контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» обозначает и включает в себя всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия оболочкой,

антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т. п., являющиеся физиологически совместимыми. Композиция может включать в себя фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания (см., например, работу Berge et al. (1977) *J Pharm Sci* 66: 1 - 19).

[0158] При употреблении в контексте данного документа термины «полипептид», «пептид» и «белок» употребляются взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины применяют к аминокислотным полимерам, в которых один или большее число аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующих встречающихся в природе аминокислот, так же как и к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и к не встречающимся в природе аминокислотным полимерам.

[0159] При употреблении в контексте данного документа термин «профилактика», при использовании в отношении патологического состояния, относится к введению композиции, которая снижает частоту или отсрочивает появление симптомов данного патологического состояния у субъекта по сравнению с субъектом, который не получает данную композицию.

[0160] При употреблении в контексте данного документа термин «очищенный» или «выделенный», при использовании в отношении любого из описанных в данном документе белков (антител или фрагментов), относится к полипептиду, который был отделен или очищен от компонентов (например, белков или других встречающихся в природе биологических или органических молекул), которые естественным образом сопровождают его, например, от других белков, липидов и нуклеиновых кислот в прокариотах, экспрессирующих указанные белки. Как правило, полипептид является очищенным, когда он составляет по меньшей мере 60% (например, по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97% или 99%) по массе от общего белка в образце.

[0161] При употреблении в контексте данного документа термин «реаранжированный» относится к конфигурации локуса тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, при которой сегмент V расположен непосредственно смежно с сегментом D-J или J в конформации, кодирующей по существу полный домен V_H или V_L , соответственно. Реаранжированный локус гена иммуноглобулина можно идентифицировать путем сравнения с ДНК зародышевой линии; реаранжированный локус будет иметь по меньшей мере один перестроенный гептамерный/нонамерный элемент гомологии.

[0162] При употреблении в контексте данного документа термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что данные термины предназначены для обозначения не только конкретной указанной клетки, но и клеток, происходящих из нее. Поскольку некоторые модификации могут произойти в последующих поколениях вследствие мутаций или воздействия окружающей среды, такое потомство не может, по сути, быть идентичным родительской клетке, но тем не менее включено в термин «клетка-хозяин» при употреблении в контексте данного документа.

[0163] При употреблении в контексте данного документа термин «рекомбинантное антитело» включает в себя все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных способов, например: (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека, или полученная из них гибридома; (б) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии данного антитела, например, из трансфектомы; (с) антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител человека; и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или

выделенные любыми другими способами, которые включают в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, в которых используются определенные последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами указанной зародышевой линии, но включающие в себя последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антитела. Как известно в данной области техники (см., например, работу Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9): 1117 - 1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, кодируемый различными генами, которые реаранжируются с образованием антитела, специфичного в отношении чужеродного антигена. В дополнение к реаранжировке, переменная область может быть дополнительно модифицирована путем множественных замен отдельных аминокислот (называемых соматической мутацией или гипермутацией) для повышения аффинности антитела в отношении чужеродного антигена. Константная область изменится при дальнейшем ответе на антиген (т. е. при переключении изотипа). Следовательно, реаранжированные и соматически мутированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина в ответ на антиген, могут не иметь идентичности последовательности с исходными молекулами нуклеиновой кислоты, а вместо этого будут по существу идентичными или подобными (т. е. будут по меньшей мере на 80% идентичны).

[0164] При употреблении в контексте данного документа термин «референсное антитело» (употребляемый взаимозаменяемо с термином «референсное АТ»), или «референсный антигенсвязывающий белок», относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются со специфическим эпитопом на ССR8 и используется для установления взаимосвязи между ним и одним или большим числом различных антител, при этом указанная взаимосвязь представляет собой связывание указанного референсного антитела и указанных одного или большего числа других антител с одним и тем же эпитопом на ССR8. При употреблении в контексте данного документа данный термин обозначает антитело против ССR8, которое можно использовать в тесте или анализе, например таких, как описанные в данном документе (например, анализ конкурентного связывания), в качестве конкурирующей молекулы, при этом указанный анализ пригоден для обнаружения, идентификации или разработки одного или большего числа различных антител, которые связываются с одним и тем же эпитопом.

[0165] При употреблении в контексте данного документа термины «специфическое связывание», «избирательное связывание», «избирательно связывает» и «специфически связывает» относятся к связыванию антитела с эпитопом на заранее определенном антигене. Как правило, связывание антитела характеризуется константой равновесной диссоциации (K_D), равной меньше чем около 10^{-6} М, например, равной меньше чем около 10^{-7} , 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже меньше, при ее определении с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на анализаторе BIACORE™ 2000 с использованием рекомбинантного ССR8 человека в качестве аналита и указанного антитела в качестве лиганда, который связывается с предопределенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, бычьим сывороточным альбумином (БСА), казеином), отличным от указанного предопределенного антигена или близкородственного антигена. В определенных аспектах данного изобретения антитело, которое специфически связывается с ССR8, характеризуется константой равновесной диссоциации (K_D) для данного связывания, равной меньше чем около 100 нМ (10^{-7} М), необязательно – равной меньше чем около 50 нМ (5×10^{-8} М), необязательно – равной меньше чем около 15 нМ ($1,5 \times 10^{-8}$ М), необязательно – равной меньше чем около 10 нМ (10^{-8} М), необязательно – равной меньше чем около 5 нМ (5×10^{-9} М), необязательно – равной

меньше чем около 1 нМ (10^{-9} М), необязательно – равной меньше чем около 0,1 нМ (10^{-10} М), необязательно – равной меньше чем около 0,01 нМ (10^{-11} М) или даже меньше, при ее определении с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на анализаторе BIACORE™ 2000 с использованием рекомбинантного ССR8 человека в качестве анализата и указанного антитела в качестве лиганда, при этом связывание с предопределенным антигеном происходит с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает аффинность связывания указанного антигена с неспецифическим антигеном (например, с БСА, с казеином), отличным от указанного предопределенного антигена или близкородственного антигена. Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное в отношении антигена», употребляются в данном документе взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

[0166] При употреблении в контексте данного документа термин «субъект» включает в себя любого человека или животное, отличное от человека. Например, способы и композиции согласно данному изобретению можно применять для лечения субъекта с иммунным нарушением. Термин «животное, отличное от человека» включает в себя всех позвоночных животных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д.

[0167] Для нуклеиновых кислот термин «существенная гомология» обозначает, что две нуклеиновые кислоты или их указанные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов, по меньшей мере в около 80% нуклеотидов, как правило – по меньшей мере в от около 90% до около 95%, и более предпочтительно – по меньшей мере в от около 98% до около 99,5% нуклеотидов. В качестве альтернативы, существенная гомология существует, когда сегменты будут гибридизироваться в условиях селективной гибридизации с цепью, комплементарной данной цепи.

[0168] Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, общих для данных последовательностей (т. е., % гомологии = число идентичных положений \times 100), принимая во внимание число гэпов и длину каждого гэпа, который должен быть введен для оптимального выравнивания двух данных последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть достигнуто с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах, представленных ниже.

[0169] Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с помощью программы GAP в программном пакете GCG (доступен по адресу: <http://www.gcg.com>), с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и штрафа за открытие гэпа, который равен 40, 50, 60, 70 или 80, и штрафа за длину гэпа, который равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также можно определить с помощью алгоритма Э. Мейерса и У. Миллера (E. Meyers, W. Miller, CABIOS, 4: 11 - 17 (1989)), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за длину гэпа, который равен 12, и штрафа за открытие гэпа, который равен 4. В дополнение к этому, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Нидлмана – Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* (48): 444 - 453 (1970)), который включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен по адресу: <http://www.gcg.com>), с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, штрафа за открытие гэпа, который равен 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, штрафа за длину гэпа, который равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0170] Последовательности нуклеиновых кислот и белков согласно данному изобретению могут быть дополнительно использованы в качестве «запрашиваемой последовательности» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такой поиск можно выполнять с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) согласно Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 10. Для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описанным в данном документе, можно выполнять поиск нуклеотидных последовательностей с помощью BLAST в программе NBLAST, вес = 100, длина слова = 12. Для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков, описанным в данном документе, можно выполнять поиск белков с помощью BLAST в программе XBLAST, вес = 50, длина слова = 3. Для получения выравниваний с гэпами для целей сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в работе Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389 - 3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

[0171] Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «по существу чистой», если она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих соединений, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методик, включая обработку щелочью / додецилсульфатом натрия (ДСН, англ. «SDS»), разделение в CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие методики, хорошо известные в данной области техники. См. работу F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[0172] Композиции нуклеиновых кислот согласно данному изобретению, хотя часто и имеют нативную последовательность (за исключением модифицированных сайтов рестрикции и т. п.), могут быть мутированы либо из кДНК, либо из геномной ДНК, либо из их смесей, в соответствии со стандартными методиками, для получения генных последовательностей. Для кодирующих последовательностей такие мутации могут затрагивать аминокислотную последовательность, если таковое является желательным. В частности, предусмотрены последовательности ДНК, по существу гомологичные или происходящие из нативных последовательностей V, D, J, константных последовательностей, последовательностей-переключателей и других подобных последовательностей, описанных в данном документе (при этом «происходящая из» означает, что данная последовательность идентична другой последовательности или модифицирована из нее).

[0173] Термин «Т-клетка» относится к типу лейкоцитов, которые можно отличить от других лейкоцитов по наличию Т-клеточного рецептора на их клеточной поверхности. Существует несколько субпопуляций Т-клеток, в том числе, но не ограничиваясь ими, Т-клетки-хелперы (также известные как Т_H клетки или CD4⁺ Т-клетки) и их подтипы, в том числе Т_{H1}, Т_{H2}, Т_{H3}, Т_{H17}, Т_{H9} и Т_{FH} клетки, цитотоксические Т-клетки (также известные как Т_C клетки, CD8⁺ Т-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, Т-клетки-киллеры, Т-киллеры), Т-клетки памяти и их подтипы, включая центральные Т-клетки памяти (клетки Т_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (клетки Т_{EM} и Т_{EMRA}) и резидентные Т-клетки памяти (клетки Т_{RM}), регуляторные Т-клетки (также известные как Т_{reg}-клетки или супрессорные Т-клетки) и их подтипы, в том числе CD4⁺ FOXP3⁺ Т_{reg}-клетки, CD4⁺FOXP3⁻ Т_{reg}-клетки, Tr1-клетки, Th3-клетки и Т_{reg17}-клетки, Т-клетки – естественные киллеры (также известные как НКТ-клетки), инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (ТАСО, англ. «MAIT»), и гамма-дельта Т-клетки (γδ Т-клетки), в том числе Vγ9/Vδ2 Т-клетки. Любые одна или большее

число из вышеупомянутых или не упомянутых Т-клеток могут быть целевым типом клеток для способа применения согласно данному изобретению.

[0174] При употреблении в контексте данного документа термин «ответ, опосредованный Т-клетками» относится к любому ответу, опосредованному Т-клетками, включая, но не ограничиваясь ими, эффекторные Т-клетки (например, CD8⁺ клетки) и Т-хелперы (например, CD4⁺ клетки). Ответы, опосредованные Т-клетками, включают в себя, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток.

[0175] При употреблении в контексте данного документа термины «регуляторная Т-клетка», «Т-регуляторная клетка», «Treg», «Treg-клетка» или «T_{reg}» употребляются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к субпопуляции Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и предотвращают аутоиммунные заболевания. Treg-клетки являются иммуносупрессивными и, как правило, вызывают супрессию или подавление индукции и пролиферации эффекторных Т-клеток. Известно, что Treg-клетки направляют лизис эффекторных Т-клеток, способствуют образованию толерогенных дендритных клеток, способствуют образованию макрофагов M2, продуцируют иммуносупрессивные метаболиты и цитокины, служат накопителем ИЛ-2 и способствуют образованию новых сосудов. Несмотря на то, что существует много типов Treg-клеток, многие Treg экспрессируют CD4 и FOXP3, при этом FOXP3 во многих случаях служит маркером для Treg-клеток.

[0176] При употреблении в контексте данного документа термины «терапевтически эффективное количество», или «терапевтически эффективная доза», или аналогичные термины, используемые в данном документе, предназначены для обозначения количества агента (например, антитела против CCR8 или его антигенсвязывающего фрагмента), которое вызовет желаемый биологический или медицинский ответ (например, улучшение одного или большего числа симптомов онкологического заболевания).

[0177] При употреблении в контексте данного документа термины «лечить», «лечит» и «лечение» относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в данном документе. Способы «лечения» включают в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, антитела человека согласно данному изобретению, например, субъекту, нуждающемуся в усиленном иммунном ответе против определенного антигена, или субъекту, у которого в конечном итоге может появиться такое нарушение, чтобы предотвратить, вылечить, отсрочить, уменьшить тяжесть или облегчить один или большее число симптомов указанного нарушения или рецидивирующего нарушения, или чтобы продлить выживание субъекта сверх того периода, который ожидается при отсутствии такого лечения.

[0178] При употреблении в контексте данного документа термин «микроокружение опухоли» (МОО, англ. «TME»; в качестве альтернативы – «микроокружение рака») относится к клеточному окружению или среде, в которой существует опухоль или новообразование, включая окружающие кровеносные сосуды, а также нераковые клетки, включая, но не ограничиваясь ими, клетки иммунной системы, фибробласты, воспалительные клетки костного мозга и лимфоциты. МОО включает в себя также сигнальные молекулы и внеклеточный матрикс. Опухоль и окружающее ее микроокружение тесно связаны и постоянно взаимодействуют. Опухоли могут влиять на микроокружение, высвобождая внеклеточные сигналы, способствуя ангиогенезу опухоли и индуцируя периферическую иммунную толерантность, в то время как клетки иммунной системы в микроокружении могут влиять на рост и развитие опухолевых клеток.

[0179] При употреблении в контексте данного документа термин «вектор» предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с ней соединенную. Один из типов вектора представляет собой «плазмиду» – термин, который обозначает кольцевую двухцепочечную петлю ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другой тип

вектора представляет собой вирусный вектор, при этом дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки хозяина при введении в указанную клетку хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в данном документе называются «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). Как правило, векторы экспрессии, используемые в методиках рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. В описании данного изобретения термины «плазида» и «вектор» могут быть взаимозаменяемы, поскольку плазида является наиболее часто применяемой формой вектора. Тем не менее предусматривается, что данное изобретение включает в себя такие другие формы векторов экспрессии, как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

[0180] Если не определено иное, все технические и научные термины, употребляемые в данном документе, имеют значение, обычно понимаемое рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании данного изобретения. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие документы, указанные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

[0181] Различные аспекты данного изобретения более подробно описаны в нижеследующих подразделах.

II. Композиции согласно данному изобретению

[0182] В определенных аспектах данное изобретение направлено на антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают CCR8 («антитело против CCR8»). В определенных аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 специфически связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR8 человека. Исторически сложилось так, что было очень сложно получить терапевтические антитела против CCR8. Против CCR8, как и против других рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), сложно вырабатывать антитела из-за сильной ассоциации указанных рецепторов с мембраной, отсутствия экспозиции последовательности на клеточной поверхности и трудностей с экспрессией самого полноразмерного белка CCR8. Многочисленные предшествующие попытки использования многих платформ для получения антител потерпели неудачу. (См. также работу Jo and Jung, *Experimental & Molecular Medicine* 48:e207 (2016).) В данном изобретении указанная проблема решается посредством специфического нацеливания на N-концевой внеклеточный домен CCR8 человека. Путем получения антител, специфически нацеленных на N-концевой домен, данное изобретение направлено на создание антител, нацеленных на наиболее длинную внеклеточную часть CCR8. Это позволило получить ранее недостижимые антитела против CCR8. При этом описанные в данном документе антитела способны ингибировать активность CCR8 способом, ранее не описанным. В некоторых аспектах данного изобретения антитела, представленные в данном документе, способны: (a) усиливать иммунный ответ на опухоль; (b) снижать или истощать уровень инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («Treg»), или уничтожать их; (c) индуцировать

интернализацию CCR8 в инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клетках («Treg»); (d) активировать НК-клетки; (e) индуцировать опосредованное НК-клетками уничтожение инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («Treg»); (f) связываться с CCR8 яванской макаки («ЯМ»); (g) связываться с CCR8 человека с показателем KD, равным 10 нМ или меньше, измеренным с помощью анализа BIACORE™; или (h) любая комбинация вышеперечисленного.

[0183] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть дополнительно сконструированы путем удаления одной или большего числа посттрансляционных модификаций. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть сконструированы таким образом, чтобы удалить одну или большее число единиц сахара фукозы. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть модифицированы с целью удаления одной или большего числа единиц сахара фукозы из области Fc (IgG1) антитела. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающая часть являются афукозилированными. В некоторых аспектах данного изобретения удаление одной или большего числа единиц сахара фукозы повышает АЗКЦ указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ антитела против CCR8, модифицированного с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы (например, афукозилированного антитела), по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2,0 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3,0 раза, по меньшей мере в около 3,5 раза, по меньшей мере в около 4,0 раза, по меньшей мере в около 4,5 раза или по меньшей мере в около 5,0 раза выше, чем антитела против CCR8, которое не модифицировано с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы (например, фукозилированного антитела). В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ антитела против CCR8, модифицированного с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы, по меньшей мере в около 3,0 раза выше, чем антитела против CCR8, которое не модифицировано с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ антитела против CCR8, модифицированного с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы, по меньшей мере в около 3,5 раза выше, чем антитела против CCR8, которое не модифицировано с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ антитела против CCR8, модифицированного с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы, по меньшей мере в около 4,0 раза выше, чем антитела против CCR8, которое не модифицировано с целью удаления одного или большего числа единиц сахара фукозы.

[0184] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно индуцировать иммунный ответ на опухоль. Treg-клетки служат для регуляции иммунного ответа, подавляя активность Т-клеток в качестве средства контроля иммунной системы. Инфильтрирующие опухоль Treg-клетки могут предотвращать иммунный ответ, нацеленный на опухоль, тем самым позволяя опухоли избежать разрушения иммунной системой субъекта. Описанные в документе антитела способны ингибировать инфильтрирующие опухоль Treg-клетки, тем самым снижая этот барьер для противоопухолевого иммунного ответа. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 усиливает иммунный ответ на опухоль у субъекта, нуждающегося в этом, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 100%, по меньшей мере на около 150%, по меньшей мере на около 200%, по меньшей мере на около 250%, по меньшей мере на около 300%, по меньшей мере на около 350%, по меньшей мере на около 400%, по меньшей мере на около 450% или по меньшей мере на около 500% по сравнению с иммунным ответом в отсутствие указанного антитела против CCR8.

[0185] Противоопухолевый иммунный ответ можно измерить с использованием любых индикаторов, известных в данной области техники. В некоторых аспектах данного изобретения противоопухолевый иммунный ответ определяют путем сравнения числа инфильтрирующих опухоль Т-клеток (ИОЛ) в образцах опухоли, полученных от субъекта до и после приведения указанной опухоли в контакт с указанным антителом против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения число ИОЛ измеряют с помощью иммуногистохимии или количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР). В некоторых аспектах данного изобретения число ИОЛ в образце опухоли увеличивается по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раз, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раз, по меньшей мере в около 3,5 раза, по меньшей мере в около 4 раз, по меньшей мере в около 4,5 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 15 раз или по меньшей мере в около 20 раз по сравнению с числом ИОЛ в образце опухоли, полученном от субъекта до приведения указанной опухоли в контакт с указанным антителом против CCR8.

[0186] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно снижать или истощать уровень инфильтрирующих опухоль Трег-клеток, или уничтожать их. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 индуцирует истощение уровня инфильтрирующих опухоль Трег-клеток у субъекта после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль Трег-клеток до указанного введения. В некоторых аспектах данного изобретения уровень инфильтрирующих опухоль Трег-клеток истощается по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или по меньшей мере на около 100% по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль Трег-клеток до указанного введения. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 предпочтительно снижает или истощает уровень инфильтрирующих опухоль Трег-клеток, или уничтожает их, по сравнению с периферическими клетками Трег.

[0187] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) у субъекта после введения указанного антитела против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным около 100 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным около 100 мкг/мл или меньше, около 90 мкг/мл или меньше, около 80 мкг/мл или меньше, около 70 мкг/мл или меньше, около 60 мкг/мл или меньше, около 50 мкг/мл или меньше, около 45 мкг/мл или меньше, около 40 мкг/мл или меньше, около 35 мкг/мл или меньше, около 30 мкг/мл или меньше, около 30 мкг/мл или меньше, около 25 мкг/мл или меньше, около 20 мкг/мл или меньше, около 15 мкг/мл или меньше, около 10 мкг/мл или меньше, около 5 мкг/мл или меньше, около 1 мкг/мл или меньше, около 0,5 мкг/мл или меньше, около мкг/мл или меньше, около 0,1 мкг/мл или меньше, или около 0,01 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным около 1 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части. В

некоторых аспектах данного изобретения АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным около 0,1 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части.

[0188] Не ограничиваясь какой-либо теорией или конкретным механизмом, предполагается, что ингибирование передачи сигналов посредством CCR8 в инфильтрирующих опухоль Treg приводит к активации NK-клеток в микроокружении опухоли. Затем активированные NK-клетки способны нацеливаться на инфильтрирующие опухоль Treg и убивать их, снижая их число и усиливая иммунный ответ на данную опухоль. Соответственно, в некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно активировать NK-клетки. В некоторых аспектах данного изобретения NK-клетки активируются в микроокружении опухоли. В некоторых аспектах данного изобретения NK-клетки представляют собой инфильтрирующие опухоль NK-клетки. Активацию NK-клеток можно измерить с использованием любых методик, известных в данной области техники. В некоторых аспектах данного изобретения активацию NK-клеток определяют путем измерения процентного содержания клеток, которые экспрессируют один или большее число маркеров активированных NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения активацию NK-клеток определяют путем измерения процентного содержания клеток в микроокружении опухоли, которые экспрессируют NKp46, но не экспрессируют CD3 (например, клетки NKp46⁺/CD3⁻).

[0189] В некоторых аспектах данного изобретения активация NK-клеток характеризуется повышенной экспрессией одного или большего числа целевых генов NK-клетками. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно индуцировать повышение уровня 4-1BB на поверхности NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно индуцировать повышение уровня ICAM-1 на поверхности NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно индуцировать повышение уровня как 4-1BB, так и ICAM-1 на поверхности NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения уровень 4-1BB и (или) ICAM-1 на поверхности NK-клеток после приведения указанного антитела против CCR8 в контакт с опухолью повышается по меньшей мере в около 1,5 раза, в около 2 раз, в около 2,5 раза, в около 3,0 раза, в около 3,5 раза, в около 4,0 раза, в около 4,5 раза, в около 5 раз, в около 6 раз, в около 7 раз, в около 8 раз, в около 9 раз или в около 10 раз по сравнению с уровнем 4-1BB и (или) ICAM-1 на поверхности NK-клеток в образце опухоли, взятом до указанного приведения в контакт.

[0190] В некоторых аспектах данного изобретения активация NK-клеток характеризуется пониженной экспрессией одного или большего числа целевых генов NK-клетками. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно индуцировать снижение уровня CD16 на поверхности NK-клеток. В некоторых аспектах данного изобретения уровень CD16 на поверхности NK-клеток после приведения указанного антитела против CCR8 в контакт с опухолью снижается по меньшей мере в около 1,5 раза, в около 2 раз, в около 2,5 раза, в около 3,0 раза, в около 3,5 раза, в около 4,0 раза, в около 4,5 раза, в около 5 раз, в около 6 раз, в около 7 раз, в около 8 раз, в около 9 раз или в около 10 раз по сравнению с уровнем CD16 на поверхности NK-клеток в образце опухоли, взятом до указанного приведения в контакт.

[0191] В некоторых аспектах данного изобретения число активированных NK-клеток в микроокружении опухоли снижается по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей

мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или по меньшей мере на около 100% по сравнению с числом активированных НК-клеток в образце опухоли, взятом у субъекта до приведения указанной опухоли в контакт с указанным антителом против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения процентное содержание активированных НК-клеток в микроокружении опухоли снижается по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раз, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раз, по меньшей мере в около 3,5 раза, по меньшей мере в около 4 раз, по меньшей мере в около 4,5 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 15 раз или по меньшей мере в около 20 раз по сравнению с процентным содержанием активированных НК-клеток в образце опухоли, взятом у субъекта до приведения указанной опухоли в контакт с указанным антителом против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно индуцировать опосредованное НК-клетками уничтожение инфильтрирующей опухоль Трег-клеток.

[0192] Описанные в данном документе антитела против CCR8 способны специфически связываться с CCR8 человека. Тем не менее, в некоторых аспектах данного изобретения указанные антитела против CCR8 способны связывать CCR8 животных, отличных от человека. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно специфически связывать CCR8 человека и CCR8 примата, отличного от человека. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 способно связывать CCR8 человека и CCR8 яванской макаки (ЯМ). В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с более высокой аффинностью, чем CCR8, происходящий не от человека (например, CCR8 ЯМ). В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека, но не связывает CCR8 ЯМ.

[0193] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с равновесной константой диссоциации (K_D), равной около 100 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 50 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 25 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 20 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 15 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 10 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 5 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 1 нМ или меньше. В некоторых аспектах данного изобретения K_D измеряется с помощью анализа BIACORE™. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 10 нМ или меньше, как измерено с помощью анализа BIACORE™. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8 человека с K_D , равной около 1 нМ или меньше, как измерено с помощью анализа BIACORE™.

[0194] Ингибирование CCR8 представленными в данном документе антителами и их антигенсвязывающими частями может происходить по любому механизму. Без привязки к какому-либо конкретному механизму: в некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 индуцирует интернализацию CCR8 инфильтрирующими опухоль Трег-клетками. Интернализация рецептора CCR8 с поверхности устраняет способность указанного рецептора связывать свой лиганд и усиливать внутриклеточную передачу

сигналов, эффективно ингибируя активность CCR8 в инфильтрирующих опухоль Treg-клетках. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает CCR8, экспрессируемый инфильтрирующими опухоль Treg-клетками.

[0195] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 блокирует взаимодействие между CCR8 и его лигандом, например, посредством стерических затруднений, изменения конформации, интернализации рецептора CCR8 или любой их комбинации. В некоторых аспектах данного изобретения связывание указанного антитела против CCR8 с N-концевым внеклеточным доменом CCR8 ингибирует способность рецептора CCR8 взаимодействовать с G-белком, например, посредством конформационного изменения и (или) посредством интернализации рецептора CCR8.

II.A. Эпитопы

[0196] Описанные в данном документе антитела специфически связываются с N-концевым внеклеточным доменом CCR8 или его фрагментом. N-концевой внеклеточный домен CCR8 человека обычно определяется как состоящий из аминокислот 1 - 35 полноразмерной последовательности CCR8 (например, аминокислот 1 - 35 из последовательности с SEQ ID NO: 171) (см. uniprot.org/uniprot/P51685). Аминокислотная последовательность N-концевого внеклеточного домена CCR8 человека включает в себя аминокислотную последовательность MDYTLDSLVTTVTDYYPDIFSSPCDAELIQTNGK (SEQ ID NO: 172).

[0197] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с по меньшей мере одним, с по меньшей мере двумя, с по меньшей мере тремя, с по меньшей мере четырьмя, с по меньшей мере пятью, с по меньшей мере шестью, с по меньшей мере семью, с по меньшей мере восемью, с по меньшей мере девятью или с по меньшей мере десятью аминокислотами в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека, например, как указано в последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанные по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять аминокислот в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека, например, как указано в последовательности с SEQ ID NO: 172 являются примыкающими друг к другу. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с по меньшей мере одним, с по меньшей мере двумя, с по меньшей мере тремя, с по меньшей мере четырьмя, с по меньшей мере пятью, с по меньшей мере шестью, с по меньшей мере семью, с по меньшей мере восемью, с по меньшей мере девятью или с по меньшей мере десятью примыкающими друг к другу аминокислотами в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека, например, как указано в последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанные по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять аминокислот в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека, например, как указано в последовательности с SEQ ID NO: 172 не являются примыкающими друг к другу. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает по меньшей мере одну аминокислоту в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека и по меньшей мере одну аминокислоту CCR8 человека, которая не находится в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека.

[0198] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 1 - 10 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число

содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 15 - 30 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 15 - 35 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 20 - 25 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 20 - 30 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 20 - 35 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 25 - 30 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 25 - 35 из последовательности с SEQ ID NO: 172. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывается с эпитопом CCR8 человека, содержащим одну или большее число аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 30 - 35 из последовательности с SEQ ID NO: 172.

[0199] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 связывает эпитоп на CCR8 человека, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 180 - 200.

II.B. Последовательности антител

[0200] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит целое антитело, например, антитело, содержащее два полипептида легкой цепи и два полипептида тяжелой цепи. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит фрагмент целого антитела, который сохраняет способность связывать CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 представляет собой одноцепочечное антитело. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 представляет собой фрагмент Fd. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 представляет собой фрагмент Fab. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 представляет собой фрагмент F(ab')₂. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 выбрано из интратела, минитела, триатела или диатела.

[0201] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL). В некоторых аспектах данного изобретения указанная VH содержит область, определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH; и указанная VL содержит CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 2A. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 201. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VH содержит аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 202. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 203. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 204.

Таблица 2А: консенсусные последовательности CDR1 VH

SEQ ID NO:	Консенсусная последовательность CDR1 VH
201	(S/D/G/A)Y(Y/A/T)M(H/L/N)
202	(D/G/A)Y(A/T)M(H/L/N)
203	(G/A)YTM(L/N)
204	(S/D)Y(Y/A)MH

Примечание: аминокислотный остаток, указанный в скобках выше (и в любой другой части данного документа), обозначает аминокислоту в этом конкретном положении в альтернативном варианте. Например, Y(Y/A)MH означает, что данная последовательность может представлять собой YYMH *или* YAMH.

[0202] В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 2В. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 205. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 206. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 207. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 208.

Таблица 2В: консенсусные последовательности CDR2 VH

SEQ ID NO:	Консенсусная последовательность CDR2 VH
205	(I/G/A)I(N/S/T)(P/W/A)(S/N)(G/S)G(S/R)(T/I)(S/G/Y)YA(Q/D)(K/S)(F/V)(Q/K)G
206	AI(T/S)ASGGRTYYADSVKG
207	(G/A)I(T/S)(W/A)(N/S)(S/G)G(S/R)(I/T)(G/Y)YADSVKG
208	(I/G)I(N/S)(P/W)(S/N)(G/S)GS(T/I)(S/G)YA(Q/D)(K/S)(F/V)(Q/K)G

[0203] В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 2С. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 209. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 210.

Таблица 2С: консенсусные последовательности CDR3 VH

SEQ ID NO:	Консенсусная последовательность CDR3 VH
209	(A/G)V(R/G)N(R/G)FRFDY
210	GR(K/V/D/E/R)SYR(D/E/K/V)SLRFDY

[0204] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 201, CDR2 VH, имеющую

указанную в SEQ ID NO: 216. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 217. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 218. В некоторых аспектах данного изобретения CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 219.

Таблица 3А: консенсусные последовательности CDR1 VL

SEQ ID NO:	Консенсусная последовательность CDR1 VL
211	SSY(T/A)G(N/S/P)(I/R/V/S)(N/V/T)(L/-)(P/F/Y/H)VV
212	SSY(T/A)G(N/S)(I/R/S)(N/V/T)(L/-)(P/F/Y/H)VV
213	SSYAGSST(F/Y)VV
214	SSYAGS(R/I)(V/T)(F/H)VV
215	(A/G)(T/A)WD(Y/S)SL(T/R)(A/M)(V/W)V
216	(A/G)(T/A)WD(Y/S)SL(T/R/S)(A/M)(V/W)V
217	(A/G)TWD(Y/S)SL(T/S)A(V/W)V
218	G(A/T)WDSSL(R/S)(M/A)WV
219	(S/T)G(S/T)(G/S)SNIG(N/K)N(Y/F)VS

[0206] В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 3В. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 220. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 221. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 222. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 223. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 224. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 225. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 226. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 227. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 228. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 229. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 230. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 231. В некоторых аспектах данного изобретения CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 232.

Таблица 3В: консенсусные последовательности CDR2 VL

SEQ ID NO:	Консенсусная последовательность CDR2 VL
220	E(V/A)(N/T/I/S)KRPS

221	E(V/A)(N/T/S)KRPS
222	EV(T/S)KRPS
223	E(A/V)TKRPS
224	EV(N/S)KRPS
225	EV(N/T)KRPS
226	DN(D/T)(K/R)PS
227	DN(D/T/N)(K/R)RPS
228	DN(D/N)KRPS
229	DN(T/N)(K/R)RPS
230	D(N/D)(D/T/N)(K/R)RPS
231	D(N/D)(D/N)KRPS
232	D(N/D)(T/N)(K/R)RPS

[0207] В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 3С. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 233. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 234. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 235. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 236. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 236. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 236. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 237. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 238. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 239. В некоторых аспектах данного изобретения CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 240.

Таблица 3С: консенсусные последовательности CDR3 VL

SEQ ID NO:	Консенсусная последовательность CDR3 VL
233	SSY(T/A)G(N/S/P)(I/R/V/S)(N/V/T)(L/-)(P/F/Y/H)VV
234	SSY(T/A)G(N/S)(I/R/S)(N/V/T)(L/-)(P/F/Y/H)VV
235	SSYAGSST(F/Y)VV
236	SSYAGS(R/I)(V/T)(F/H)VV
237	(A/G)(T/A)WD(Y/S)SL(T/R)(A/M)(V/W)V
238	(A/G)(T/A)WD(Y/S)SL(T/R/S)(A/M)(V/W)V
239	(A/G)TWD(Y/S)SL(T/S)A(V/W)V
240	G(A/T)WDSSL(R/S)(M/A)WV

аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит мутантную константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит мутантную константную область тяжелой цепи IgG4. В некоторых аспектах данного изобретения указанная мутантная константная область тяжелой цепи IgG4 содержит любую из замен S228P, L235E, L235A или их комбинацию, в соответствии с системой нумерации ЕС.

[0253] В некоторых аспектах данное изобретение направлено на антитело или его антигенсвязывающую часть, которые связываются по существу с тем же эпитопом на CCR8 человека, что и антитело против CCR8, представленное в любом из указанных выше аспектов. В некоторых аспектах данного изобретения представлены антитело или его антигенсвязывающая часть, которые перекрестно конкурируют за связывание с CCR8 человека, как и антитело против CCR8, представленное в любом из указанных выше аспектов.

[0254] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит измененную константную область тяжелой цепи, которая обладает модифицированной эффекторной функцией по сравнению с соответствующей неизменной константной областью. Эффекторные функции, связанные с константной областью антитела против CCR8, можно модулировать путем изменения свойств константной области или области Fc. Измененные эффекторные функции включают в себя, например, модулирование одной или большего числа из следующих функций: антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ), апоптоз, связывание с одним или большим числом Fc-рецепторов и провоспалительные реакции. Модуляция обозначает повышение, снижение или устранение активности эффекторной функции, проявляемой рассматриваемым антителом, содержащим измененную константную область, по сравнению с активностью неизменной формы константной области. В конкретных аспектах данного изобретения модуляция включает в себя ситуации, в которых активность отключена или полностью отсутствует.

[0255] В одном аспекте данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит константную область тяжелой цепи IgG4. В одном аспекте данного изобретения указанная константная область тяжелой цепи IgG4 представляет собой константную область тяжелой цепи IgG4 дикого типа. В другом аспекте данного изобретения указанная константная область IgG4 содержит мутацию, например, одну или обе из S228P и L235E или L235A, например, в соответствии с системой нумерации ЕС (Kabat, EA, et al., см. выше). В одном аспекте данного изобретения антитело против CCR8, описанное в данном документе, содержат константную область IgG1. В одном аспекте данного изобретения указанная константная область тяжелой цепи IgG1 представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1 дикого типа. В другом аспекте данного изобретения указанная константная область тяжелой цепи IgG1 содержит мутацию.

[0256] Измененная константная область с измененной аффинностью связывания с FcR и (или) активностью АЗКЦ, и (или) измененной активностью КЗЦ представляет собой полипептид, который имеет либо повышенную, либо пониженную активность связывания с FcR и (или) активностью АЗКЦ, и (или) активностью КЗЦ, по сравнению с неизменной формой указанной константной области. Измененная константная область, которая проявляет повышенное связывание с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с более высокой аффинностью, чем неизменный полипептид. Измененная константная область, которая проявляет сниженное связывание с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с более низкой аффинностью, чем неизменная форма указанной константной области. Такие варианты, которые проявляют сниженное связывание с FcR, могут проявлять незначительное связывание с FcR или вообще не проявлять заметного связывания с FcR, например, проявляют от 0% до 50% (например, меньше чем 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11,

10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) связывания с FcR по сравнению с уровнем связывания с FcR нативной последовательности константной области иммуноглобулина или области Fc. Подобным образом измененная константная область, которая проявляет модулированную активность АЗКЦ и (или) КЗЦ, может проявлять либо повышенную, либо сниженную активность АЗКЦ и (или) КЗЦ по сравнению с неизменной константной областью.

[0257] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 проявляет повышенную эффекторную функцию. В некоторых аспектах данного изобретения антитело против CCR8 содержит гибридную константную область или ее часть, такую как гибридная константная область G2/G4 (см., например, работы Burton et al. (1992) *Adv Immun* 51: 1 - 18; Canfield et al. (1991) *J Exp Med* 173: 1483 - 1491; и Mueller et al. (1997) *Mol Immunol* 34 (6): 441 - 452).

[0258] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 содержит измененную константную область, проявляющую повышенную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Модуляция активности КЗЦ может быть достигнута путем введения одной или большего числа аминокислотных замен, вставок или делеций в участок Fc данного антитела. См., например, патент США № 6194551. В качестве альтернативы или в дополнение, в область Fc может (могут) быть введен (-ы) остаток (-ки) цистеина, тем самым обеспечивая образование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность к интернализации и (или) повышенную активность комплемент-опосредованного уничтожения клеток. См., например, работы Caron et al. (1992) *J Exp Med* 176: 1191 - 1195 and Shopes (1992) *Immunol* 148: 2918 - 2922; международные патентные публикации PCT № WO 99/51642 и WO 94/29351; работы Duncan and Winter (1988) *Nature* 322: 738 - 40; и патенты США № 5648260 и № 5624821.

[0259] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 представляет собой биспецифическое антитело, привлекающий Т-клетки биспецифический активатор (BiTE), мультиспецифическое антитело, бипаратопное антитело, иммуноконъюгат, конъюгат антитело – лекарственный препарат или любую их комбинацию.

И.С. Варианты антител и иммуноконъюгаты

[0260] В определенных аспектах данное изобретение направлено на антитела, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая связывается с CCR8 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывает второй антиген, при этом указанная первая антигенсвязывающая область содержит антитело против CCR8, описанное в данном документе. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело, например, способное связывать только два антигена. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, например, способное связывать больше чем два антигена. В некоторых аспектах данного изобретения указанное мультиспецифическое антитело способно связывать по меньшей мере около 3 антигенов, по меньшей мере около 4 антигенов, по меньшей мере около 5 антигенов или по меньшей мере около 6 антигенов.

[0261] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело представляет собой бипаратопное антитело. Бипаратопные антитела способны связывать два эпитопа на одном целевом полипептиде. В некоторых аспектах данного изобретения указанное бипаратопное антитело содержит первую антигенсвязывающую область и вторую антигенсвязывающую область, при этом указанная первая

антигенсвязывающая область и (или) указанная вторая антигенсвязывающая область содержат представленное в данном документе антитело против CCR8.

[0262] В некоторых аспектах данного изобретения указанное мультиспецифическое антитело представляет собой привлекающий Т-клетки биспецифический активатор (BiTE). Конструкции BiTE содержат первую антигенсвязывающую область, которая связывает рецептор CD3 на Т-клетке, и вторую антигенспецифическую связывающую область. В некоторых аспектах данного изобретения указанный BiTE содержит первую антигенсвязывающую область, которая связывает CD3, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывает CCR8 человека, при этом указанная вторая антигенсвязывающая область содержит представленное в данном документе антитело против CCR8.

[0263] В некоторых аспектах данного изобретения указанное биспецифическое антитело, указанное мультиспецифическое антитело, указанный BiTE или указанное бипаратопное антитело содержат первую CDR1 VH, первую CDR2 VH и первую CDR3 VH; первый домен VL, содержащий первую CDR1 VL, первую CDR2 VL и первую CDR3 VL; второй домен VH, содержащий вторую CDR1 VH, вторую CDR2 VH и вторую CDR3 VH; и второй домен VL, содержащий вторую CDR1 VL, вторую CDR2 VL и вторую CDR3 VL; при этом: (a) указанная первая CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 45, 105, 115, 135 и 145; (b) указанная первая CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 46, 106, 116, 136 и 146; и (c) указанная первая CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 47, 107, 117, 137 и 147. В некоторых аспектах данного изобретения указанная первая CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 48, 108, 118, 138 и 148; (b) указанная первая CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 49, 109, 119, 139 и 149; и (c) указанная первая CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 50, 110, 120, 140 и 150.

[0264] В некоторых аспектах данного изобретения: (a) указанная CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 55, 65, 75, 85, 95, 125, 155 и 165; (b) указанная CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 56, 66, 76, 86, 96, 126, 156 и 166; и (c) указанная CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 67, 77, 87, 97, 127, 157 и 167. В некоторых аспектах данного изобретения: (a) указанная CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 58, 68, 78, 88, 98, 128, 158 и 168; (b) указанная CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 59, 69, 79, 89, 99, 129, 159 и 169; и (c) указанная CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 130, 160 и 170.

[0265] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело представляет собой бипаратопное антитело и: (a) указанная вторая CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 55, 65, 75, 85, 95, 125, 155 и 165;

(b) указанная вторая CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 56, 66, 76, 86, 96, 126, 156 и 166; и (c) указанная вторая CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 67, 77, 87, 97, 127, 157 и 167. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело представляет собой бипаратопное антитело и: (a) указанная вторая CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 58, 68, 78, 88, 98, 128, 158 и 168; (b) указанная вторая CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 59, 69, 79, 89, 99, 129, 159 и 169; и (c) указанная вторая CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 130, 160 и 170.

[0266] В определенных аспектах данное изобретение направлено на иммуноконъюгат, содержащий представленное в данном документе антитело против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения указанный иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело – лекарственный препарат. Указанный иммуноконъюгат может включать в себя любой цитотоксический агент, известный в данной области техники, связанный с представленным в данном документе антителом против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения указанный конъюгат антитело – лекарственный препарат содержит цитотоксический агент, выбранный из группы, состоящей из майтансиноида (например, майтансина), доластатина, лекарственного препарата – аналога ауристатиона, криптофицина, производного дуокармицина (например, аналога СС-1065 и дуокармицина), эндиинового антибиотика (например, эсперамицина и калихеамицина), пиролобенодиазепина (ПБД, англ. «PBD») и любой их комбинации. Конъюгат антитело – лекарственный препарат, содержащий антитело против CCR8 и цитотоксический агент, может обеспечивать эффективность при опухолевых показаниях с небольшим числом эффекторных клеток, включая NK-клетки и макрофаги.

II.D. Варианты области Fc

[0267] В определенных вариантах осуществления данного изобретения в область Fc представленного в данном документе антитела можно внести одну или большее число аминокислотных модификаций, создавая тем самым вариант области Fc. Вариант области Fc может содержать последовательность области Fc человека (например, области Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или большем числе аминокислотных положений.

[0268] В определенных вариантах осуществления данного изобретения представлен вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми, эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для практических применений, в которых важное значение имеет период полужизни антитела *in vivo*, но отдельные эффекторные функции (такие как реакции системы комплемента и АЗКЦ) являются ненужными или вредными. Для подтверждения снижения/ослабления активности КЗЦ и (или) АЗКЦ можно выполнить анализ цитотоксичности *in vitro* и (или) *in vivo*. Например, чтобы убедиться в отсутствии связывания антитела с FcR (и, следовательно, в отсутствии активности АЗКЦ) при сохранении способности связывания с FcR_n, можно выполнить анализ связывания рецептора Fc (FcR). Первичные клетки для опосредования АЗКЦ – NK-клетки – экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Краткая информация об экспрессии FcR на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457 - 492 (1991). Неограничивающие

примеры анализов *in vitro* для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, работы Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059 - 7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499 - 1502 (1985); в патенте США № 5821337 (см. работу Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351 - 1361 (1987)). В качестве альтернативы, могут быть использованы нерадиоактивные способы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТІ™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc., г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, г. Мадисон, штат Висконсин, США). В качестве эффекторных клеток в таких анализах можно использовать мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и клетки – естественные киллеры (НК-клетки). В качестве альтернативы или в дополнение, активность АЗКЦ представляющей интерес молекулы можно оценить в условиях *in vivo*, например, в животной модели, такой как модель, представленная в работе Clunes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652 - 656 (1998). Чтобы подтвердить, что антитело не способно связывать С1q и, следовательно, не обладает активностью КЗЦ, можно выполнить анализы связывания С1q. См., например, ТИФА для связывания С1q и С3с в международных патентных публикациях WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно выполнить анализ КЗЦ (см., например, работы Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101: 1045 - 1052 (2003); и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103: 2738 - 2743 (2004)). Определения связывания FcRn и клиренса/полужизни в условиях *in vivo* также можно проводить с помощью способов, известных в данной области техники (см., например, работу Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18 (12): 1759 - 1769 (2006)).

[0269] Антитела со сниженной эффекторной функцией включают в себя те, которые содержат замены одного или большего числа остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 из области Fc (патент США № 6737056). Такие мутантные Fc включают в себя мутантные Fc с заменами в двух или большем числе положений аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемую мутантную Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 аланином (патент США № 7332581).

[0270] Описаны определенные варианты антител с усиленным или ослабленным связыванием с FcR. (См., например, патент США № 6737056; международную патентную публикацию WO 2004/056312 и работу Shields et al., J. Biol. Chem. 9 (2): 6591 - 6604 (2001).)

[0271] В определенных вариантах осуществления данного изобретения вариант антитела содержит область Fc с одной или большим числом аминокислотных замен, которые улучшают АЗКЦ, например, с заменами в положениях 298, 333 и (или) 334 области Fc (нумерация остатков по системе EU).

[0272] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения изменения произведены в области Fc, что привело к изменению (то есть либо к улучшению, либо к ухудшению) связывания С1q и (или) комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), например, как описано в патенте США № 6194551, международной патентной публикации WO 99/51642 и работе Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178 - 4184 (2000).

[0273] Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)), описаны в патентной публикации US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Указанные антитела содержат область Fc с одной или большим числом замен, которые улучшают связывание указанной области Fc с FcRn. Такие варианты Fc включают в себя варианты с заменами в одном или большем числе остатков в области Fc: 238, 252, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340,

356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, с заменой остатка 434 в области Fc (например, патент США № 7371826).

[0274] См. также работу Duncan & Winter, Nature 322: 738 - 40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и международную патентную публикацию WO 94/29351 касательно других примеров вариантов области Fc.

[0275] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлено антитело, изотип которого представляет собой IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлено антитело, изотип которого представляет собой IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлено антитело, изотип которого представляет собой IgG4 человека, в котором присутствует единственная мутация – серин 228 на пролин (S228P). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлено антитело, изотип которого представляет собой IgG4 человека, в котором присутствуют две мутации – серин 228 на пролин (S228P) и лейцин 235 на глутамат (L235E). Согласно данным литературы, мутация S228P встречается в положении 228, однако точное местоположение данной мутации в антителе может варьировать в зависимости от того, как получено такое антитело.

II.E. Химерные антигенные рецепторы (ХАР) и Т-клеточные рецепторы (ТКР)

[0276] В определенных аспектах данное изобретение направлено на химерный антигенный рецептор (ХАР), содержащий антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR8 человека. В некоторых аспектах данного изобретения указанная антигенсвязывающая область содержит антитело против CCR8, представленное в данном документе, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают тот же эпитоп, что и антитело против CCR8, представленное в данном документе. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ХАР дополнительно содержит трансмембранный домен. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ХАР дополнительно содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ХАР дополнительно содержит шарнирную область и (или) спейсерную область.

[0277] В определенных аспектах данное изобретение направлено на Т-клеточный рецептор (ТКР), содержащий антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR8 человека. В некоторых аспектах данного изобретения указанная антигенсвязывающая область содержит антитело против CCR8, представленное в данном документе, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают тот же эпитоп, что и антитело против CCR8, представленное в данном документе. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ТКР дополнительно содержит трансмембранный домен. В некоторых аспектах данного изобретения указанный ТКР дополнительно содержит внутриклеточный сигнальный домен.

II.F. Молекулы нуклеиновых кислот, векторы и клетки

[0278] В определенных аспектах данное изобретение направлено на молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют представленные в данном документе антитела против CCR8. Указанные нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «по существу чистой», если она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих соединений, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая в природных условиях

связана с данной выделенной ДНК) или белков, с помощью стандартных методик, включая обработку щелочью / ДСН, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, обработку рестрикционными ферментами, электрофорез в агарозном геле и другие методики, хорошо известные в данной области техники. См. работу F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Описанная в данном документе нуклеиновая кислота может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может содержать или не содержать интронные последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

[0279] Описанные в данном документе нуклеиновые кислоты могут быть получены с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как описано ниже), кДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи указанного антитела, полученного с помощью указанной гибридомы, могут быть получены с помощью стандартных методик ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки иммуноглобулиновых генов (например, с использованием методик фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело, может быть извлечена из указанной библиотеки.

[0280] В некоторых аспектах данного изобретения указанные нуклеиновые кислоты могут дополнительно кодировать сигнальный пептид.

[0281] Описанные в данном документе молекулы нуклеиновых кислот могут быть модифицированы с целью удаления конкретных последовательностей, например, последовательностей, распознаваемых рестрикционными ферментами, или с целью оптимизации кодонов.

[0282] Способ получения представленного в данном документе антитела против CCR8 может включать в себя экспрессию тяжелых цепей и легких цепей в клеточной линии, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие указанные тяжелые и легкие цепи с сигнальным пептидом. Клетки-хозяева, содержащие такие нуклеотидные последовательности, включены в данный документ.

[0283] После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты VH и VL, указанными фрагментами ДНК можно дополнительно манипулировать с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов варибельной области в гены полноразмерных цепей антител, в гены фрагментов Fab или в ген scFv. В указанных манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий VL или VH, функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. При употреблении в контексте данного документа термин «функционально связанный» предназначен для обозначения того, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые данными двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке считывания.

[0284] Выделенная ДНК, кодирующая область VH, может быть преобразована в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального связывания ДНК, кодирующей данную VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и (или) CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие указанные области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Указанная константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например, область IgG1. Для гена тяжелой цепи фрагмента Fab ДНК, кодирующая VH, может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область тяжелой цепи CH1.

[0285] Выделенная ДНК, кодирующая область VL, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания ДНК, кодирующей VL, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи – CL. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие указанные области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда.

[0286] Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)₃, таким образом, что последовательности VH и VL могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями VL и VH, соединенными гибким линкером (см., например, работы Bird et al., (1988) *Science* 242: 423 - 426; Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879 - 5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348: 552 - 554).

[0287] В данном документе также представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности VH и VL, которые гомологичны таковым из представленных в данном документе антител против CCR8. Иллюстративные молекулы нуклеиновых кислот кодируют последовательности VH и VL, которые по меньшей мере на 70% идентичны, например, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичны молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим последовательности VH и VL, описанные в данном документе. Также в данном документе представлены молекулы нуклеиновых кислот с консервативными заменами (т. е. заменами, которые не изменяют возникающую в результате аминокислотную последовательность при трансляции молекулы нуклеиновой кислоты), например, для оптимизации кодонов.

[0288] Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие области VH и (или) VL антител против CCR8, например, антител против CCR8, описанных в данном документе, при этом указанные нуклеиновые кислоты содержат нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, кодирующих области VH и (или) VL антител против CCR8, описанных в данном документе.

[0289] Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь и (или) легкую цепь антител против CCR8, например, антител против CCR8, описанных в данном документе, при этом указанные нуклеиновые кислоты содержат нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, кодирующих тяжелую цепь и (или) легкую цепь антител против CCR8, описанных в данном документе.

[0290] В определенных аспектах данное изобретение направлено на векторы, содержащие представленную в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор выбран из вирусного вектора, вектора млекопитающих и бактериального вектора. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор представляет собой вирусную частицу или вирус. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор представляет собой вектор млекопитающего. В некоторых аспектах данного изобретения вектор указанный представляет собой бактериальный вектор.

[0291] В некоторых аспектах данного изобретения указанный вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, лентивируса, вируса Сендай, бакуловирусного вектора,

вектора вируса Эпштейна – Барр, паповавирусного вектора, вектора вируса осповакцины, вектора вируса простого герпеса и вектора аденоассоциированного вируса (AAV). В конкретных аспектах данного изобретения указанный вектор представляет собой вектор AAV. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор представляет собой лентивирус. В конкретных аспектах данного изобретения указанный вектор представляет собой вектор AAV. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор представляет собой вирус Сендай. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор представляет собой гибридный вектор. Примеры гибридных векторов, которые можно использовать в данном изобретении, можно найти в работе Huang and Kamihira, *Biotechnol. Adv.* 31 (2): 208 - 23 (2103), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0292] В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор дополнительно содержит один или большее число регуляторных элементов, включая, но не ограничиваясь ими, один или большее число энхансеров, промоторов, последовательностей связывания миРНК, полиА-последовательностей, интронных последовательностей, акцепторных сайтов сплайсинга и любую комбинацию вышеперечисленного. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор содержит тканеспецифический энхансер. В некоторых аспектах данного изобретения указанный вектор содержит тканеспецифический промотор.

[0293] В определенных аспектах данное изобретение направлено на клетки, например, клетки-хозяева, содержащие представленное в данном документе антитело против ССR8, представленное в данном документе биспецифическое антитело, представленный в данном документе ViTE, представленное в данном документе мультиспецифическое антитело, представленное в данном документе бипаратопное антитело, представленный в данном документе XAP, представленный в данном документе ТКР, представленную в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты или представленный в данном документе вектор. Указанная клетка может представлять собой клетку любого типа. В некоторых аспектах данного изобретения указанная клетка выбрана из клетки млекопитающего, клетки бактерии, клетки насекомого, клетки растения и клетки дрожжей. В некоторых аспектах данного изобретения указанная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки *E. coli*, клетки гриба, такого как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, клетки насекомого, такой как SF9, клеточных линий млекопитающих (например, клеточных линий человека) и первичной клеточной линии.

[0294] В некоторых аспектах данного изобретения указанная клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку. В некоторых аспектах данного изобретения указанная клетка представляет собой Т-клетку. Таким образом, в определенных аспектах данное изобретение направлено на иммунокомпетентную клетку, например, Т-клетку, содержащую представленный в данном документе XAP или представленный в данном документе ТКР.

II.G. Фармацевтические композиции

[0295] В определенных аспектах данного изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против ССR8 вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и (или) адьювантом.

[0296] В определенных аспектах данного изобретения приемлемые материалы для лекарственных составов предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях. В некоторых аспектах данного изобретения материал (-ы) для лекарственных составов предназначен (-ы) для п/к и (или) в/в введения. В определенных аспектах данного изобретения фармацевтическая композиция может содержать материалы для лекарственных составов для модифицирования, поддержания или сохранения,

например, уровня pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проницаемости указанной композиции. В определенных аспектах данного изобретения подходящие материалы включают в себя, но не ограничиваются ими, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные агенты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемообразующие агенты (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, англ. «EDTA»)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); полипептиды с низкой молекулярной массой; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенилэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерол, тилоксапол); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно – хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); носители; разбавители; эксципиенты и (или) фармацевтические адьюванты. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)). В некоторых аспектах данного изобретения лекарственный состав содержит ФСБ; 20 мМ ацетата натрия, pH 5,2, 50 мМ NaCl; и (или) 10 мМ ацетата натрия, pH 5,2, 9% сахарозы. В определенных аспектах данного изобретения оптимальная фармацевтическая композиция определяется специалистом в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формы доставки и необходимой дозы. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, как указано выше. В определенных аспектах данного изобретения такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и (или) скорость выведения *in vivo* указанного антигена против ССR8.

[0297] В определенных аспектах данного изобретения основная несущая среда или носитель в фармацевтической композиции могут быть по своей природе как водными, так и неводными. Например, в определенных аспектах данного изобретения пригодная несущая среда или носитель могут представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную спинномозговую жидкость, возможно, дополненные другими материалами, часто применяемыми в композициях для парентерального введения. В определенных аспектах данного изобретения физиологический раствор включает в себя изотонический фосфатно-солевой буфер. В определенных аспектах данного изобретения дополнительными иллюстративными носителями являются нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В определенных аспектах данного изобретения фармацевтические композиции содержат Трис-буфер с pH около 7,0-8,5 или ацетатный буфер с pH около 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных аспектах данного изобретения композиции, содержащие антиген против ССR8, могут быть подготовлены для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей необходимую степень чистоты, с

оптимальными агентами для лекарственного состава (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, как указано выше) в форме лиофилизированной массы или водного раствора. Кроме того, в определенных аспектах данного изобретения композицию, содержащую антитело против CCR8, можно составить в виде лиофилизата, используя соответствующие эксципиенты, такие как сахароза.

[0298] В определенных аспектах данного изобретения фармацевтические композиции могут быть выбраны для парентеральной доставки. В определенных аспектах данного изобретения композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, пероральной доставки. Приготовление таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники.

[0299] В определенных аспектах данного изобретения компоненты лекарственного состава предпочтительно находятся в концентрациях, которые являются приемлемыми с учетом конкретного места введения. В определенных аспектах данного изобретения применяют буферы для поддержания в композиции физиологического уровня pH или немного более низкого уровня pH, как правило, в пределах диапазона pH от около 5 до около 8.

[0300] В определенных аспектах данного изобретения, если предусмотрено парентеральное введение, терапевтические композиции могут находиться в форме апиrogenного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего антитело против CCR8 и фармацевтически приемлемый носитель. В определенных аспектах данного изобретения носитель для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которую добавлено антитело против CCR8, в виде стерильного изотонического раствора с надлежащим консервантом. В определенных аспектах данного изобретения препарат может включать в себя готовый лекарственный состав необходимой молекулы с агентом, таким как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может доставляться посредством депонированной инъекции. В определенных аспектах данного изобретения также можно использовать гиалуроновую кислоту, действие которой состоит в обеспечении продления периода нахождения в циркуляции. В определенных аспектах данного изобретения можно использовать имплантируемые устройства доставки лекарственного препарата для введения необходимой молекулы.

[0301] В определенных аспектах данного изобретения фармацевтическая композиция составлена для ингаляции. В определенных аспектах данного изобретения антитело против CCR8 может быть составлено в виде сухого порошка для ингаляции. В определенных аспектах данного изобретения раствор для ингаляции, содержащий антитело против CCR8, может быть составлен с пропеллентом для аэрозольной доставки. В определенных аспектах данного изобретения растворы могут быть небулизированными. Ингаляционное введение дополнительно описано в международном патентном документе № PCT/US94/001875, который описывает ингаляционное введение химически модифицированных белков.

[0302] В определенных аспектах данного изобретения предполагается, что лекарственные составы можно вводить перорально. В определенных аспектах данного изобретения антитело против CCR8, которое вводят таким образом, можно составить с или без носителей, обычно применяемых при составлении твердых дозированных лекарственных форм, таких как таблетки или капсулы. В определенных аспектах данного изобретения капсула может быть разработана так, чтобы высвобождение активной части лекарственного состава происходило в точке желудочно-кишечного тракта, в которой биодоступность максимальна, а пресистемная деградация минимальна. В определенных аспектах данного изобретения может быть добавлен

по меньшей мере один дополнительный агент для облегчения абсорбции антитела против CCR8. В определенных аспектах данного изобретения можно также применять разбавители, ароматизаторы, тугоплавкие воски, растительные масла, смазывающие агенты, суспендирующие агенты, агенты для улучшения распадаемости таблеток и связующие агенты.

[0303] В определенных аспектах данного изобретения фармацевтическая композиция может включать в себя эффективное количество антитела против CCR8 в смеси с нетоксичными эксципиентами, которые подходят для изготовления таблеток. В определенных аспектах данного изобретения путем растворения таблеток в стерильной воде или в другом подходящем носителе можно получить растворы в форме единичной дозы. В определенных аспектах данного изобретения подходящие эксципиенты включают в себя, но не ограничиваются ими, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия или бикарбонат, лактоза или фосфат кальция; или связующие агенты, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; или смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

[0304] Дополнительные фармацевтические композиции будут очевидны для специалистов в данной области техники, включая лекарственные составы на основе антитела против CCR8, характеризующиеся пролонгированной или контролируемой доставкой. В определенных аспектах данного изобретения специалистам в данной области техники также известны методики составления различных других средств замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые микрогранулы и депонированные инъекции. См., например, заявку PCT № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. В определенных аспектах данного изобретения препараты с замедленным высвобождением могут содержать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы, обеспечивающие замедленное высвобождение, могут включать в себя полиэфиры, гидрогели, полилактиды (патент США № 3773919 и Европейская патентная заявка № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547 - 556 (1983)), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167 - 277 (1981); и Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98 - 105 (1982)), этиленвинилацетат (Langer et al., см. выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988). В определенных аспектах данного изобретения композиции с замедленным высвобождением могут также включать в себя липосомы, которые можно приготовить любым из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, работу Eppstein et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 - 3692 (1985); европейские патентные публикации № EP 036676; № EP 088046 и № EP 143949.

[0305] Фармацевтическая композиция для применения при введении *in vivo* является, как правило, стерильной. В определенных аспектах данного изобретения этого можно достичь путем фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны. В определенных аспектах данного изобретения, если композиция является лиофилизированной, стерилизацию с применением данного способа можно проводить до или после лиофилизации и восстановления. В определенных аспектах данного изобретения композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. В определенных аспектах данного изобретения парентеральные композиции в общем случае помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, в пакет для внутривенного раствора или во флакон, имеющий пробку, прокалываемую гиподермической иглой для инъекций.

[0306] В определенных аспектах данного изобретения после приготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, или

в виде дегидрированного или лиофилизированного порошка. В определенных аспектах данного изобретения такие лекарственные составы можно хранить в готовой для применения форме или в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением.

[0307] В определенных аспектах данного изобретения также представлены наборы для получения единичной дозы для введения. В определенных аспектах данного изобретения указанный набор содержит первый контейнер, содержащий сухой белок, и второй контейнер, содержащий водный препарат. В определенных аспектах данного изобретения представлены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

[0308] В определенных аспектах данного изобретения эффективное количество терапевтически применяемой фармацевтической композиции, содержащей антитело против CCR8, будет зависеть, к примеру, от обстоятельств и целей лечения. Специалисту в данной области техники понятно, что, таким образом, подходящие для лечения дозировочные уровни в соответствии с определенными аспектами данного изобретения будут варьировать в зависимости, частично, от доставляемой молекулы, показаний, по которым применяется антитело против CCR8, пути введения, а также размеров (массы тела, площади поверхности тела или размеров органов) и (или) состояния (возраста и общего состояния здоровья) данного пациента. В определенных аспектах данного изобретения лечащий врач может титровать дозу и изменять путь введения, чтобы получить оптимальный терапевтический эффект.

[0309] В определенных аспектах данного изобретения частота введения дозы будет учитывать фармакокинетические параметры антитела против CCR8 в используемом лекарственном составе. В определенных аспектах данного изобретения лечащий врач будет вводить композицию до тех пор, пока будет достигнута доза, которая приведет к требуемому эффекту. Таким образом, в определенных аспектах данного изобретения композицию можно вводить в виде одной дозы или в виде двух или большего числа доз (которые могут содержать или не содержать одно и то же количество необходимой молекулы) с течением времени, или в виде непрерывной инфузии через имплантируемое устройство или катетер. Дальнейшее улучшение применения соответствующей дозы проводится рутинным образом рядовыми специалистами в данной области техники и находится в пределах задач, выполняемых ими рутинным образом. В определенных аспектах данного изобретения соответствующие дозы можно установить на основании соответствующих данных о зависимости между дозой и эффектом.

[0310] В определенных аспектах данного изобретения путь введения фармацевтической композиции соответствует известным способам, например, пероральное введение, введение посредством внутривенной, внутривнутрибрюшинной, интрацеребральной (интрапаренхиматозной), интрацеребровентрикулярной, внутримышечной, подкожной, внутриглазной, внутриартериальной, интрапортальной или внутриочаговой инъекциями; при помощи систем для замедленного высвобождения или имплантируемых устройств. В определенных аспектах данного изобретения композиции можно вводить путем болюсной инъекции или непрерывно путем инфузии, или при помощи имплантируемого устройства. В определенных аспектах данного изобретения отдельные элементы комбинированной терапии могут вводиться разными путями.

[0311] В определенных аспектах данного изобретения композицию можно вводить местно путем имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, в который абсорбирована или инкапсулирована необходимая молекула. В определенных аспектах данного изобретения, если применяется имплантируемое устройство, указанное устройство можно имплантировать в любую подходящую ткань или орган, а доставку необходимой молекулы можно осуществлять посредством диффузии, болюса с отложенным высвобождением или непрерывного введения. В определенных аспектах данного изобретения может быть

желательным применять фармацевтическую композицию, содержащую антитело против CCR8, путем *ex vivo*. В таких случаях клетки, ткани и (или) органы, которые были удалены из организма пациента, обрабатывают фармацевтической композицией, содержащей антитело против CCR8, после чего данные клетки, ткани и (или) органы имплантируют обратно в организм данного пациента.

[0312] В определенных аспектах данного изобретения антитело против CCR8 может быть доставлено путем имплантации определенных клеток, которые были генетически сконструированы с помощью таких способов, как описанные в данном документе, для экспрессии и секреции полипептидов. В определенных аспектах данного изобретения такие клетки могут быть клетками животного или человека и могут быть аутологичными, гетерологичными или ксеногенными. В определенных аспектах данного изобретения клетки могут быть иммортализованными. В определенных аспектах данного изобретения, чтобы снизить вероятность иммунологического ответа, клетки можно инкапсулировать, чтобы избежать инфильтрации окружающих тканей. В определенных аспектах данного изобретения инкапсулирующие материалы обычно представляют собой биосовместимые, полупроницаемые полимерные оболочки или мембраны, которые позволяют высвобождать белковый (-е) продукт (-ы), но предотвращают разрушение клеток иммунной системой пациента или другими вредными для них факторами из окружающих тканей.

III. Способы согласно данному изобретению

[0313] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способы получения и (или) применения представленных в данном документе антител против CCR8.

III.A. Способы применения

[0314] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способы снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль Treg-клеток, или их уничтожения, включающие в себя введение субъекту описанного в данном документе антитела против CCR8. В некоторых аспектах данное изобретение направлено на способы снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль Treg-клеток, или их уничтожения, включающие в себя введение представленных в данном документе биспецифического антитела, ViTE, мультиспецифического антитела, бипаратопного антитела, иммуноконъюгата, XAP, ТКР, молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновых кислот, вектора или набора векторов, клетки или фармацевтической композиции.

[0315] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способы активации NK-клеток или индуцирования опосредованного NK-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль регуляторных Treg-клеток, включающие в себя введение субъекту представленного в данном документе антитела против CCR8. В некоторых аспектах данное изобретение направлено на способы активации NK-клеток или индуцирования опосредованного NK-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль регуляторных Treg-клеток, включающие в себя введение представленных в данном документе биспецифического антитела, ViTE, мультиспецифического антитела, бипаратопного антитела, иммуноконъюгата, XAP, ТКР, молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновых кислот, вектора или набора векторов, клетки или фармацевтической композиции.

[0316] В некоторых аспектах данного изобретения указанное приведение в контакт осуществляется *in vitro*. В некоторых аспектах данного изобретения указанное приведение в контакт осуществляется *in vivo*. В некоторых аспектах данного изобретения указанное приведение в контакт лечит заболевание или

патологическое состояние у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах данного изобретения указанное приведение в контакт способствует иммунному ответу у субъекта. В некоторых аспектах данного изобретения у указанного субъекта имеется опухоль, и указанное приведение в контакт усиливает иммунный ответ на указанную опухоль.

[0317] В определенных аспектах данное изобретение направлено на способы лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающие в себя введение указанному субъекту представленного в данном документе антитела против CCR8. В некоторых аспектах данное изобретение направлено на способы лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающие в себя введение представленных в данном документе биспецифического антитела, ViTE, мультиспецифического антитела, бипаратопного антитела, иммуноконъюгата, ХАР, ТКР, молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновых кислот, вектора или набора векторов, клетки или фармацевтической композиции.

[0318] В некоторых аспектах данного изобретения субъект имеет опухоль. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль выбрана из группы, состоящей из следующего: саркома Капоши, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, мантийноклеточная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, лимфома Беркитта и В-клеточная лимфома маргинальной зоны, истинная полицитемия, лимфома, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, солидные опухоли, саркомы и карциномы, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосаркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, саркома толстой кишки, колоректальная карцинома, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, немелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менангиома, меланома, нейробластома, ретинобластома, карцинома носоглотки, карцинома пищевода, базальноклеточная карцинома, рак желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарцинома, колоректальный рак, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаза, рак органов головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого (мелкоклеточный, крупноклеточный), меланома, нейробластома; рак полости рта (например, рак губы, языка, рта и глотки), рак яичника, рак поджелудочной железы, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак прямой кишки; рак дыхательной системы, саркома, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы, или любая комбинация вышеперечисленного.

[0319] В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является рефрактерной по отношению к предшествующей терапии. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является рефрактерной по

отношению к предшествующей стандартной терапии. В некоторых аспектах данного изобретения указанная предшествующая терапия включает в себя иммунотерапию, химиотерапию, хирургическое вмешательство, лучевую терапию или любую их комбинацию. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является рефрактерной по отношению к предшествующей лучевой терапии. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является рефрактерной по отношению к предшествующей иммунотерапии. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является рецидивирующей.

[0320] В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является запущенной. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является местно-распространенной. В некоторых аспектах данного изобретения опухоль является метастатической.

[0321] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится в комбинации с дополнительным противоопухолевым агентом. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент выбран из малой молекулы, полипептида, лучевой терапии, хирургического вмешательства и их комбинации.

[0322] В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится до введения указанного дополнительного противоопухолевого агента. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится после введения указанного дополнительного противоопухолевого агента. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится одновременно с указанным дополнительным противоопухолевым агентом. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 и указанный дополнительный противоопухолевый агент составлены в виде одной композиции.

[0323] В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя химиотерапию. Химиотерапия может представлять собой любую химиотерапию, известную в данной области техники. В некоторых аспектах данного изобретения химиотерапия является стандартным способом лечения конкретного типа онкологического заболевания. В некоторых аспектах данного изобретения химиотерапия представляет собой химиотерапию на основе препарата платины. В некоторых аспектах данного изобретения химиотерапия выбрана из группы препаратов, состоящей из доксорубина (ADRIAMYCIN®), цисплатина, карбоплатина, блеомицина сульфата, кармустина, хлорамбуцила (LEUKERAN®), циклофосфида (CYTOXAN®; NEOSAR®), леналидомида (REVLIMID®), бортезомиба (VELCADE®), дексаметазона, митоксантрона, этопозиды, цитарабина, бендамустина (TREANDA®), ритуксимаба (RITUXAN®), ифосфида, винкристина (ONCOVIN®), флударабина (FLUDARA®), талидомида (THALOMID®), алемтузумаба (CAMPATH®), офатумумаба (ARZERRA®), эверолимуса (AFINITOR®, ZORTRESS®), карфилзомиба (KYPROLIS™) и любой их комбинации.

[0324] В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя иммунотерапию. В некоторых аспектах данного изобретения указанная иммунотерапия выбрана из антагониста PD-1, ингибитора PD-L1, ингибитора TIM-3, ингибитора LAG-3, ингибитора TIGIT, ингибитора CD112R, ингибитора TAM, агониста STING, агониста 4-1BB, ингибитора CCL22, агента, индуцирующего активацию NK-клеток, и любой их комбинации.

[0325] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя антагонист PD-1. Любой антагонист PD-1, известный в данной области техники, можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения антагонист PD-1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают PD-1. Неограничивающие примеры антагонистов PD-1, которые

можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8, включают в себя PDR001, ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, MEDI0680, REGN2810, TSR-042, PF-06801591 и AMP-224.

[0326] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя ингибитор PD-L1. Любой ингибитор PD-L1, известный в данной области техники, можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения ингибитор PD-L1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают PD-L1. Неограничивающие примеры ингибиторов PD-L1, которые можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8, включают в себя FAZ053, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и BMS-936559.

[0327] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя ингибитор TIM-3. Любой ингибитор TIM-3, известный в данной области техники, можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения ингибитор TIM-3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают TIM-3. Неограничивающие примеры ингибиторов TIM-3, которые можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8, включают в себя MGB453 и TSR-022.

[0328] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя ингибитор LAG-3. Любой ингибитор LAG-3, известный в данной области техники, можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения ингибитор LAG-3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают LAG-3. Неограничивающие примеры ингибиторов LAG-3, которые можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8, включают в себя LAG525, BMS-986016 и TSR-033.

[0329] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя ингибитор TIGIT. Любой ингибитор TIGIT, известный в данной области техники, можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения ингибитор TIGIT представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают TIGIT.

[0330] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя ингибитор CD112R. Любой ингибитор CD112R, известный в данной области техники, можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения ингибитор CD112R представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают CD112R.

[0331] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя ингибитор CCL22. Любой ингибитор CCL22, известный в данной области техники, можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения ингибитор CCL22 представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают CCL22.

[0332] В некоторых аспектах данного изобретения указанная дополнительная противоопухолевая терапия включает в себя агент, который индуцирует активацию NK-клеток и, следовательно, усиливает активность АЗКЦ указанного антитела против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения агент, который

индуцирует активацию NK-клеток, представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, малую молекулу, цитокин или слитый цитокин.

[0333] В определенных аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя противоопухолевый агент, выбранный из группы, состоящей из сунитиниба (SUTENT[®]), кабозантиниба (CAVOMETYX[®]), акситиниба (INLYTA[®]), ленватиниба (LENVIMA[®]), эверолимуса (AFINITOR[®]), бевацизумаба (AVASTIN[®]), эпакадостата, NKTR-214 (агониста смещенной активности к CD-122), тивозаниба (FOTIVDA[®]), абексиностата, ипилимумаба (YERVOY[®]), тремелимумаба, пазопаниба (VOTRIENT[®]), сорафениба (NEXAVAR[®]), темсиролимуса (TORISEL[®]), рамуцирумаба (CYRAMZA[®]), нирапариба, саволитиниба, вороланиба (X-82), регорафениба (STIVARGO[®]), донафениба (мультикиназного ингибитора), камрелизумаба (SHR-1210), пексастимогена девацирепвека (JX-594), рамуцирумаба (CYRAMZA[®]), апатиниба (YN968D1), инкапсулированного доксорубицина (THERMODOX[®]), тивантиниба (ARQ197), ADI-PEG 20, биниметиниба, апатиниба мезилата, нинтеданиба, лирилумаба, ниволумаба (OPDIVO[®]), пембролизумаба (KEYTRUDA[®]), атезолизумаба (TECENTRIQ[®]), авелумаба (BAVENCIO[®]), дурвалумаба (IMFIMZI[®]), цемиплимаба-rwlc (LIBTAYO[®]), тислеллизумаба, спартализумаба и любой их комбинации.

[0334] В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор TAM (Axl, Mer, Tyro). В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя агонист 4-1BB. В некоторых аспектах данного изобретения указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор тирозинкиназы (ИТК). Неограничивающие примеры ИТК, которые можно применять в комбинации с представленными в данном документе антителами против CCR8, включают в себя иматиниба мезилат, дазатиниб, нилотиниб и бозутиниб.

[0335] Антитела против CCR8 согласно данному изобретению могут вводиться любым подходящим путем. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится внутривенно. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится подкожно. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится внутримышечно. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится внутривнутрибрюшинно. В некоторых аспектах данного изобретения указанное антитело против CCR8 вводится перорально.

III.B. Способы получения антител против CCR8

[0336] В данном изобретении также представлены способы получения любых описанных в данном документе антител против CCR8. В некоторых аспектах данного изобретения способы получения антитела, представленного в данном документе, могут включать в себя иммунизацию субъекта (например, млекопитающего, отличного от человека) подходящим иммуногеном. Подходящие иммуногены для получения любого из антител, описанных в данном документе, представлены в данном документе. Например, для получения антитела, которое связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR8 человека, специалист в данной области техники может иммунизировать подходящего субъекта (например, млекопитающее, не являющееся человеком, такое как крыса, мышь, песчанка, хомяк, собака, кошка, свинья, коза, лошадь или примат, отличный от человека) фрагментом CCR8 человека, содержащим указанный N-концевой внеклеточный домен. В некоторых аспектах данного изобретения в качестве иммуногена используют фрагмент полипептида, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 172.

[0337] Подходящий субъект (например, млекопитающее, отличное от человека) может быть иммунизирован соответствующим антигеном вместе с последующими бустерными иммунизациями такое количество раз, которого достаточно для того, чтобы вызвать выработку антитела у данного млекопитающего. Иммуноген можно вводить субъекту (например, млекопитающему, отличному от человека) вместе с адьювантом. Адьюванты, применимые для получения антитела у субъекта, включают в себя, но не ограничиваются ими, белковые адьюванты; бактериальные адьюванты, например, цельные бактерии (БЦЖ, *Corynebacterium parvum* или *Salmonella minnesota*) и бактериальные компоненты, включая скелет клеточной стенки, димиколат трегалозы, монофосфориллипид А, экстрагируемый метанолом остаток (ЭМО, англ. «MER») туберкулезной палочки, полный или неполный адьювант Фрейнда; вирусные адьюванты; химические адьюванты, например, гидроксид алюминия, йодоацетат и холестерилгемисукцинат. Другие адьюванты, которые можно применять в способах индукции иммунного ответа, включают в себя, например, холерный токсин и белки парапоксвируса. См. также работу Bieg et al. (1999) *Autoimmunity* 31 (1): 15 - 24. См. также, например, работы Lodmell et al. (2000) *Vaccine* 18: 1059 - 1066; Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42: 4640 - 4649; Baldridge et al. (1999) *Methods* 19: 103 - 107; и Gupta et al. (1995) *Vaccine* 13 (14): 1263 - 1276.

[0338] В некоторых аспектах данного изобретения указанные способы включают в себя получение клеточной линии гибридомы, которая секретирует моноклональное антитело, которое связывается с иммуногеном. Например, подходящее млекопитающее, такое как лабораторная мышь, иммунизируют полипептидом CCR8, как описано выше. Клетки иммунизированного млекопитающего, продуцирующие антитела (например, В-клетки селезенки), можно выделять через двое - четверо суток после по меньшей мере одной бустерной иммунизации иммуногеном, а затем кратковременно выращивать в культуре перед слиянием с клетками подходящей клеточной линии миеломы. Слияние клеток можно осуществлять в присутствии промотора слияния, такого как, например, вирус коровьей оспы или полиэтиленгликоль. Гибридные клетки, полученные при слиянии, клонируют и отбирают клеточные клоны, секретирующие желаемые антитела. Например, клетки селезенки мыши Balb/c, иммунизированной подходящим иммуногеном, могут быть слиты с клетками клеточной линии миеломы PA1 или с клетками клеточной линии миеломы Sp2/0-Ag 14. После слияния число клеток увеличивают в подходящей культуральной среде, которую дополняют средой для селекции, например, гипоксантин-аминоптерин-тимидиновой средой (ГАТ-средой, англ. «HAT»), через равные промежутки времени, чтобы предотвратить чрезмерный рост нормальных клеток миеломы по сравнению с желаемыми клетками гибридомы. Полученные гибридные клетки затем подвергают скринингу на предмет секреции желательных антител, например, антитела, которое связывается с CCR8 человека, и в некоторых аспектах данного изобретения специалист в данной области техники может идентифицировать антитело против CCR8 из неиммунологической направленной библиотеки, как описано, например, в патенте США № 6300064 (выданном на имя Knappik et al.; Morphosys AG) и в работе Schoonbroodt et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33 (9): e81.

[0339] В некоторых аспектах данного изобретения способы, описанные в данном документе, могут включать в себя или применяться в сочетании, например, с технологиями фагового дисплея, бактериального дисплея, дрожжевого поверхностного дисплея, эукариотического вирусного дисплея, дисплея на клетках млекопитающих и бесклеточными методиками скрининга антител (например, рибосомного дисплея) (см., например, работы Etz et al. (2001) *J Bacteriol* 183: 6924 - 6935; Cornelis (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11: 450 - 454; Klemm et al. (2000) *Microbiology* 146: 3025 - 3032; Kieke et al. (1997) *Protein Eng* 10: 1303 - 1310; Yeung et al. (2002) *Biotechnol Prog* 18: 212 - 220; Boder et al. (2000) *Methods Enzymology* 328: 430 - 444; Grabherr et al. (2001) *Comb Chem High Throughput Screen* 4: 185 - 192; Michael et al. (1995) *Gene Ther* 2: 660 - 668; Pereboev et

al. (2001) *J Virol* 75: 7107 - 7113; Schaffitzel et al. (1999) *J Immunol Methods* 231: 119 - 135; и Hanes et al. (2000) *Nat Biotechnol* 18: 1287 - 1292).

[0340] Способы идентификации антител с использованием различных способов фагового дисплея известны в данном уровне техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антитела отображаются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. Такой фаг можно использовать для отображения антигенсвязывающих доменов антител, таких как Fab, Fv или фрагменты Fv антител, стабилизированных дисульфидной связью, экспрессированных из репертуарной или комбинаторной библиотеки антител (например, человеческих или мышиных). Фаги, применяемые в таких способах, обычно представляют собой нитевидные фаги, такие как fd и M13. Антигенсвязывающие домены экспрессируются в виде белка, рекомбинантно слитого с любым из белков оболочки фага рIII, рVIII или рIX. См., например, работу Shi et al. (2010) *JMB* 397: 385 - 396. Примеры способов фагового дисплея, которые можно применять для получения описанных в данном документе иммуноглобулинов или их фрагментов, включают в себя способы, представленные в работах Brinkman et al. (1995) *J Immunol Methods* 182: 41 - 50; Ames et al. (1995) *J Immunol Methods* 184: 177 - 186; Kettleborough et al. (1994) *Eur J Immunol* 24: 952 - 958; Persic et al. (1997) *Gene* 187: 9 - 18; Burton et al. (1994) *Advances in Immunology* 57: 191 - 280; и в международных патентных РСТ-публикациях № WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 и WO 95/20401. Подходящие способы также представлены, например, в патентах США № 5698426; № 5223409; № 5403484; № 5580717; № 5427908; № 5750753; № 5821047; № 5571698; № 5427908; № 5516637; № 5780225; № 5658727; № 5733743 № и № 5969108.

[0341] В некоторых аспектах данного изобретения библиотеки антител фагового дисплея могут быть созданы с использованием мРНК, собранной из В-клеток иммунизированных млекопитающих. Например, образец клеток селезенки, содержащий В-клетки, может быть выделен из мышей, иммунизированных полипептидом CCR8, как описано выше. мРНК можно выделить из клеток и перевести в кДНК с использованием стандартных методик молекулярной биологии. См., например, работу Sambrook et al. (1989) «*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition*», Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane (1988), как указано выше; Benny K. C. Lo (2004), как указано выше; и работу Vorrebaek (1995), как указано выше. кДНК, кодирующую вариabельные области полипептидов тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулинов, используют для создания библиотеки фагового дисплея. Способы создания такой библиотеки описаны, например, в работах Merz et al. (1995) *J Neurosci Methods* 62 (1 - 2): 213 - 9; Di Niro et al. (2005) *Biochem J* 388 (Pt 3): 889 - 894; и Engberg et al. (1995) *Methods Mol Biol* 51: 355 - 376.

[0342] В некоторых аспектах данного изобретения можно применять комбинацию селекции и скрининга для идентификации представляющего интерес антитела, например, из популяции гибридных антител или библиотеки антител фагового дисплея. Подходящие способы известны в данной области техники и описаны, например, в работах Hoogenboom (1997) *Trends in Biotechnology* 15: 62 - 70; Brinkman et al. (1995), как указано выше; Ames et al. (1995), как указано выше; Kettleborough et al. (1994), как указано выше; Persic et al. (1997), как указано выше; и Burton et al. (1994), как указано выше. Например, множество фагмидных векторов, каждый из которых кодирует слитый белок из белка оболочки бактериофага (например, рIII, рVIII или рIX фага M13) и другую антигенсвязывающую область, получают с использованием стандартных методик молекулярной биологии, а затем вводят в популяцию бактерий (например, *E. coli*). Экспрессия бактериофага в бактериях может, в некоторых аспектах данного изобретения, потребовать использования вспомогательного фага. В некоторых аспектах данного изобретения вспомогательный фаг не требуется (см., например, Chasteen et al., (2006) *Nucleic Acids Res* 34 (21): e145). Фаг, продуцируемый бактериями, выделяют и затем приводят в

контакт, например, с целевым антигеном, связанным с твердой подложкой (иммобилизированным). Фаг также можно приводить в контакт с антигеном в растворе, после чего полученный комплекс связывают с твердой подложкой.

[0343] Субпопуляцию антител, выделенных с помощью скрининга с использованием вышеуказанных способов, можно охарактеризовать по их специфичности и аффинности связывания с конкретным антигеном (например, с CCR8 человека) с использованием любого иммунологического или биохимического способа, известного в данной области техники. Например, специфическое связывание антитела с CCR8 можно определить, например, с помощью иммунологических или биохимических методов, таких как, но не ограничиваясь ими, анализ ТИФА, анализ ППР, анализ иммунопреципитации, аффинная хроматография и равновесный диализ, как описано выше. Иммуноанализы, которые можно применять для анализа иммуноспецифического связывания и перекрестной реактивности антител, включают в себя, но не ограничиваются ими, конкурентные и неконкурентные системы анализа с использованием таких методов, как вестерн-блоттинг, РИА, ТИФА (твердофазный иммуноферментный анализ), «сэндвич»-иммуноанализы, анализы иммунопреципитации, анализы иммунодиффузии, анализы агглютинации, анализы фиксации комплемента, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммуноанализы и иммуноанализы с белком А. Такие анализы являются рутинными и хорошо известны в данной области техники.

[0344] В аспектах данного изобретения, в которых выбранные аминокислотные последовательности CDR представляют собой короткие последовательности (например, длиной меньше чем 10 - 15 аминокислот), нуклеиновые кислоты, кодирующие такие CDR, могут быть синтезированы химически, как описано, например, в работе Shiraiishi et al. (2007) *Nucleic Acids Symposium Series* 51 (1): 129 - 130 и в патенте США № 6995259. Для данной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей акцепторное антитело, область последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR, может быть заменена химически синтезированными нуклеиновыми кислотами с помощью стандартных методик молекулярной биологии. 5'- и 3'-концы химически синтезированных нуклеиновых кислот могут быть синтезированы так, чтобы они содержали сайты рестрикционных ферментов с липкими концами для использования при клонировании нуклеиновых кислот в нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельную область донорного антитела.

III.C. Экспрессия и очистка рекомбинантных антител

[0345] Описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью множества методик, известных в области молекулярной биологии и химии белков. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая один или оба полипептида тяжелой и легкой цепей антитела, может быть встроена в вектор экспрессии, который содержит регуляторные последовательности транскрипции и трансляции, которые включают в себя, например, промоторные последовательности, сайты связывания рибосом, последовательности начала транскрипции и остановки транскрипции, последовательности начала трансляции и остановки трансляции, сигналы терминатора транскрипции, сигналы полиаденилирования и энхансерные или активирующие последовательности. Регуляторные последовательности включают в себя промотор и последовательности начала и остановки транскрипции. В дополнение к этому вектор экспрессии может включать в себя больше чем одну систему репликации, так что его можно поддерживать в двух разных организмах, например, в клетках млекопитающих или насекомых для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации.

[0346] Доступно несколько возможных векторных систем для экспрессии клонированных полипептидов тяжелой и легкой цепей из нуклеиновых кислот в клетках млекопитающих. Один из классов векторов основан на интеграции желаемых последовательностей генов в геном клетки-хозяина. Клетки со стабильно интегрированной ДНК могут быть отобраны путем одновременного введения генов устойчивости к лекарственному препарату, таких как *gpt* из *E. coli* (Mulligan and Berg (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2072) или *Tn5 neo* (Southern and Berg (1982) *Mol Appl Genet* 1: 327). Селектируемый маркерный ген может быть либо непосредственно связан с последовательностями ДНК, которые должны быть экспрессированы, либо введен в ту же клетку путем котрансфекции (Wigler et al. (1979) *Cell* 16: 77). Во втором классе векторов используются элементы ДНК, которые придают способность к автономной репликации внехромосомной плазмиде. Такие векторы могут быть получены из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (Sarver et al. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7147), цитомегаловирус, вирус полиомы (Deans et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1292) или вирус SV40 (Lusky and Botchan (1981) *Nature* 293: 79).

[0347] Векторы экспрессии можно вводить в клетки способом, подходящим для последующей экспрессии нуклеиновой кислоты. Способ введения во многом диктуется целевым типом клеток, что обсуждается ниже. Иллюстративные способы включают в себя осаждение с помощью CaPO_4 , слияние липосом, катионные липосомы, электропорацию, вирусную инфекцию, трансфекцию, опосредованную декстраном, трансфекцию, опосредованную полибренном, слияние протопластов и прямую микроинъекцию.

[0348] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов включают в себя клетки дрожжей, бактерий, насекомых, растений и млекопитающих. Особый интерес представляют бактерии, такие как *E. coli*, грибы, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, клетки насекомых, такие как SF9, клеточные линии млекопитающих (например, клеточные линии человека), а также первичные клеточные линии.

[0349] В некоторых аспектах данного изобретения антитело или его фрагмент могут быть экспрессированы и очищены из организмов трансгенных животных (например, трансгенных млекопитающих). Например, антитело может быть получено в организме трансгенного млекопитающего (например, грызуна) и выделено из молока, как описано, например, в работах Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13 (6): 625 - 629; van Kuik-Romeijn et al. (2000) *Transgenic Res* 9 (2): 155 - 159; и Pollock et al. (1999) *J Immunol Methods* 231 (1 - 2): 147 - 157.

[0350] Антитела и их фрагменты могут быть получены из клеток путем культивирования клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела или их фрагменты, в условиях и в течение времени, достаточных для обеспечения экспрессии указанных белков. Такие условия для экспрессии белка будут варьировать в зависимости от выбора вектора экспрессии и клетки-хозяина, и специалист в данной области техники легко определит их с помощью рутинных экспериментов. Например, антитела, экспрессированные в *E. coli*, могут быть получены путем рефолдинга из телец включения (см., например, работу Hou et al. (1998) *Cytokine* 10: 319 - 30). Системы бактериальной экспрессии и способы их применения хорошо известны в данной области техники (см. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, and *Molecular Cloning - A Laboratory Manual - 3rd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Выбор кодонов, подходящих векторов экспрессии и подходящих клеток-хозяев будет варьировать в зависимости от ряда факторов, и при необходимости может быть легко оптимизирован. Антитело (или его фрагмент), описанные в данном документе, могут быть экспрессированы в клетках млекопитающих или в других системах экспрессии, включая, но не ограничиваясь ими, дрожжи, бакуловирусы и системы

экспрессии *in vitro* (см., например, работу Kaszubska et al. (2000) *Protein Expression and Purification* 18: 213 - 220).

[0351] После экспрессии антитела и их фрагменты можно выделять. Антитело или его фрагмент могут быть выделены или очищены различными способами, известными специалистам в данной области техники, в зависимости от того, какие другие компоненты присутствуют в данном образце. Стандартные методы очистки включают в себя электрофоретические, молекулярные, иммунологические и хроматографические методики, включая ионообменную, гидрофобную, аффинную хроматографии и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Например, антитело может быть очищено с помощью стандартной колонки против антител (например, колонки с белком А или с белком G). Также можно применять методики ультрафильтрации и диалфильтрации в сочетании с концентрированием белка. См., например, Scopes (1994) «Protein Purification, 3rd edition», Springer-Verlag, New York City, New York. Степень очистки обязательно будет зависеть от желаемого применения. В некоторых случаях нет необходимости в очистке экспрессированного антитела или его фрагментов.

[0352] Способы определения выхода или чистоты очищенного антитела или его фрагмента известны в данной области техники и включают в себя, например, анализ по Брэдфорду, УФ-спектроскопию, биуретовый анализ белка, анализ белка по Лоури, анализ белка с амидовым черным красителем, жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ), масс-спектрометрию (МС) и методы гель-электрофореза (например, с использованием белкового красителя, такого как кумасси синий, или коллоидного серебра).

III.D. Модификация антител или их антигенсвязывающих фрагментов

[0353] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно модифицировать после их экспрессии и очистки. Модификации могут быть ковалентными или нековалентными модификациями. Такие модификации могут быть введены в антитела или их фрагменты, например, путем приведения целевых аминокислотных остатков данного полипептида в реакцию с органическим дериватирующим агентом, который способен вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или концевыми остатками. Подходящие сайты для модификации могут быть выбраны с использованием любого из множества критериев, включая, например, структурный анализ или анализ аминокислотной последовательности антител или их фрагментов.

[0354] В некоторых аспектах данного изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть конъюгированы с гетерологичным фрагментом. Такой гетерологичный фрагмент может представлять собой, например, гетерологичный полипептид, терапевтический агент (например, токсин или лекарственный препарат) или обнаруживаемую метку, такую как, но не ограничиваясь ими, радиоактивная метка, ферментативная метка, флуоресцентная метка, метка тяжелого металла, люминесцентная метка или аффинная метка, такая как биотин или стрептавидин. Подходящие гетерологичные полипептиды включают в себя, например, антигенную метку (FLAG (DYKDDDDK (SEQ ID NO: 241)), полигистидин (6-His; НННННН (SEQ ID NO: 142)), гемагглютинин (HA; YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 242)), глутатион-S-трансферазу (GST) или мальтозосвязывающий белок (МСБ, англ. «MBP»)), для применения при очистке антител или их фрагментов. Гетерологичные полипептиды также включают в себя полипептиды (например, ферменты), которые можно применять в качестве диагностических или обнаруживаемых маркеров, например, люциферазу, флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP)) или хлорамфениколацетилтрансферазу (ХАТ, англ. «CAT»). Подходящие радиоактивные метки включают в себя,

например, ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S и ^3H . Подходящие флуоресцентные метки включают в себя, но не ограничиваются ими, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ, англ. «FITC»), зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ, англ. «GFP»), DyLight™ 488, фикоэритрин (ФЭ, англ. «PE»), иодид пропидия (ИП, англ. «PI»), PerCP, PE-Alexa Fluor® 700, Cy5, аллофикоцианин и Cy7. Люминесцентные метки включают в себя, например, любой из множества люминесцентных хелатов лантанидов (например, европия или тербия). Например, подходящие хелаты европия включают в себя хелат европия и диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПК, англ. «DTPA») или тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (ТЦТК, англ. «DOTA»). Ферментативные метки включают в себя, например, щелочную фосфатазу, ХАТ, люциферазу и пероксидазу хрена.

[0355] Два белка (например, антитело и гетерологичный фрагмент) могут быть сшиты с помощью любого из ряда известных химических перекрестно-сшивающих агентов. Примерами таких перекрестно-сшивающих агентов являются те, которые связывают два аминокислотных остатка посредством связи, включающей «затрудненную» дисульфидную связь. В таких связях дисульфидная связь в сшивающем звене защищена (за счет пространственно-блокирующих групп по обе стороны от данной дисульфидной связи) от восстановления под действием, например, восстановленного глутатиона или фермента дисульфидредуктазы. Один подходящий реагент – 4-сукцинимидилоксикарбонил- α -метил- α (2-пиридилдитио)толуол (СМПТ, англ. «SMPT») – образует такую связь между двумя белками, используя концевой лизин на одном из белков и концевой цистеин на другом. Также можно использовать гетеробифункциональные реагенты, которые перекрестно сшиваются с помощью различных групп связывания на каждом белке. Другие пригодные перекрестно-сшивающие агенты включают в себя, но не ограничиваются ими, реагенты, которые связывают две аминокислотные группы (например, N-5-азидо-2-нитробензоилоксисукцинимид), две сульфгидрильные группы (например, 1,4-бис-малеимидобутан), аминокислотную группу и сульфгидрильную группу (например, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир), аминокислотную группу и карбоксильную группу (например, 4-[п-азидосалициламидо]бутиламин), и аминокислотную группу и гуанидиниевую группу, которые присутствуют в боковой цепи аргинина (например, моногидрат п-азидофенилглиоксаля).

[0356] В некоторых аспектах данного изобретения радиоактивная метка может быть непосредственно конъюгирована с аминокислотным остовом антитела. В качестве альтернативы радиоактивная метка может быть включена как часть более крупной молекулы (например, ^{125}I в мета-[^{125}I]-йодофенил-N-гидроксисукцинимид ([^{125}I]МИФНГС), англ. («[^{125}I]mIPNHS»)) который связывается со свободными аминокислотными группами с образованием мета-йодофенильных (МИФ, англ. «mIP») производных соответствующих белков (см., например, работу Rogers et al. (1997) *J Nucl Med* 38: 1221 - 1229) или в виде хелата (например, с ТЦТК или ДТПК), который, в свою очередь, связан с белковым остовом. Способы конъюгации радиоактивных меток или более крупных молекул/хелатов, содержащих их, с антителами, описанными в данном документе, или с их антигенсвязывающими фрагментами, известны в данной области техники. Такие способы включают в себя инкубацию белков с радиоактивной меткой в определенных условиях (например, pH, концентрация соли, и (или) температура), которые облегчают связывание радиоактивной метки или хелата с данным белком (см., например, патент США № 6001329).

[0357] Способы конъюгации флуоресцентной метки (иногда называемой «флуорофор») с белком (например, антителом) известны в области химии белков. Например, флуорофоры могут быть конъюгированы со свободными аминокислотными группами (например, лизинов) или сульфгидрильными группами (например, цистеинов) белков с использованием групп сукцинимидилового (НГС, англ. «NHS») сложного эфира или тетрафторфенилового (ТФФ, англ. «TFP») сложного эфира, присоединенных к флуорофорам. В некоторых

аспектах данного изобретения флуорофоры могут быть конъюгированы с гетеробифункциональным перекрестно-сшивающим фрагментом, таким как сульфосукцинимидил-4-(N-маленидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-СМЦК, англ. «sulfo-SMCC»). Подходящие способы конъюгации включают в себя инкубацию белка антитела или его фрагмента с флуорофором в условиях, облегчающих связывание данного флуорофора с данным белком. См., например, работу Welch and Redvanly (2003) «Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications», John Wiley and Sons (ISBN 0471495603).

[0358] В некоторых аспектах данного изобретения антитела или их фрагменты можно модифицировать, например, фрагментом, улучшающим стабилизацию и (или) удержание антител в циркуляции, например, в крови, сыворотке крови или других тканях. Например, антитело или его фрагмент можно ПЭГилировать, как описано, например, в работах Lee et al. (1999) *Bioconjug Chem* 10 (6): 973 - 8; Kinstler et al. (2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54: 477 - 485; и Roberts et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 459 - 476; или ГЭКилировать (с помощью гидроксипропилового крахмала – ГЭК, англ. «HES») (Fresenius Kabi, Germany; см., например, работу Pavišić et al. (2010) *Int J Pharm* 387 (1 - 2): 110 - 119). Стабилизирующий фрагмент может улучшить стабильность или удержание антитела (или его фрагмента) по меньшей мере в 1,5 раза (например, по меньшей мере в 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50 или большее число раз).

[0359] В некоторых аспектах данного изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть гликозилированы. В некоторых аспектах данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут быть подвергнуты ферментативной или химической обработке, или получены из клетки, так что указанное антитело или его фрагмент имеют низкую степень гликозилирования или не гликозилированы вообще. Способы получения антител с низкой степенью гликозилирования известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6933368; и в работах Wright et al. (1991) *EMBO J* 10 (10): 2717 - 2723; и Co et al. (1993) *Mol Immunol* 30: 1361.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: создание антител

[0360] Семнадцать моноклональных антител, специфичных в отношении CCR8 человека, были созданы против N-концевого фрагмента CCR8.

[0361] Фаговый пэннинг антител, клонирование и трансфекция

[0362] Рекомбинантные белки, экспрессирующие N-концевой внеклеточный домен CCR8 человека или яванской макаки, слитый с 6X His-меткой, за которой следует IgG2a-Fc (CCR8-Fc) мыши, клонировали в экспрессионные векторы млекопитающих (SEQ ID NO: 173 и 174, соответственно; таблица 4). В белке человека свободный цистеин в положении 25 заменяли на серин, чтобы предотвратить образование дисульфидных связей. Полученные секретированные белки экспрессировали путем трансфекции в клетках CHO, очищали с использованием белка А и использовали в качестве антигена для фагового пэннинга с использованием библиотеки дисплея Fab. Для пэннинга указанный очищенный белок соединяли с гранулами M280 Tosal или с планшетом для ELISA, и выполняли пэннинг с помощью стандартных способов. Выполняли последовательные раунды пэннинга с CCR8-ECD-Fc человека или чередующиеся раунды пэннинга с CCR8-ECD-Fc яванской макаки, при этом несвязанный фаг в каждом раунде удаляли промыванием. Выделяли ДНК из полученного пула связанных фагов и клонировали последовательности тяжелой и легкой цепей в вектор экспрессии млекопитающих. Отдельные трансформированные колонии выращивали по отдельности в лунках

96-луночного планшета для культивирования бактерий, а ДНК очищали с использованием набора реактивов Qiagen Turbo Miniprep. 96-луночные мини-библиотеки ДНК использовали для трансфекции клеток CHO в том же 96-луночном формате, и надосадочные жидкости секретированных антител собирали после трехдневной инкубации при температуре 37°C в инкубаторе с 7% CO₂.

Таблица 4: последовательности CCR8-ECD-Fc (*сигнальный пептид; внеклеточный домен CCR8; 6X His-метка и линкер*; и IgG2a-Fc мыши)

CCR8-Fc человека	<i>MGWSCILFLVATATGAHSMDYTLDSLVTTVTDYYPDIFSSPSDAELIQTNGK</i> <u>HHHHHHSGGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLS</u> PIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVT LTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 173)
CCR8-Fc яванской макаки	<i>MGWSCILFLVATATGAHSMDYTLDPSTMTMDYYPDSLSSPSDGELIQRNDK</i> <u>HHHHHHSGGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLS</u> PIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVT LTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 174)

[0363] Проточная цитометрия надосадочных жидкостей CHO

[0364] Клетки 293Т, экспрессирующие CCR8 человека, CCR8 яванской макаки, CCR8 мыши и CCR2 человека, собирали с использованием реактива Accutase® и распределяли по 100000 клеток в каждую лунку 96-луночного планшета с v-образным дном. В некоторых случаях исследовали также клеточную линию Hut78, естественным образом экспрессирующую CCR8 человека. Затем добавляли надосадочные жидкости CHO из мини-библиотеки в окончательном разведении 1 : 2 для каждого типа клеток и инкубировали при температуре 4°C в течение 1 часа. После осаждения клетки инкубировали с биотинилированным антителом против области Fc человека, а затем – со стрептавидином-АФЦ или с антителом, меченным АФЦ, против области Fc человека при температуре 4°C в течение 30 минут. После промывки и фиксации клетки анализировали на цитометре FACS Canto II с йодидом пропидия для дифференцирования между живыми и мертвыми клетками. Анализировали живые клетки и клоны, которые продемонстрировали специфическое связывание с CCR8 (человека и (или) яванской макаки), но не с CCR2, отправили на секвенирование ДНК и дальнейшее исследование.

[0365] Разработка антитела-1 против CCR8

[0366] Родительское антитело – родительское антитело-1 против CCR8 – получали путем фагового пэннинга так, как описано выше, на N-концевом белке CCR8 человека, и оно имело аффинность, равную 1 нМ, на клеточной линии 293Т-CCR8 человека. Для улучшения аффинности создали библиотеку на основе вируса коровьей оспы, в которой рандомизировали CDR3 тяжелой цепи. На основе вируса коровьей оспы создали библиотеку из 12000 вариантов CDR3. После инфицирования в течение ночи библиотекой CDR3 тяжелой цепи (один клон на клетку) и исходной конструкцией вируса легкой цепи на поверхности клетки экспрессируется полноразмерное антитело IgG человека (референс). Инфицированные клетки A431 инкубировали с N-концевым белком CCR8 человека в конечной концентрации 0,1 мкг/мл, промывали и

Родительское	Родительское антитело-1 против CCR8	H23188	L1037	1,06	> 50	++++	-
Рандомизация HCDR3	Антитело-1 против CCR8	41	43	0,41	> 50	+++	-
Перетасовка VL	Антитело-1-1 против CCR8	101	103	1,01	22,1	+++	+
Перетасовка VL	Антитело-1-2 против CCR8	111	113	1,06	> 50	+++	+
Перетасовка VL	Антитело-1-3 против CCR8	121	123	1,38	> 50	+++	+
Перетасовка VL	Антитело-1-4 против CCR8	131	133	0,28	35,9	+++	+
Перетасовка VL	Антитело-1-5 против CCR8	141	143	1,36	48,6	+++	+

[0369] Разработка антитела-2 против CCR8 и антитела-2-1 против CCR8

[0370] Родительское антитело (родительское антитело-2 против CCR8) получали путем фагового пэннинга так, как описано выше, с двумя циклами с белком человека, с последующими двумя циклами с N-концевым белком яванской макаки. Было обнаружено, что оно связывается с клеточными линиями CCR8 как человека, так и яванской макаки, с аффинностью, равной 19,9 нМ и 11,1 нМ, соответственно. Для улучшения аффинности создали библиотеку на основе фага, в которой рандомизировали CDR1 и CDR2 тяжелой цепи. Данную библиотеку подвергли одному циклу пэннинга с белком CCR8-ECD-Fc яванской макаки, а затем – двум последовательным циклам с белком CCR8-ECD-Fc человека. Отдельные фаговые клоны обрабатывали в 96-луночном формате и анализировали с помощью фагового ТИФА как на предмет белков человека, так и на предмет белков яванской макаки, а также на предмет отрицательных антигенов. Клоны, которые проявили специфичность в отношении CCR8, были отправлены на секвенирование и клонированы в векторы экспрессии млекопитающих для дальнейшей характеристики. Антитело-2 против CCR8 имело улучшенную аффинность, равную 0,4 нМ, в отношении клеток 293T-HuCCR8, и равную 0,9 нМ – в отношении клеток 293T-Supo CCR8, полученных в результате двух аминокислотных мутаций в CDR1 и CDR2. Как антитело-2 против CCR8, так и антитело-2-1 против CCR8 продемонстрировало связывание с белком CCR8 как человека, так и яванской макаки (фиг. 2C и 2E), и с клетками, экспрессирующими CCR8 как человека, так и яванской макаки (фиг. 2D и 2F).

[0371] Разработка антитела-2-2 против CCR8

[0372] Тяжелую цепь родительского антитела – родительского антитела-2 против CCR8 – клонировали в вирус коровьей оспы для облегчения перетасовочного пэннинга легкой цепи с использованием библиотек IgG человека Vaccinia Display. Кратко, 6×10^8 клеток ВНК инфицировали тяжелой цепью из родительского антитела-2 против CCR8 (H23407) и пулом легких цепей лямбда из наивных источников. После двух суток инкубации при температуре 37°C, 7% CO₂, собирали надосадочные жидкости и осаждали с помощью центрифугирования частицы вируса осповакцины, экспрессирующие на своей поверхности библиотеку IgG человека. Осадок ресуспендировали и инкубировали с очищенным белком CCR8-Fc яванской макаки, связанным с гранулами M280 Tosyl. Несвязанный вирус вымывали, а связанный вирус амплифицировали для последующих циклов. После проведения двух циклов с белком CCR8-Fc яванской макаки связанный пул сортировали в отношении перекрестного связывания белка человека и яванской макаки с 0,1 мкг/мл биотинилированного белка CCR8-Fc яванской макаки и 0,1 мкг/мл белка CCR8-Fc человека. Образцы с наиболее высокой связывающей способностью в отношении обоих белков собирали, амплифицировали и экстрагировали их ДНК для клонирования в вектор экспрессии млекопитающих для трансфекции CHO и анализа с помощью проточной цитометрии, как подробно описано выше. Легкие цепи, проявившие наилучшее связывание с клеточными линиями 293Т-CCR8, перекрестно объединяли в пары с тяжелой цепью антитела-2 против CCR8 (H23727) для проверки синергического улучшения аффинности. Антитело-2-2 против CCR8 проявляло улучшенное перекрестно-реактивное связывание с CCR8 человека по сравнению с родительским антителом (фиг. 2E - 2F).

Таблица 6: антитела против CCR8

Источник антитела	Номер мАг	Тяжелая цепь (SEQ ID NO)	Легкая цепь(SEQ ID NO)	Аффинность к клеткам 293Т- HuCCR8 (нМ)	Аффинность к клеткам 293Т- CyCCR8 (нМ)	Связывание с белком HuCCR8-Fc	Связывание с белком CyCCR8-Fc
Родительское	Родительское антитело-2 против CCR8	H23407	L1032	19,9	11,1	++++	++++
Рандомизация HCDR1/HCD R2	Антитело-2 против CCR8	11	13	0,41	0,94	+++	+++
Рандомизация HCDR1/HCD R2	Антитело-2-1 против CCR8	51	53	0,54	1,09	+++	+++

Рандомизация HCDR1/HCDR2 и перетасовка VL	Антитело-2-2 против CCR8	161	163	0,8	1,6	+++	+++
---	--------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0373] Разработка антитела-2-3 против CCR8 и антитела-2-4 против CCR8

[0374] Родительское антитело – родительское антитело-3 против CCR8 – получали путем фагового пэннинга так, как описано выше, с двумя циклами с белком человека, с последующими двумя циклами с N-концевым белком яванской макаки. Было обнаружено, что оно связывается с клеточными линиями CCR8 человека с аффинностью, равной 6,8 нМ. Для улучшения аффинности создали библиотеку на основе фага, в которой рандомизировали CDR3 тяжелой цепи. Данную библиотеку подвергли одному циклу пэннинга с белком CCR8-ECD-Fc яванской макаки, а затем – одному циклу с белком CCR8-ECD-Fc человека. ДНК из связанного пула экстрагировали и клонировали в вектор экспрессии млекопитающих для трансфекции CHO и анализа с помощью проточной цитометрии, как подробно описано выше. Как антитело-2-3 против CCR8, так и антитело-2-4 против CCR8 продемонстрировало перекрестно-реактивное связывание с клеточными линиями CCR8 как человека, так и яванской макаки (фиг. 2G - 2J).

[0375] Разработка антитела-2-5 против CCR8 и антитела-2-6 против CCR8

[0376] Также создали библиотеку вариантов CDR3 для тяжелой цепи родительского антитела-3 против CCR8 на основе вируса коровьей оспы. Данную библиотеку сортировали в отношении перекрестного связывания белка человека и яванской макаки с 1 мкг/мл биотинилированного белка CCR8-Fc яванской макаки и 1 мкг/мл белка CCR8-Fc человека. Образцы с наиболее высокой связывающей способностью в отношении обоих белков собирали, амплифицировали и экстрагировали их ДНК для клонирования в вектор экспрессии млекопитающих для трансфекции CHO и анализа с помощью проточной цитометрии, как подробно описано выше. Как антитело-2-5 против CCR8, так и антитело-2-6 против CCR8 продемонстрировало перекрестно-реактивное связывание с клеточными линиями CCR8 как человека, так и яванской макаки (фиг. 2K - 2N).

[0377] Разработка антитела 2-7 против CCR8, антитела 2-8 против CCR8, антитела 2-9 против CCR8, антитела 2-10 против CCR8

[0378] Тяжелую цепь родительского антитела-3 против CCR8 клонировали в вирус коровьей оспы для облегчения перетасовочного пэннинга легкой цепи с использованием библиотек IgG человека Vaccinex Vaccinia Display. Кратко, 6×10^8 клеток ВНК инфицировали тяжелой цепью из родительского антитела-3 против CCR8 (H23373) и пулом легких цепей лямбда из наивных источников. После двух суток инкубации при температуре 37°C, 7% CO₂, собирали надосадочные жидкости и осаждали с помощью центрифугирования частицы вируса осповакцины, экспрессирующие на своей поверхности библиотеку IgG человека. Осадок ресуспендировали и инкубировали с очищенным белком CCR8-Fc яванской макаки, связанным с гранулами M280 Tosyl. Несвязанный вирус вымывали, а связанный вирус амплифицировали для последующих циклов. После проведения двух циклов с белком CCR8-Fc яванской макаки связанный пул сортировали в отношении перекрестного связывания белка человека и яванской макаки с 0,1 мкг/мл биотинилированного белка CCR8-Fc яванской макаки и 0,1 мкг/мл белка CCR8-Fc человека. Образцы с наиболее высокой связывающей

способностью в отношении обоих белков собирали, амплифицировали и экстрагировали их ДНК для клонирования в вектор экспрессии млекопитающих для трансфекции CHO и анализа с помощью проточной цитометрии, как подробно описано выше. Легкие цепи, проявившие наилучшее связывание с клеточными линиями 293T-CCR8, перекрестно объединяли в пары с тяжелой цепью антитела-2-3 против CCR8 (H23499), а другие тяжелые цепи разрабатывали на основе CDR3 тяжелой цепи с использованием фага с целью проверки синергического улучшения аффинности. Все антитела 2-7 против CCR8, антитела 2-8 против CCR8, антитела 2-9 против CCR8 и антитела 2-10 против CCR8 продемонстрировали усиленное связывание с клеточными линиями CCR8 как человека, так и яванской макаки, по сравнению с родительским антителом-3 против CCR8 (фиг. 2O - 2V).

Таблица 7: антитела против CCR8

Источник антитела	Номер мАт	Тяжелая цепь (SEQ ID NO)	Легкая цепь (SEQ ID NO)	Аффинность к клеткам 293T-HuCCR8 (нМ)	Аффинность к клеткам 293T-CyCCR8 (нМ)	Связывание с белком HuCCR8-Fc	Связывание с белком CyCCR8-Fc
Родительское	Родительское антитело-3 против CCR8	H23373	L1032	6,8	> 50	++++	++++
Рандомизация HCDR3	Антитело-2-3 против CCR8	91	93	2,5	3,9	++++	++++
Рандомизация HCDR3	Антитело-2-4 против CCR8	21	23	0,96	2,4	++++	++++
Рандомизация HCDR3	Антитело-2-5 против CCR8	21	23	2,9	5,2	+++	+++
Рандомизация HCDR3	Антитело-2-6 против CCR8	151	153	1,5	4,5	+++	+++
Рандомизация HCDR3 и перетасовка VL	Антитело-2-7 против CCR8	31	33	1,3	3,5	++++	+++
Рандомизация HCDR3 и перетасовка VL	Антитело-2-8 против CCR8	71	73	1,5	2,5	++++	+++

Рандомизация HCDR3 и перетасовка VL	Антитело-2-9 против CCR8	61	63	1,5	3,2	++++	++++
Рандомизация HCDR3 и перетасовка VL	Антитело-2-10 против CCR8	81	83	2,4	3,9	+++	+++

Пример 2: антитела связывают CCR8

[0379] Из 17 антител два были выбраны для дальнейшей характеристики: антитело-1 против CCR8, содержащее переменную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41, и переменную легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 43; и антитело-2 против CCR8, содержащее переменную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, и переменную легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13.

[0380] Чтобы проверить, связываются ли антитела против CCR8 с клетками, экспрессирующими CCR8 человека или яванской макаки, клетки 293Т и Raji инфицировали лентивирусом, несущим CCR8 человека или яванской макаки. Линии клеток, экспрессирующие конструкции CCR8, инкубировали с антителами против CCR8 дозозависимым образом при температуре 4°C в течение 30 мин, несвязанные антитела против CCR8 удаляли промыванием, а связанные антитела против CCR8 выявляли с помощью флуоресцентно-конъюгированных вторичных антител против человека при температуре 4°C в течение 30 минут. Результаты показали, что как антитело-1 против CCR8 (фиг. 3А), так и антитело-2 против CCR8 (фиг. 3В) связывались с клеточными линиями, экспрессирующими CCR8 человека, тогда как антитело-2 против CCR8 (фиг. 3В) связывалось с клеточной линией, экспрессирующей CCR8 яванской макаки.

Пример 3: антитела связываются с опухолевыми CCR8⁺ Treg-клетками

[0381] Чтобы проверить, связываются ли антитела против CCR8 с CCR8⁺ Treg-клетками, инфильтрирующие опухоль лейкоциты (ИОЛ) выделяли из недавно удаленных опухолей и высевали в 96-луночные планшеты. ИОЛ инкубировали с панелью флуоресцентно-меченых антител (CD3, CD4, FOXP3) при температуре 4°C для идентификации опухолевых Treg-клеток. В дополнение к этому, антитела против CCR8 инкубировали с ИОЛ в одной концентрации при температуре 4°C в течение 30 минут, несвязанные антитела против CCR8 удаляли промыванием, а связанные антитела против CCR8 выявляли с использованием флуоресцентно-конъюгированных вторичных антител против человека при температуре 4°C в течение 30 минут. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 связывались с опухолевыми CCR8⁺ Treg-клетками (фиг. 4А - 4В).

Пример 4: антитела индуцируют передачу сигналов АЗКЦ в биологическом репортерном анализе АЗКЦ

[0382] Чтобы проверить, индуцируют ли антитела против CCR8 передачу сигналов АЗКЦ, антитела против CCR8 инкубировали с клетками 293Т, принудительно экспрессирующими CCR8 человека или яванской макаки, дозозависимым образом в 96-луночных планшетах в течение 6 часов при температуре 37°C в соответствии с инструкциями производителя. Репортерные клетки антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) CD16 Jurkat совместно культивировали с целевыми клетками в комплексе с антителами против CCR8. По завершении эксперимента передачу сигналов АЗКЦ определяли с помощью считывания биолюминесценции с репортерных клеток АЗКЦ CD16 Jurkat. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 индуцировало передачу сигналов АЗКЦ при использовании клеточной линии, экспрессирующей CCR8 человека, в качестве целевой линии, в то время как антитело-2 против CCR8 индуцировало также передачу сигналов АЗКЦ при использовании клеточной линии, экспрессирующей CCR8 яванской макаки (фиг. 5).

Пример 5: антитела индуцируют АЗКЦ клеток с принудительной экспрессией CCR8 человека и яванской макаки при использовании МКПК в качестве эффекторных клеток

[0383] Чтобы проверить, индуцируют ли антитела против CCR8 АЗКЦ клеток CCR8+, антитела против CCR8 инкубировали с целевыми клетками 293Т или Raji, которые принудительно экспрессируют CCR8 человека, и метили реактивом CellTrace Violet дозозависимым образом в 96-луночных планшетах. МКПК совместно культивировали с целевыми клетками в комплексе с антителами против CCR8 в течение ночи при температуре 37°C. По завершении эксперимента число целевых клеток CCR8+ определяли с помощью проточной цитометрии. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 индуцировало АЗКЦ в клеточных линиях, экспрессирующих CCR8 человека (фиг. 6А), в то время как антитело-2 против CCR8 индуцировало также АЗКЦ в клеточной линии, экспрессирующей CCR8 яванской макаки (фиг. 6В).

Пример 6: антитела индуцируют АЗКЦ клеток с принудительной экспрессией CCR8 человека при использовании НК-клеток в качестве эффекторных клеток

[0384] Чтобы проверить, индуцируют ли антитела против CCR8 АЗКЦ клеток CCR8+, антитела против CCR8 инкубировали с целевыми клетками Raji, которые принудительно экспрессируют CCR8 человека, и метили реактивом CellTrace Violet дозозависимым образом в 96-луночных планшетах. НК-клетки совместно культивировали с целевыми клетками в комплексе с антителами против CCR8 в течение 4 часов при температуре 37°C. По завершении эксперимента число целевых клеток CCR8+ определяли с помощью проточной цитометрии. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 индуцировало АЗКЦ линии клеток, экспрессирующей CCR8 человека (фиг. 7А - 7В).

Пример 7: антитела модулируют маркеры активации НК-клеток в анализе совместного культивирования с клетками с принудительной экспрессией CCR8 человека и уничтожают клетки, экспрессирующие CCR8

[0385] Чтобы проверить, модулируют ли антитела против CCR8 активацию маркеров НК-клеток, антитела против CCR8 инкубировали с целевыми клетками Raji, которые принудительно экспрессируют CCR8 человека, и метили реактивом CellTrace Violet дозозависимым образом в 96-луночных планшетах. НК-клетки совместно культивировали с целевыми клетками в комплексе с антителами против CCR8 в течение ночи при температуре 37°C. По завершении эксперимента оценивали число целевых клеток CCR8+ с помощью

проточной цитометрии, измеряя экспрессию 4-1BB, ICAM-1 и CD16 на клеточной поверхности NK-клеток. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 индуцировало повышение экспрессии 4-1BB и ICAM-1 на клеточной поверхности, в то время как экспрессия CD16 подавлялась на клеточной поверхности NK-клеток (фиг. 8А, фиг. 8С).

[0386] Чтобы проверить, уничтожают ли антитела против CCR8 клетки, экспрессирующие CCR8, антитела инкубировали как с клетками Raji, так и с целевыми клетками Raji, которые принудительно экспрессируют CCR8 человека («клетки Raji-CCR8») и метили реактивом CellTrace Violet дозозависимым образом в 96-луночных планшетах. По завершении эксперимента число целевых клеток CCR8⁺ определяли с помощью проточной цитометрии, измеряя число оставшихся клеток, положительных в отношении CellTrace Violet. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 уничтожало клетки Raji-CCR8 и не уничтожало клетки Raji без CCR8 (фиг. 8В).

Пример 8: антитела индуцируют АЗКЦ опухолевых Treg при использовании NK-клеток в качестве эффекторных клеток

[0387] Чтобы проверить, индуцируют ли антитела против CCR8 АЗКЦ опухолевых CCR8⁺ Treg-клеток, ИОЛ выделяли из недавно удаленных опухолей человека и инкубировали с антителами против CCR8. NK-клетки совместно культивировали с комплексами ИОЛ : антитело в 96-луночных планшетах в течение ночи при температуре 37°C. По завершении эксперимента число опухолевых Treg определяли с помощью проточной цитометрии. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 индуцировало уничтожение опухолевых Treg-клеток человека (фиг. 9А).

Пример 9: антитела индуцируют интернализацию CCR8 в клетках с принудительной экспрессией CCR8 человека

[0388] Чтобы проверить, индуцируют ли антитела против CCR8 интернализацию комплекса CCR8 – IgG, антитела против CCR8 инкубировали с pH-чувствительным реагентом FabFluor для получения антитела – репортера интернализации CCR8. Данное конъюгированное антитело использовали для обработки клеток 293Т с принудительной экспрессией CCR8 человека в течение 30 минут при температуре 37°C. Во время инкубации антител с клетками 293Т указанные антитела связываются с CCR8 и индуцируют интернализацию в кислую эндосому, вызывая флуоресцентный сигнал от конъюгированного реагента FabFluor. По завершении эксперимента флуоресцентный сигнал можно проанализировать с помощью проточной цитометрии и сравнить между конъюгированными антителами. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 индуцировало интернализацию CCR8 при использовании линии клеток, экспрессирующей CCR8 человека, в качестве целевой линии (фиг. 10).

Пример 10: эксперимент по связыванию антител Retrogenix

[0389] Для идентификации целей для антител против CCR8, антитела против CCR8 инкубировали с клетками, принудительно экспрессирующими около 4500 белков клеточной поверхности, находящимися в фиксированном или живом состоянии. Было показано, что антитело-1 против CCR8 связывается только с CCR8, в то время как антитело-2 против CCR8 также связывается с подобным предшественнику амилоида белком 2 (APLP2), но в значительно более низкой концентрации (данные не показаны).

Пример 11: характеристика эпитопов антитела против CCR8

[0390] Чтобы охарактеризовать сайт связывания антител против CCR8, антитела против CCR8 инкубировали с клетками Raji-CCR8 дозозависимым образом в 96-луночных планшетах при температуре 4°C в течение 30 мин. Несвязавшиеся антитела против CCR8 смывали и клетки инкубировали с флуоресцентно-конъюгированными моноклональными антителами человека против CCR8 (коммерчески доступными) в одной концентрации в течение 30 минут при температуре 37°C. По завершении эксперимента связывание указанного коммерчески доступного моноклонального антитела против CCR8 определяли с помощью проточной цитометрии. Полученные результаты показали, что антитело-1 против CCR8 частично блокировало связывание указанного коммерчески доступного моноклонального антитела против CCR8 с клетками, в то время как антитело-2 против CCR8 такого эффекта не имело (фиг. 11).

Пример 12: афукозилированные антитела против CCR8 проявляют повышенную активность АЗКЦ

[0391] Антитело-1 против CCR8 дополнительно оптимизировали с целью удаления звеньев сахара фукозы из области Fc (IgG1) указанного антитела. Чтобы проверить индукцию передачи сигналов АЗКЦ, антитела против CCR8 инкубировали с клетками 293Т, которые принудительно экспрессируют CCR8 человека, дозозависимым образом в 96-луночных планшетах в течение 6 часов при температуре 37°C в соответствии с инструкциями производителя. Либо АЗКЦ-репортерные клетки Jurkat CD16VV, либо АЗКЦ-репортерные клетки Jurkat CD16FF совместно культивировали с целевыми клетками в комплексе с антителами против CCR8. По завершении эксперимента передачу сигналов АЗКЦ определяли с помощью считывания биолюминесценции с репортерных клеток АЗКЦ CD16 Jurkat. Полученные результаты показали, что как антитело-1 против CCR8, так и антитело-2 против CCR8 индуцировало передачу сигналов АЗКЦ при использовании клеточной линии, экспрессирующей CCR8 человека, в качестве целевой линии, в то время как антитело-2 против CCR8 индуцировало также передачу сигналов АЗКЦ при использовании клеточной линии, экспрессирующей CCR8 яванской макаки (фиг. 12А - 12В). Повышенная активность наблюдалась при высоко- и низкоаффинных аллельных полиморфизмах.

Пример 12: антитела связывают опухолевые Treg и индуцируют АЗКЦ

[0392] Чтобы проверить, связывают ли антитела против CCR8 опухолевые Treg и индуцируют ли АЗКЦ, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ИОЛ) выделяли из недавно удаленных опухолей почки и молочной железы, и инкубировали с антителом-1 против CCR8. Связывание антитела-1 против CCR8 измеряли с использованием ФЭ-конъюгированного антитела против IgG человека (фиг. 13А), а приобретенное коммерческим образом очищенное антитело против CD213a1 человека (ИЛ-13-Р α 1) использовали в качестве положительного контроля (номер по каталогу Biolegend: 360404). Как показано на фиг. 13А, треугольники отображают ИОЛ из опухолей почки, а кружки отображают ИОЛ из опухолей молочной железы. Все данные были получены с помощью проточной цитометрии.

[0393] В последующем эксперименте изолированные ИОЛ из недавно удаленных опухолей почки и молочной железы инкубировали с аллогенными NK-клетками и антителом-1 против CCR8 – могамулизумабом, или с изотипическим контролем, в течение 24 часов. Процентное содержание клеток CD3+, которые представляли собой либо Treg-клетки (FoxP3+), либо другие типы лимфоцитов (FoxP3-), измеряли с помощью проточной цитометрии. В присутствии NK-клеток антитело-1 против CCR8 приводило к значительной потере Treg-клеток, не влияя на популяцию клеток, не являющихся Treg.

[0394] В совокупности эти данные показывают, что антитело-1 против CCR8 связывает опухолевые Treg-клетки и вызывает опосредованную NK-клетками АЗКЦ.

Таблица 8: последовательности

SEQ ID NO:	Последовательность
1	VQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGRESYRVSLRFDYWGQGTLLTVSS
3	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLT
5	DYAMH
6	GISWNSGSIGYADSVKG
7	GRESYRVSLRFDY
8	SGSSSNIGNNYVS
9	DNNKRPS
10	GTWDSLSAWV
11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFSAYTMNWVRQAPGKGLEWVSAISASGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRFARGWFDPWGQGTLLTVSS
13	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLT
15	AYTMN
16	AISASGGRTYYADSVKG
17	RFARGWFDP
18	SGSSSNIGNNYVS
19	DNNKRPS
20	GTWDSLSAWV
21	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGRKS YRVSLRFDYWGQGT LTVSS
23	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLT
25	DYAMH
26	GISWNSGSIGYADSVKG
27	GRKSYRVSLRFDY
28	SGSSSNIGNNYVS
29	DNNKRPS
30	GTWDSLSAWV

31	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGRDSYRKSLRFDYWGQGT LVTVSS
33	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSGSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKMLIYDNTRRPSGIP DRFSGSKSDTSATLGITGLQTGDEADYYCGAWDSSLRMWVFGGGTKLTVL
35	DYAMH
36	GISWNSGSIGYADSVKG
37	GRDSYRKSLRFDY
38	TGSGSNIGNNYVS
39	DNTRRPS
40	GAWDSSLRMWV
41	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARAVRNRF RFDYWGQGT LVTVSS
42	
43	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVS WYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSSTFVVFGGGTKLTVL
45	SYMH
46	IINPSGGSTSYAQKFQG
47	AVRNRF RFDY
48	TGTSSDVGSYNLVS
49	EVKRPS
50	SSYAGSSTFVV
51	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAARGFIFSGYTMLWVRQAPGKGLEWVSAITASGGRT YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRFARGW FDPWGQGT LVT VSS
53	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDN NKRPSGIP DRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTW DSSL SAWVFGGGTKLT
55	GYTML
56	AITASGGRTYYADSVKG
57	RFARGW FDP
58	SGSSNIGNNYVS
59	DNNKRPS
60	GTWDSSL SAWV
61	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGRKS YRDSL RFDYWGQGT LVTVSS
63	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSGSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKMLIYDNTRRPSGIP DRFSGSKSDTSATLGITGLQTGDEADYYCGAWDSSLRMWVFGGGTKLTVL
65	DYAMH
66	GISWNSGSIGYADSVKG

67	GRKSYRDSLRFDY
68	TGSGSNIGNNYVS
69	DNTRRPS
70	GAWDSSLRMWV
71	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGRRSYRDSLRFDYWGQGT LVTVSS
73	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSGSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKMLIYDNTRRPSGIP DRFSGSKSDTSATLGITGLQTGDEADYYCGAWDSSLRMWVFGGGTKLTVL
75	DYAMH
76	GISWNSGSIGYADSVKG
77	GRRSYRDSLRFDY
78	TGSGSNIGNNYVS
79	DNTRRPS
80	GAWDSSLRMWV
81	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGRKSRYRDSLRFDYWGQGT LVTVSS
83	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGTSSNIGKNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDDNKRPSGIPD RFSGSKSATSATLGITGLQTGDGADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL
85	DYAMH
86	GISWNSGSIGYADSVKG
87	GRKSYRDSLRFDY
88	SGTSSNIGKNFVS
89	DDNKRPS
90	GTWDSLSAWV
91	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGRKSRYRDSLRFDYWGQGT LVTVSS
93	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIP DRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL
95	DYAMH
96	GISWNSGSIGYADSVKG
97	GRKSYRDSLRFDY
98	SGSSSNIGNNYVS
99	DNNKRPS
100	GTWDSLSAWV
101	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGVGNFRFDYWGQGT VT

103	QSALTQPPSVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYNLVSWYQQHPGNAPKLMYEVTKRPSGV SNRFSGSKSGNTATLTISGLQAEDEADYHCSSYAGSITHVVFVGGGTKLTVL
105	SYVMH
106	IINPSGGSTSYAQKFQG
107	GVGNGFRFDY
108	TGTSSDVGTYNLVS
109	EVTKRPS
110	SSYAGSITHVV
111	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGVGNFRFDYWGQGL VT
113	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSGDVGSYSLVSWYQHHPRAPKLIYEVNKRPSGV DRFSGSKSGNTASLTITGLQAEDEAHYFCSSYTGNNINLPVVFVGGGTKLTVL
115	SYVMH
116	IINPSGGSTSYAQKFQG
117	GVGNGFRFDY
118	TGTSGDVGSYSLVS
119	EVNKRPS
120	SSYTGNNINLPVV
121	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGVGNFRFDYWGQGL VT
123	QSALTQPPSVSGSPGQSITISCSGTSSDVGTYNLVSWYQQHPGKAPKLIYEVIKRPSGISN RFSFGKSGNTASLTISGLQAEDEADYICSSYAGPVTYVVFVGGGTKLTVL
125	SYVMH
126	IINPSGGSTSYAQKFQG
127	GVGNGFRFDY
128	SGTSSDVGTYNLVS
129	EVIKRPS
130	SSYAGPVTYVV
131	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGVGNFRFDYWGQGL VT
133	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGTSSNIGKYNLVSQHPGEAPTLIYEATKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYICSSYAGSRVVFVGGGTKLTVL
135	SYVMH
136	IINPSGGSTSYAQKFQG
137	GVGNGFRFDY
138	SGTSSNIGKYNLVS
139	EATKRPS
140	SSYAGSRVFFV

141	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGVGNFRFDYWGQGL VT
143	QSALTQPPSVSGSPGQSITISCSGTSSDVGSYNLVSQEPGKAPKLIIEVNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYHCSSYAGSSTYVVFVGGGTKLTVL
145	SYMH
146	IINPSGGSTSYAQKFG
147	GVGNFRFDY
148	SGTSSDVGSYNLVS
149	EVNRPS
150	SSYAGSSTYV
151	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGVSYRESLRFDYWGQGL LVT
153	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIP DRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL
155	DYMH
156	GISWNSGSIYADSVKG
157	GRVSYRESLRFDY
158	SGSSNIGNNYVS
159	DNNKRPS
160	GTWDSLSAWV
161	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFSAYTMNWRQAPGKLEWVSAISASGGRT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRFARGWFDWPWGQGLTVL
163	QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSTSNIGNHYVSWYQQLPRAVPKLVYDNDKRPSGIS DRFSGSRSGTSATLDISGLQAGDEADYCATWDYSLTAVVFGGGTKLTVL
165	AYTMN
166	AISASGGRTYYADSVKG
167	RFARGWFDP
168	SGSTSNIGNHYVS
169	DNDKRPS
170	ATWDYSLTAVV
171	MDYTLDLSTVTTVDYYPDIFSSPCDAELIQTNGKLLAVFYCLLFVFSLLGNSLVILVL VVCKKLRISIT DVYLLNLALSDLLFVFSFPFQTYLLDQWVFGTVMCKVVSIFYIGFYSSMFFITLMSV DRYLAVVHAVY ALKVRTIRMGTTLCLAVWLTAIMATIPLLIFYQVASEDGVLCYSFYNQQLKWKIFTN FKMNILGLLIP FTIFMFCYIKILHQLKRCQNHNKTKAIRLVLIVVIASLLFWVPFNVFLFVLSLHSMHILDG CSISQQLTY

	ATHVTEIISFTHCCVNPVIYAFVGEKFKKHLSEIFQKSCSQIFNYLGRQMPRESCEKSSSC QQHSSRSSS VDYIL
172	MDYTLDL SVTTVTDY YYPDIFSSPCDAELIQTNGK
173	MGWSC IILFLVATATGAHSM DYTLDL SVTTVTDY YYPDIFSSPSDAELIQTNGKHHHHH HSGGGGSEPRG PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVN NVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWM S GKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVV HEGLHNHHTTKSFSRTPGK
174	MGWSC IILFLVATATGAHSM DYTLDP SMTTMDY YYPDLSLSSPSDGELIQRNDKHHHH HSGGGGSEPRG PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVN NVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWM S GKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVV HEGLHNHHTTKSFSRTPGK
175	MGWSC IILFLVATATGAHS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с одной или большим числом аминокислот в N-концевом внеклеточном домене CCR8 человека.
2. Антитело, заявленное в п. 1, которое способно:
 - (a) усиливать иммунный ответ на опухоль;
 - (b) снижать или истощать уровень инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («Трег-клеток»), или уничтожать их;
 - (c) индуцировать интернализацию CCR8 в инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клетках («Трег-клетках»);
 - (d) активировать NK-клетки;
 - (e) индуцировать опосредованное NK-клетками уничтожение инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («Трег-клеток»);
 - (f) связываться с CCR8 яванской макаки («ЯМ»);
 - (g) связываться с CCR8 человека с показателем K_D , равным 10 нМ или меньше, измеренным с помощью анализа BIACORE™; или
 - (h) любая комбинация вышеперечисленного.
3. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 1 или п. 2, отличающиеся тем, что указанный N-концевой внеклеточный домен CCR8 человека содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 172.
4. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-3, которые связываются с по меньшей мере двумя, с по меньшей мере тремя, с по меньшей мере четырьмя, с по меньшей мере пятью, с по меньшей мере шестью, с по меньшей мере семью, с по меньшей мере восемью, с по меньшей мере девятью или с по меньшей мере десятью аминокислотами, указанными в SEQ ID NO: 172.
5. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-4, которые связываются с по меньшей мере двумя, с по меньшей мере тремя, с по меньшей мере четырьмя, с по меньшей мере пятью, с по меньшей мере шестью, с по меньшей мере семью, с по меньшей мере восемью, с по меньшей мере девятью или с по меньшей мере десятью последовательно расположенными аминокислотами, указанными в SEQ ID NO: 172.
6. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-6, которые связываются с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 180-200.
7. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-7, которые дополнительно связывают CCR8 ЯМ.
8. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-7, которые связывают CCR8 человека с показателем K_D , равным 10 нМ или меньше, как измерено с помощью анализа BIACORE™.

9. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-8, которые связывают CCR8 человека с показателем K_D , равным 1 нМ или меньше, как измерено с помощью анализа BIACORE™.
10. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-9, которые индуцируют антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) у субъекта после введения указанного антитела против CCR8.
11. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 10, отличающиеся тем, что указанная АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным 1 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части.
12. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 10 или п. 11, отличающиеся тем, что указанная АЗКЦ характеризуется показателем EC50, равным 0,1 мкг/мл или меньше, после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части.
13. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-12, которые способны индуцировать активацию NK-клеток.
14. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-13, которые способны индуцировать повышение уровня 4-1BB, ICAM-1 или как 4-1BB, так и ICAM-1, на поверхности NK-клеток.
15. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-14, которые способны индуцировать снижение уровня CD16 на поверхности NK-клеток у указанного субъекта.
16. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-15, которые способны индуцировать опосредованное NK-клетками уничтожение инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток у указанного субъекта.
17. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-16, которые индуцируют истощение уровня инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток у субъекта после введения указанного антитела или его антигенсвязывающей части по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток до указанного введения.
18. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 17, отличающиеся тем, что уровень инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток истощается по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45% или по меньшей мере на около 50% по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток до указанного введения.
19. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-18, которые индуцируют интернализацию CCR8 инфильтрирующими опухоль T_{reg}-клетками.

20. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-19, содержащие переменную тяжелую цепь (VH), содержащую область, определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH; при этом указанная CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157 и 167.
21. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 21, отличающиеся тем, что указанная CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156 и 166.
22. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 21-25, отличающиеся тем, что указанная CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155 и 165.
23. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 21-28, отличающиеся тем, что указанная CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 и 170.
24. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 21-31, отличающиеся тем, что указанная CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159 и 169.
25. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 21-34, отличающиеся тем, что указанная CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158 и 168.
26. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-6 и пп. 8-25, которые не связываются с CCR8 ЯМ.
27. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 26, содержащие переменную тяжелую цепь (VH), содержащую область, определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH; при этом указанная CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 47, 107, 117, 137 и 147.
28. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 27, отличающиеся тем, что указанная CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 46, 106, 116, 136 и 146.

29. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 27 или п. 28, отличающиеся тем, что указанная CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 45, 105, 115, 135 и 145.
30. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 27-29, отличающиеся тем, что указанная CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 50, 110, 120, 140 и 150.
31. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 27-30, отличающиеся тем, что указанная CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 49, 109, 119, 139 и 149.
32. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 27-31, отличающиеся тем, что указанная CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 48, 108, 118, 138 и 148.
33. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 27-32, которые содержат:
- (a) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 46, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50;
 - (b) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 105, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 106, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 107, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 108, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 109, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 110;
 - (c) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 115, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 116, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 117, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 118, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 119, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 120;
 - (d) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 135, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную

в SEQ ID NO: 136, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 138, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 139, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 140; или

- (e) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 145, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 146, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 147, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 148, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 149, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 150.

34. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 27-33, отличающиеся тем, что указанная цепь VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 41, 101, 111, 131 и 141.

35. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 27-34, отличающиеся тем, что указанная цепь VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 42, 102, 112, 132 и 142.

36. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 27-35, которые содержат:

- (a) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42;
- (b) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 101, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 102;
- (c) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 111, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 112;
- (d) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 131, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 132; или
- (e) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 141, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 142.

37. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-6 и пп. 8-25, которые связывают CCR8 человека и CCR8 ЯМ.
38. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 37, содержащие вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую область, определяющую комплементарность (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH; при этом указанная CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 67, 77, 87, 97, 127, 157 и 167.
39. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 38, отличающиеся тем, что указанная CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 56, 66, 76, 86, 96, 126, 156 и 166.
40. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в п. 38 или п. 39, отличающиеся тем, что указанная CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 55, 65, 75, 85, 95, 125, 155 и 165.
41. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 38-40, отличающиеся тем, что указанная CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 130, 160 и 170.
42. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 38-41, отличающиеся тем, что указанная CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 59, 69, 79, 89, 99, 129, 159 и 169.
43. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 38-42, отличающиеся тем, что указанная CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 58, 68, 78, 88, 98, 128, 158 и 168.
44. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 38-43, которые содержат:
- (a) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7, CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10;
 - (b) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность,

45. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 38-44, отличающиеся тем, что указанная цепь VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 51, 61, 71, 81, 91, 121, 151 и 161.
46. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 37-45, отличающиеся тем, что указанная цепь VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 52, 62, 72, 82, 92, 122, 152 и 162.
47. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 37-46, которые содержат:
- (a) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2;
 - (b) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12;
 - (c) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22;
 - (d) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32;
 - (e) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52;
 - (f) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62;
 - (g) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72;
 - (h) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 81, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 82;

- (i) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92;
 - (j) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 121, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 122;
 - (k) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 151, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 152; или
 - (l) цепь VH, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 161, и цепь VL, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 162.
48. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-47, которые представляют собой антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.
49. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-48, которые содержат одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) антитела.
50. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-49, которые представляют собой биспецифическое антитело, привлекающий Т-клетки биспецифический активатор (BiTE), мультиспецифическое антитело, бипаратопное антитело, иммуноконъюгат, конъюгат антитело – лекарственный препарат или любую их комбинацию.
51. Биспецифическое антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-49.
52. BiTE, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-49.
53. Мультиспецифическое антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-49.
54. Бипаратопное антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-49.
55. Биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, BiTe, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, или бипаратопное антитело, заявленное в п. 54, которые содержат первый домен VH, содержащий первую CDR1 VH, первую CDR2 VH и первую CDR3 VH; первый домен VL, содержащий первую CDR1 VL, первую CDR2 VL и первую CDR3 VL; второй домен VH, содержащий вторую CDR1 VH, вторую CDR2 VH и вторую CDR3 VH; и второй домен VL, содержащий вторую CDR1 VL, вторую CDR2 VL и вторую CDR3 VL; при этом

- (a) указанная первая CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 45, 105, 115, 135 и 145;
- (b) указанная первая CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 46, 106, 116, 136 и 146; и
- (c) указанная первая CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 47, 107, 117, 137 и 147.

56. Биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, BiTe, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, или бипаратопное антитело, заявленное в п. 54, отличающиеся тем, что:

- (a) указанная первая CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 48, 108, 118, 138 и 148;
- (b) указанная первая CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 49, 109, 119, 139 и 149; и
- (c) указанная первая CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 50, 110, 120, 140 и 150.

57. Бипаратопное антитело, заявленное в п. 55 или п. 56, отличающееся тем, что:

- (a) указанная вторая CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 55, 65, 75, 85, 95, 125, 155 и 165;
- (b) указанная вторая CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 56, 66, 76, 86, 96, 126, 156 и 166; и
- (c) указанная вторая CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 57, 67, 77, 87, 97, 127, 157 и 167.

58. Бипаратопное антитело, заявленное в любом из пп. 55-57, отличающееся тем, что:

- (a) указанная вторая CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 58, 68, 78, 88, 98, 128, 158 и 168;
 - (b) указанная вторая CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 59, 69, 79, 89, 99, 129, 159 и 169; и
 - (c) указанная вторая CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 130, 160 и 170.
59. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-49.
60. Иммуноконъюгат, заявленный в п. 59, который представляет собой конъюгат антитело – лекарственный препарат.
61. Химерный антигенный рецептор (ХАР), содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-49.
62. Т-клеточный рецептор (ТКР), содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-49.
63. Молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, ViTE, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, бипаратопное антитело, заявленное в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгат, заявленный в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленный в п. 61, или ТКР, заявленный в п. 62.
64. Вектор или набор векторов, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, заявленные в п. 63.
65. Клетка, содержащая ХАР, заявленный в п. 61, ТКР, заявленный в п. 62, молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, заявленные в п. 63, либо вектор или набор векторов, заявленные в п. 64.
66. Клетка, заявленная в п. 65, которая представляет собой клетку-хозяина.
67. Клетка, заявленная в п. 65 или п. 66, которая представляет собой иммунокомпетентную клетку.
68. Клетка, заявленная в любом из пп. 65-67, которая представляет собой Т-клетку.
69. Фармацевтическая композиция, которая содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, заявленные в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, ViTE, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, бипаратопное антитело, заявленное в

- любом из пп. 54-58, иммуноконъюгат, заявленный в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленный в п. 61, ТКР, заявленный в п. 62, молекулу нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновой кислоты, заявленные в п. 63, вектор или набор векторов, заявленные в п. 64, или клетку, заявленную в любом из пп. 65-68, и фармацевтически приемлемый носитель.
70. Способ лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту антитела или его антигенсвязывающей части, заявленных в любом из пп. 1-50, биспецифического антитела, заявленного в п. 51, ViTE, заявленного в п. 52, мультиспецифического антитела, заявленного в п. 53, бипаратопного антитела, заявленного в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгата, заявленного в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленного в п. 61, ТКР, заявленного в п. 62, молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновой кислоты, заявленных в п. 63, вектора или набора векторов, заявленных в п. 64, клетки, заявленной в любом из пп. 65-68, или фармацевтической композиции, заявленной в п. 69.
71. Способ снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («T_{reg}-клеток»), или их уничтожения, включающий в себя приведение Treg-клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью, заявленными в любом из пп. 1-50, биспецифическим антителом, заявленным в любом из пп. 1-50, биспецифическим антителом, заявленным в п. 51, ViTE, заявленным в п. 52, мультиспецифическим антителом, заявленным в п. 53, бипаратопным антителом, заявленным в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгатом, заявленным в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленным в п. 61, ТКР, заявленным в п. 62, молекулой нуклеиновой кислоты или набором молекул нуклеиновой кислоты, заявленными в п. 63, вектором или набором векторов, заявленными в п. 64, клеткой, заявленной в любом из пп. 65-68, или фармацевтической композицией, заявленной в п. 69.
72. Способ активации NK-клеток или индукции опосредованного NK-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток («T_{reg}-клеток»), включающий в себя приведение T_{reg}-клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью, заявленными в любом из пп. 1-50, биспецифическим антителом, заявленным в любом из пп. 1-50, биспецифическим антителом, заявленным в п. 51, ViTE, заявленным в п. 52, мультиспецифическим антителом, заявленным в п. 53, бипаратопным антителом, заявленным в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгатом, заявленным в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленным в п. 61, ТКР, заявленным в п. 62, молекулой нуклеиновой кислоты или набором молекул нуклеиновой кислоты, заявленными в п. 63, вектором или набором векторов, заявленными в п. 64, клеткой, заявленной в любом из пп. 65-68, или фармацевтической композицией, заявленной в п. 69.
73. Способ, заявленный в п. 71 или п. 72, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт осуществляется *in vitro* или *ex vivo*.
74. Способ, заявленный в п. 71 или п. 72, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт осуществляется *in vivo*.
75. Способ, заявленный в любом из пп. 70-74, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют активацию NK-клеток.

76. Способ, заявленный в любом из пп. 70-75, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют повышение уровня 4-1BB, ICAM-1 или как 4-1BB, так и ICAM-1, на поверхности NK-клеток.
77. Способ, заявленный в любом из пп. 70-76, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют снижение уровня CD16 на поверхности NK-клеток.
78. Способ, заявленный в любом из пп. 70-77, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют опосредованное NK-клетками уничтожение инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток.
79. Способ, заявленный в любом из пп. 70-78, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть истощают уровень инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток в отсутствие указанного антитела или его антигенсвязывающей части.
80. Способ, заявленный в любом из пп. 70-79, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть истощают уровень инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45% или по меньшей мере на около 50% по сравнению с уровнем инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток в отсутствие указанного антитела или его антигенсвязывающей части.
81. Способ, заявленный в любом из пп. 70-80, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть индуцируют интернализацию CCR8 инфильтрирующими опухоль T_{reg}-клетками.
82. Способ, заявленный в любом из пп. 70-81, отличающийся тем, что указанная опухоль выбрана из группы, состоящей из следующего: саркома Капоши, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, мантийноклеточная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, лимфома Беркитта и В-клеточная лимфома маргинальной зоны, истинная полицитемия, лимфома, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, солидные опухоли, саркомы и карциномы, фибросаркома, микросаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосаркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, саркома толстой кишки, колоректальная карцинома, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатоцеллюлярная карцинома

(ГЦК), гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, немелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома, ретинобластома, карцинома носоглотки, карцинома пищевода, базальноклеточная карцинома, рак желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарцинома, колоректальный рак, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаза, рак органов головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого (мелкоклеточный, крупноклеточный), меланома, нейробластома; рак полости рта (например, рак губы, языка, рта и глотки), рак яичника, рак поджелудочной железы, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак прямой кишки; рак дыхательной системы, саркома, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы, или любая комбинация вышеперечисленного.

83. Способ, заявленный в любом из пп. 70-82, отличающийся тем, что указанная опухоль является рефрактерной или рецидивирующей.
84. Способ, заявленный в любом из пп. 70-83, отличающийся тем, что указанная опухоль является запущенной, местно-распространенной или метастатической.
85. Способ, заявленный в любом из пп. 70-84, дополнительно включающий в себя введение дополнительного противоопухолевого агента.
86. Способ, заявленный в п. 85, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент выбран из малой молекулы, полипептида, лучевой терапии, хирургического вмешательства и их комбинации.
87. Способ, заявленный в п. 85 или п. 86, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя химиотерапию.
88. Способ, заявленный в п. 87, отличающийся тем, что указанная химиотерапия включает в себя химиотерапию на основе платины.
89. Способ, заявленный в любом из пп. 85-88, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя антагонист PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор TIM-3, ингибитор LAG-3, ингибитор TIGIT, ингибитор CD112R, ингибитор TAM, агонист STING, агонист 4-1BB, ингибитор CCL22, агент, индуцирующий активацию NK-клеток, или их комбинацию.
90. Способ, заявленный в любом из пп. 85-89, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя антагонист PD-1.

91. Способ, заявленный в п. 90, отличающийся тем, что указанный антагонист PD-1 выбран из группы, состоящей из PDR001, ниволумаба, пембролизумаба, пидилизумаба, MEDI0680, REGN2810, TSR-042, PF-06801591 и AMP-224.
92. Способ, заявленный в любом из пп. 85-91, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор PD-L1.
93. Способ, заявленный в п. 92, отличающийся тем, что указанный ингибитор PD-L1 выбран из группы, состоящей из FAZ053, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и BMS-936559.
94. Способ, заявленный в любом из пп. 85-93, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя противоопухолевый агент, выбранный из группы, состоящей из сунитиниба (SUTENT[®]), кабозантиниба (CABOMETYX[®]), акситиниба (INLYTA[®]), ленватиниба (LENVIMA[®]), эверолимуса (AFINITOR[®]), бевацизумаба (AVASTIN[®]), эпакадостата, NKTR-214 (агониста смещенной активности к CD-122), тивозаниба (FOTIVDA[®]), абексिनостата, ипилимумаба (YERVOY[®]), тремелимумаба, пазопаниба (VOTRIENT[®]), сорафениба (NEXAVAR[®]), темсиролимуса (TORISEL[®]), рамуцирумаба (CYRAMZA[®]), нирапариба, саволитиниба, вороланиба (X-82), регорафениба (STIVARGO[®]), донафениба (мультикиназного ингибитора), камрелизумаба (SHR-1210), пексастимогена девацирепвека (JX-594), рамуцирумаба (CYRAMZA[®]), апатиниба (YN968D1), инкапсулированного доксорубина (THERMODOX[®]), тивантиниба (ARQ197), ADI-PEG 20, биниметиниба, апатиниба мезилата, нинтеданиба, лирилумаба, ниволумаба (OPDIVO[®]), пембролизумаба (KEYTRUDA[®]), атезолизумаба (TECENTRIQ[®]), авелумаба (BAVENCIO[®]), дурвалумаба (IMFIMZI[®]), цемиплимаба-gwlc (LIBTAYO[®]), тислелизумаба, спартализумаба и любой их комбинации.
95. Способ, заявленный в любом из пп. 85-94, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор TIM-3.
96. Способ, заявленный в п. 95, отличающийся тем, что указанный ингибитор TIM-3 представляет собой MGB453 или TSR-022.
97. Способ, заявленный в любом из пп. 85-96, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор LAG-3.
98. Способ, заявленный в п. 97, отличающийся тем, что указанный ингибитор LAG-3 выбран из группы, состоящей из LAG525, BMS-986016 и TSR-033.
99. Способ, заявленный в любом из пп. 85-98, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор TIGIT.
100. Способ, заявленный в любом из пп. 85-99, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор CD112R.
101. Способ, заявленный в любом из пп. 85-100, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор TAM (Axl, Mer, Tyro).

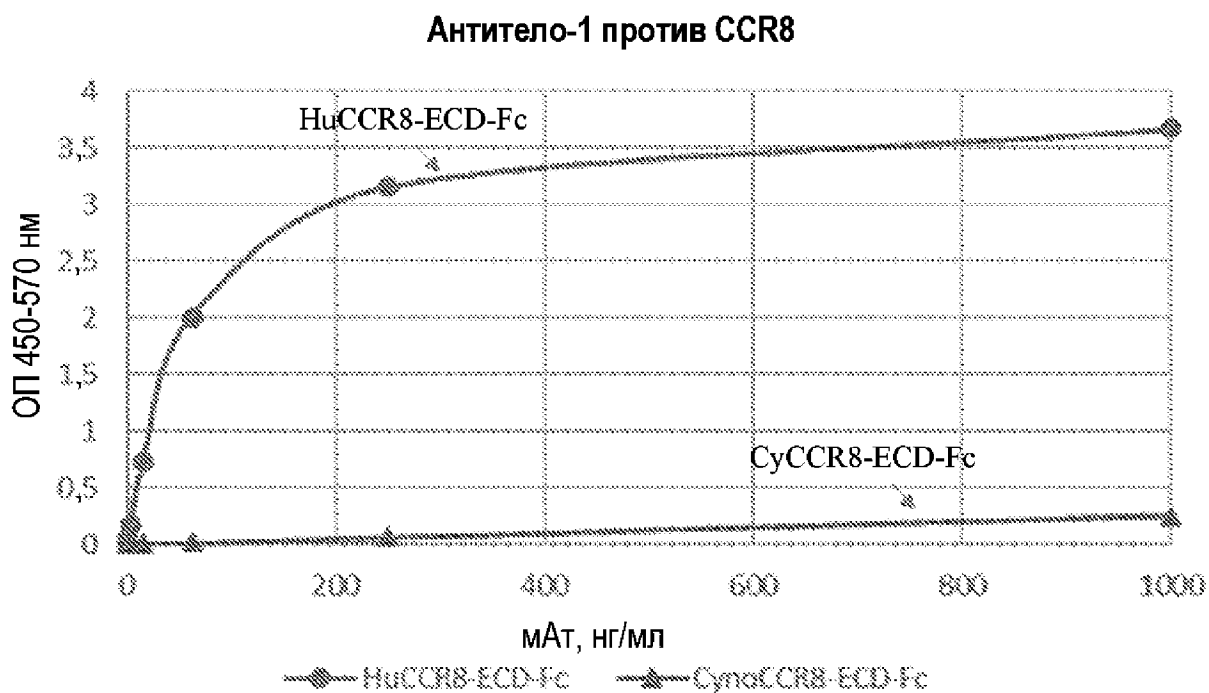
102. Способ, заявленный в любом из пп. 85-101, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя агонист 4-1ВВ.
103. Способ, заявленный в любом из пп. 85-102, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор тирозинкиназы (ИТК).
104. Способ, заявленный в любом из пп. 85-103, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя ингибитор ССL2.
105. Способ, заявленный в любом из пп. 85-104, отличающийся тем, что указанный дополнительный противоопухолевый агент включает в себя агент, индуцирующий активацию NK-клеток.
106. Способ, заявленный в любом из пп. 85-105, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть вводятся до введения указанного дополнительного противоопухолевого агента.
107. Способ, заявленный в любом из пп. 85-105, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть вводятся после введения указанного дополнительного противоопухолевого агента.
108. Способ, заявленный в любом из пп. 85-105, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть и указанный дополнительный противоопухолевый агент вводятся совместно.
109. Способ получения антитела или его антигенсвязывающей части, включающий в себя культивирование клетки, заявленной в любом из пп. 65-68, в подходящих условиях.
110. Способ, заявленный в п. 109, дополнительно включающий в себя выделение указанного антитела или его антигенсвязывающей части.
111. Применение антитела или его антигенсвязывающей части, заявленных в любом из пп. 1-50, биспецифического антитела, заявленного в любом из пп. 1-50, биспецифического антитела, заявленного в п. 51, ViTE, заявленного в п. 52, мультиспецифического антитела, заявленного в п. 53, бипаратопного антитела, заявленного в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгата, заявленного в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленного в п. 61, ТКР, заявленного в п. 62, молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновой кислоты, заявленных в п. 63, вектора или набора векторов, заявленных в п. 64, клетки, заявленной в любом из пп. 65-68, или фармацевтической композиции, заявленной в п. 69, для производства медицинского препарата для лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.
112. Применение антитела или его антигенсвязывающей части, заявленных в любом из пп. 1-50, биспецифического антитела, заявленного в любом из пп. 1-50, биспецифического антитела, заявленного в п. 51, ViTE, заявленного в п. 52, мультиспецифического антитела, заявленного в п. 53, бипаратопного антитела, заявленного в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгата, заявленного в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленного в п. 61, ТКР, заявленного в п. 62, молекулы нуклеиновой кислоты или

- набора молекул нуклеиновой кислоты, заявленных в п. 63, вектора или набора векторов, заявленных в п. 64, клетки, заявленной в любом из пп. 65-68, или фармацевтической композиции, заявленной в п. 69, для производства медицинского препарата для снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток, или их уничтожения, у субъекта, нуждающегося в этом.
113. Применение антитела или его антигенсвязывающей части, заявленных в любом из пп. 1-50, биспецифического антитела, заявленного в любом из пп. 1-50, биспецифического антитела, заявленного в п. 51, ViTE, заявленного в п. 52, мультиспецифического антитела, заявленного в п. 53, бипаратопного антитела, заявленного в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгата, заявленного в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленного в п. 61, ТКР, заявленного в п. 62, молекулы нуклеиновой кислоты или набора молекул нуклеиновой кислоты, заявленных в п. 63, вектора или набора векторов, заявленных в п. 64, клетки, заявленной в любом из пп. 65-68, или фармацевтической композиции, заявленной в п. 69, для производства медицинского препарата для активации НК-клеток или индукции опосредованного НК-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток у субъекта, нуждающегося в этом.
114. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, ViTE, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, бипаратопное антитело, заявленное в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгат, заявленный в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленный в п. 61, ТКР, заявленный в п. 62, молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновой кислоты, заявленные в п. 63, вектор или набор векторов, заявленные в п. 64, клетка, заявленная в любом из пп. 65-68, или фармацевтическая композиция, заявленная в п. 69, для применения в способе лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.
115. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, ViTE, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, бипаратопное антитело, заявленное в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгат, заявленный в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленный в п. 61, ТКР, заявленный в п. 62, молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновой кислоты, заявленные в п. 63, вектор или набор векторов, заявленные в п. 64, клетка, заявленная в любом из пп. 65-68, или фармацевтическая композиция, заявленная в п. 69, для применения в способе снижения или истощения уровня инфильтрирующих опухоль T_{reg} -клеток, или их уничтожения, у субъекта, нуждающегося в этом.
116. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, ViTE, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, бипаратопное антитело, заявленное в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгат, заявленный в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленный в п. 61, ТКР, заявленный в п. 62, молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновой кислоты, заявленные в п. 63, вектор или набор векторов, заявленные в п. 64, клетка, заявленная в любом из пп. 65-68, или фармацевтическая композиция, заявленная в п. 69, для применения в способе

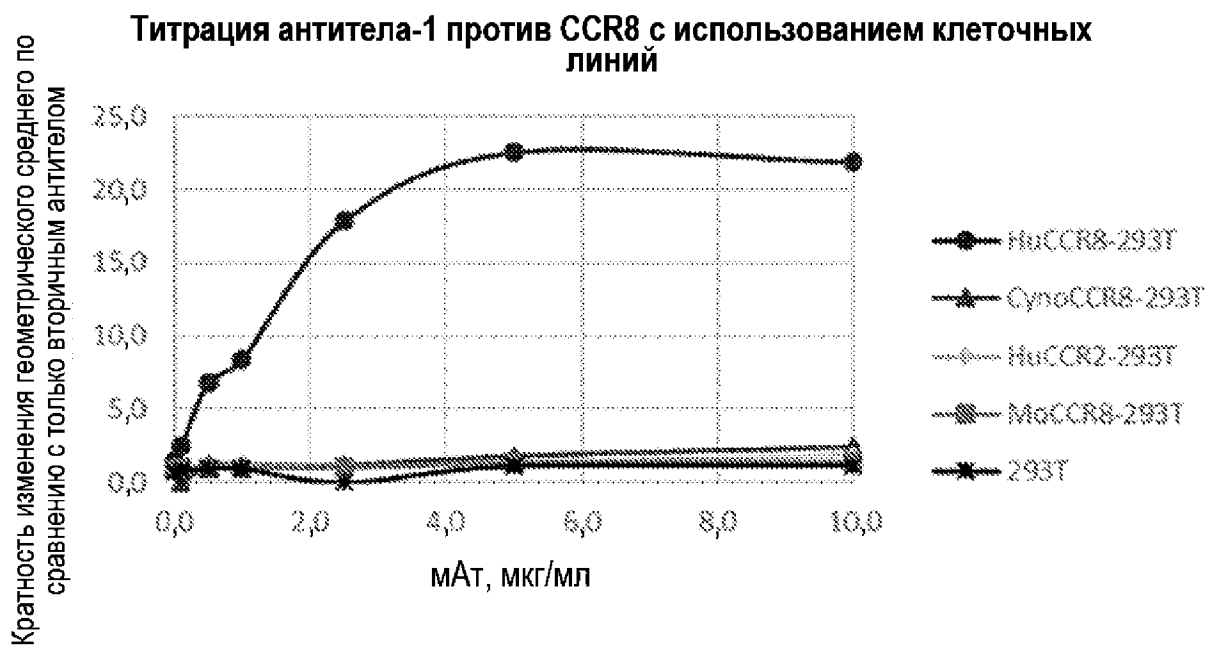
активации NK-клеток или индукции опосредованного NK-клетками уничтожения инфильтрирующих опухоль T_{reg}-клеток у субъекта, нуждающегося в этом.

117. Антитело или его антигенсвязывающая часть, заявленные в любом из пп. 1-50, биспецифическое антитело, заявленное в п. 51, ViTE, заявленный в п. 52, мультиспецифическое антитело, заявленное в п. 53, бипаратопное антитело, заявленное в любом из пп. 54-58, иммуноконъюгат, заявленный в п. 59 или п. 60, ХАР, заявленный в п. 61, или ТКР, заявленный в п. 62, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть являются афукозилированными.
118. Способ, заявленный в любом из пп. 70-110, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающая часть являются афукозилированными.

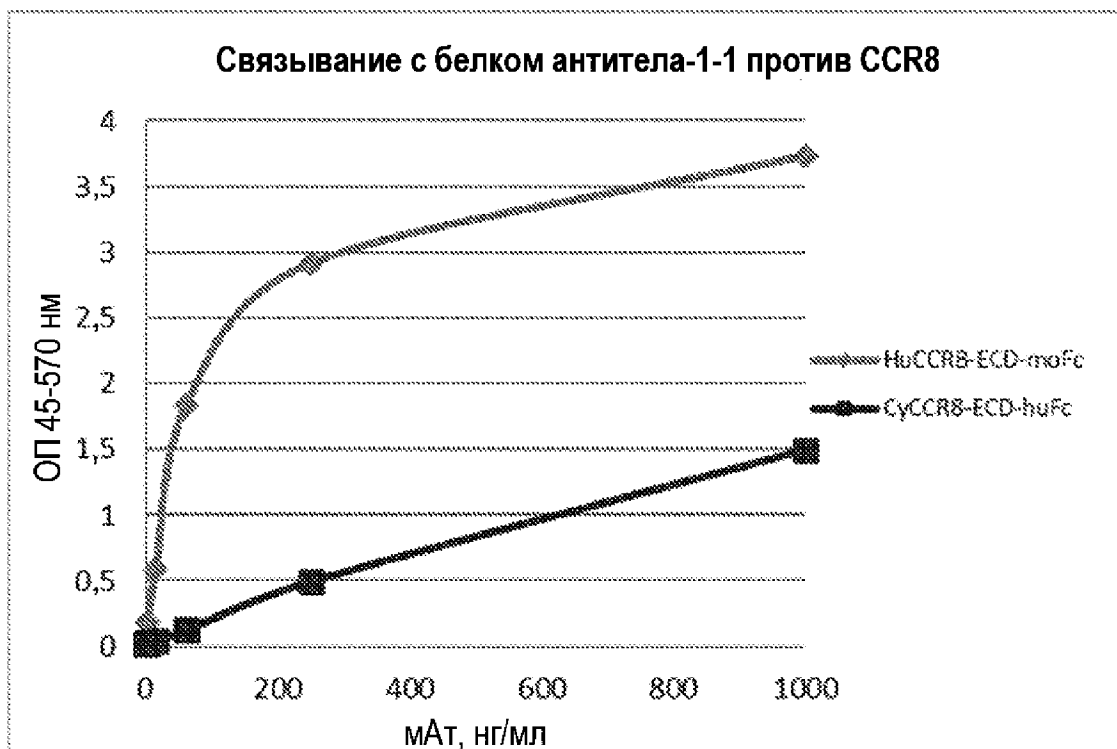
Фиг. 1А



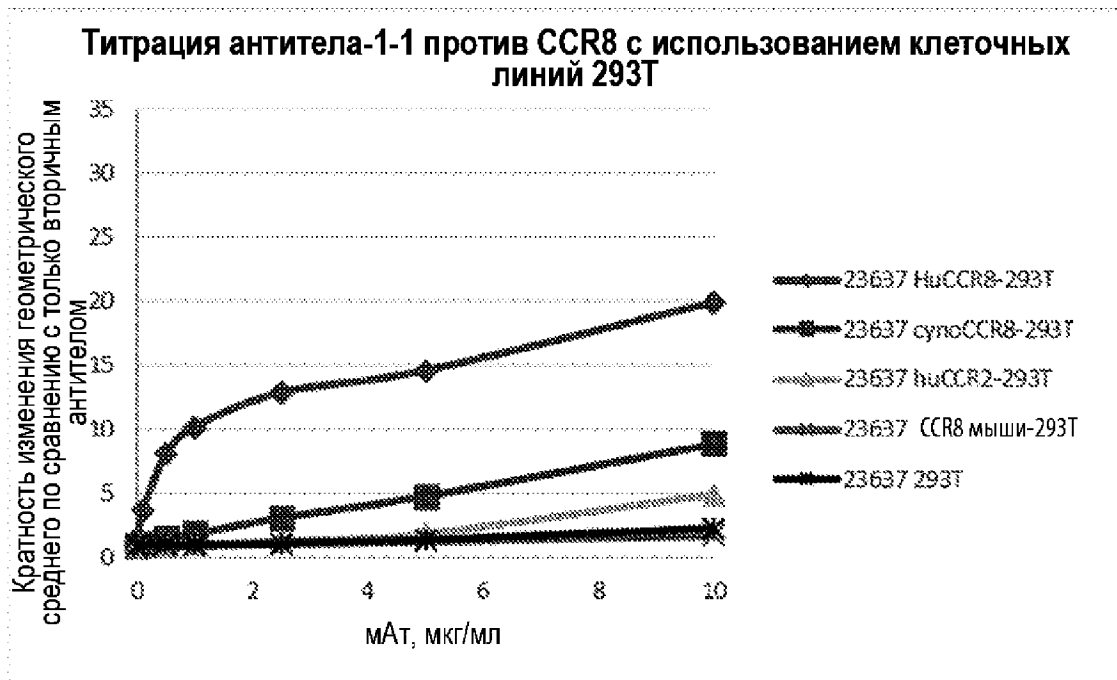
Фиг. 1В



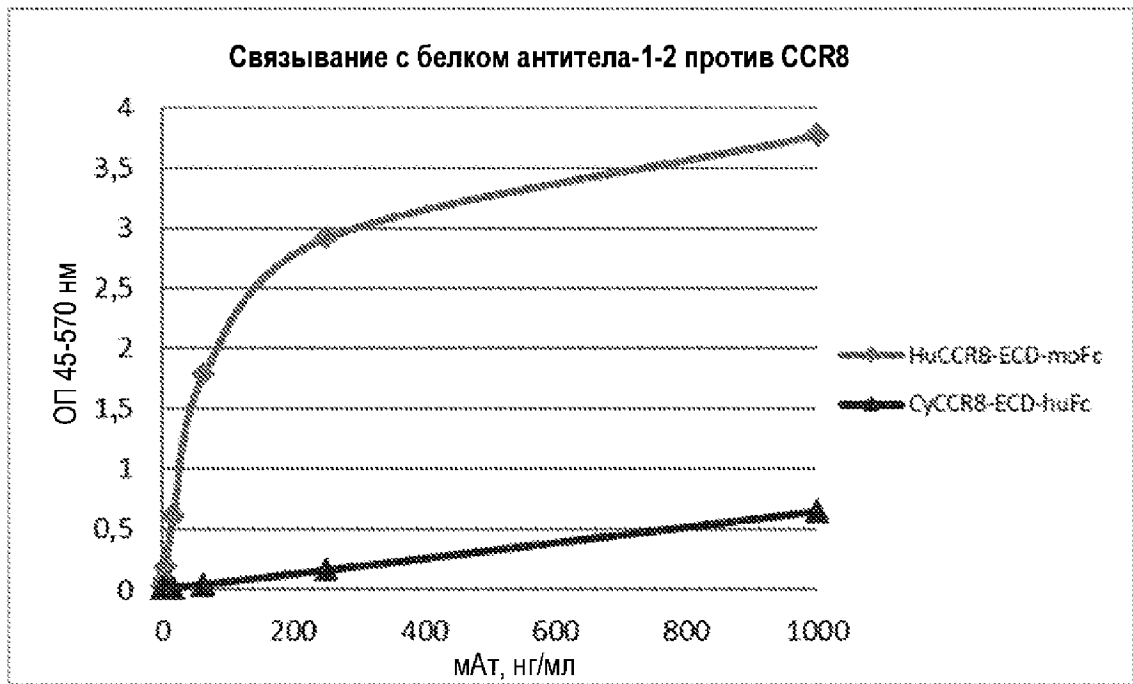
Фиг. 1С



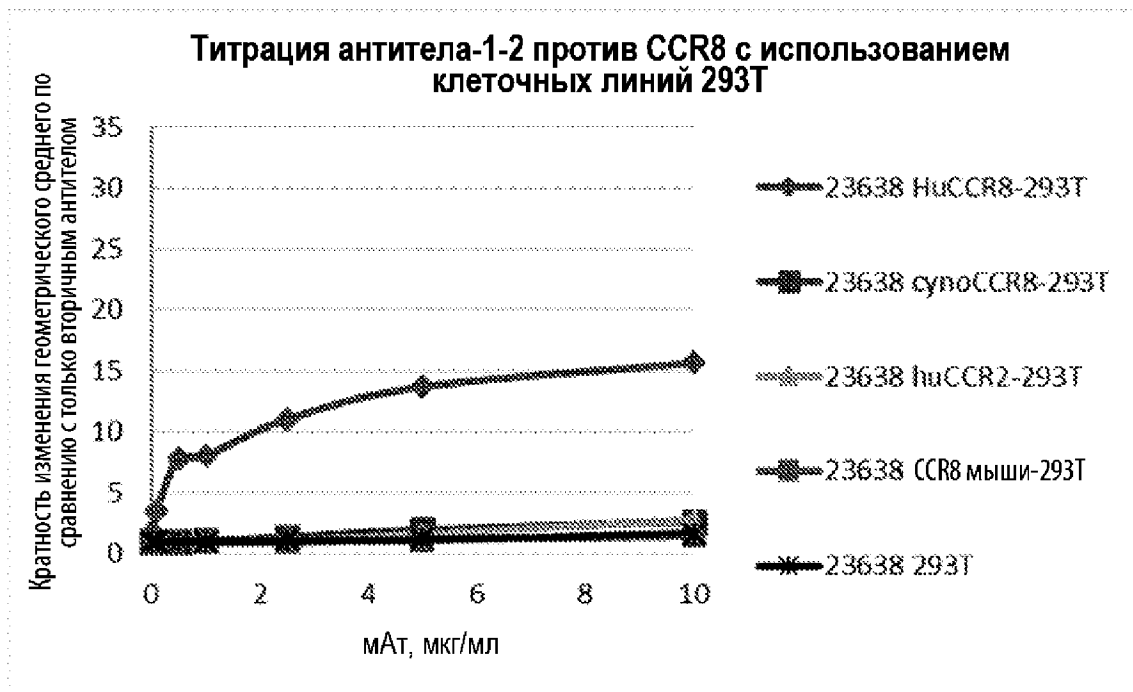
Фиг. 1D



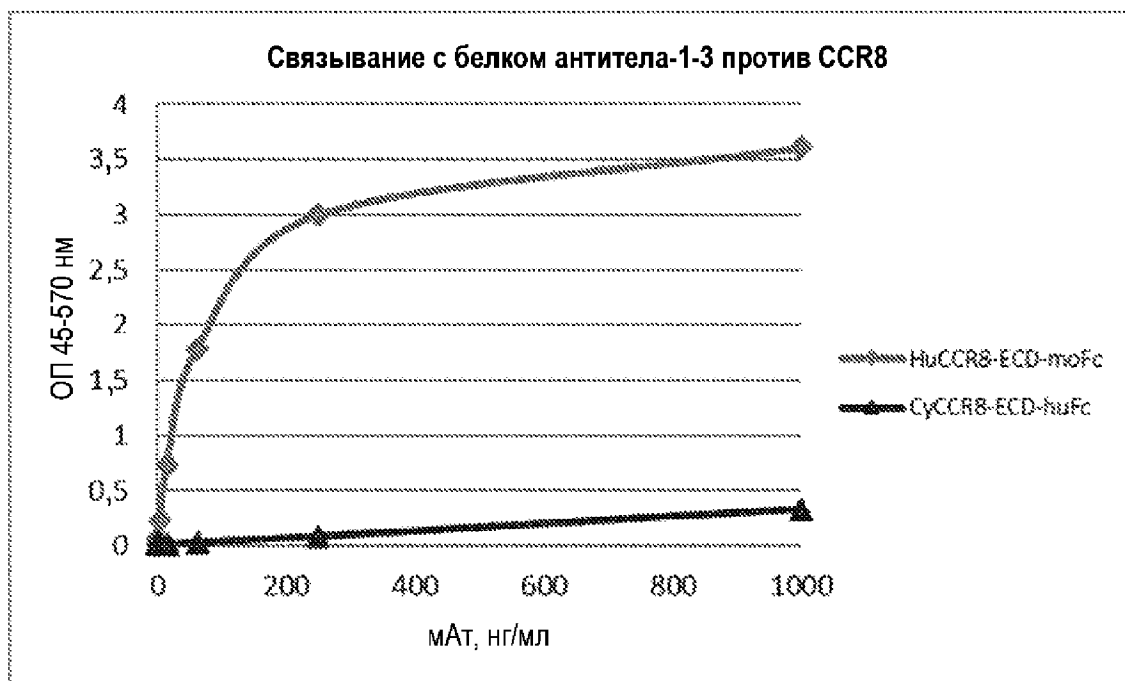
Фиг. 1Е



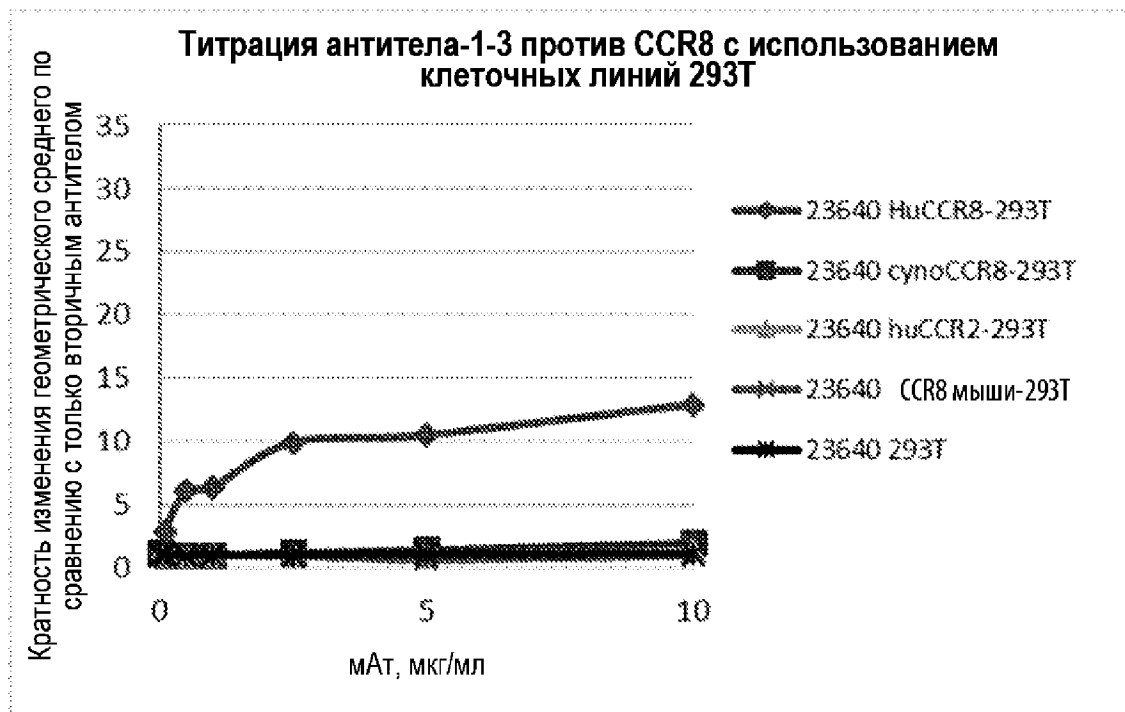
Фиг. 1F



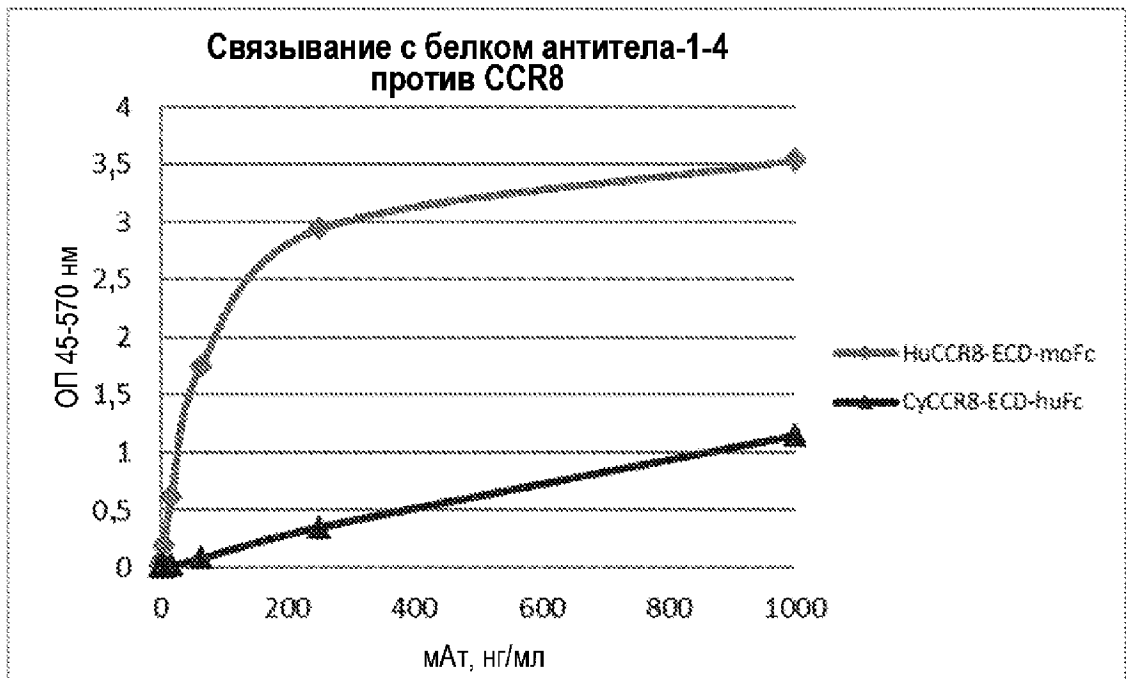
Фиг. 1G



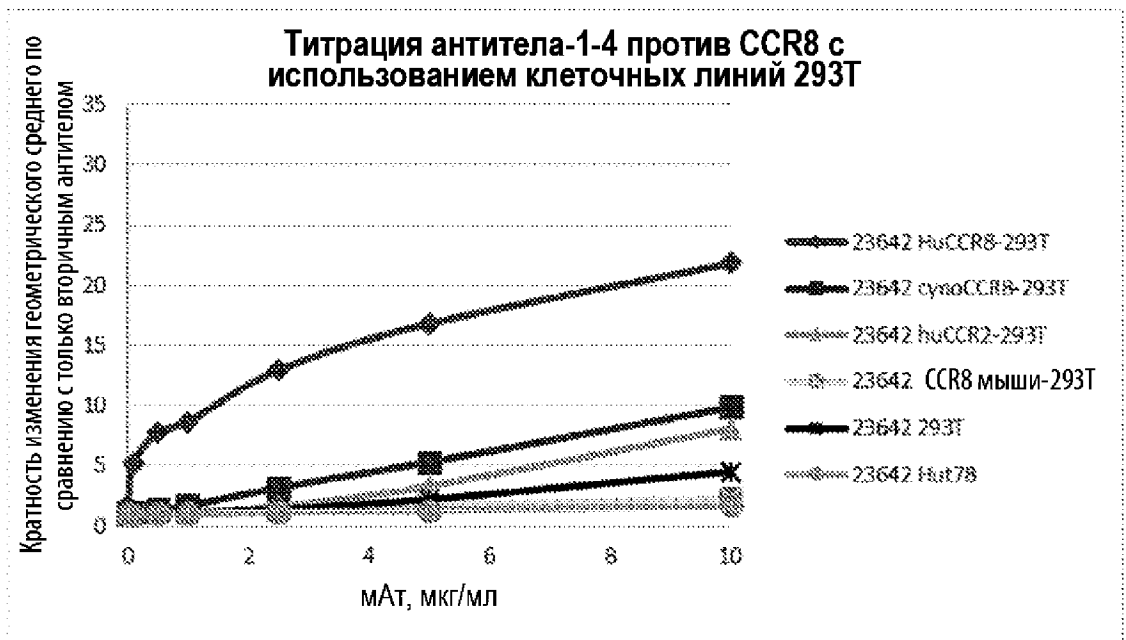
Фиг. 1H



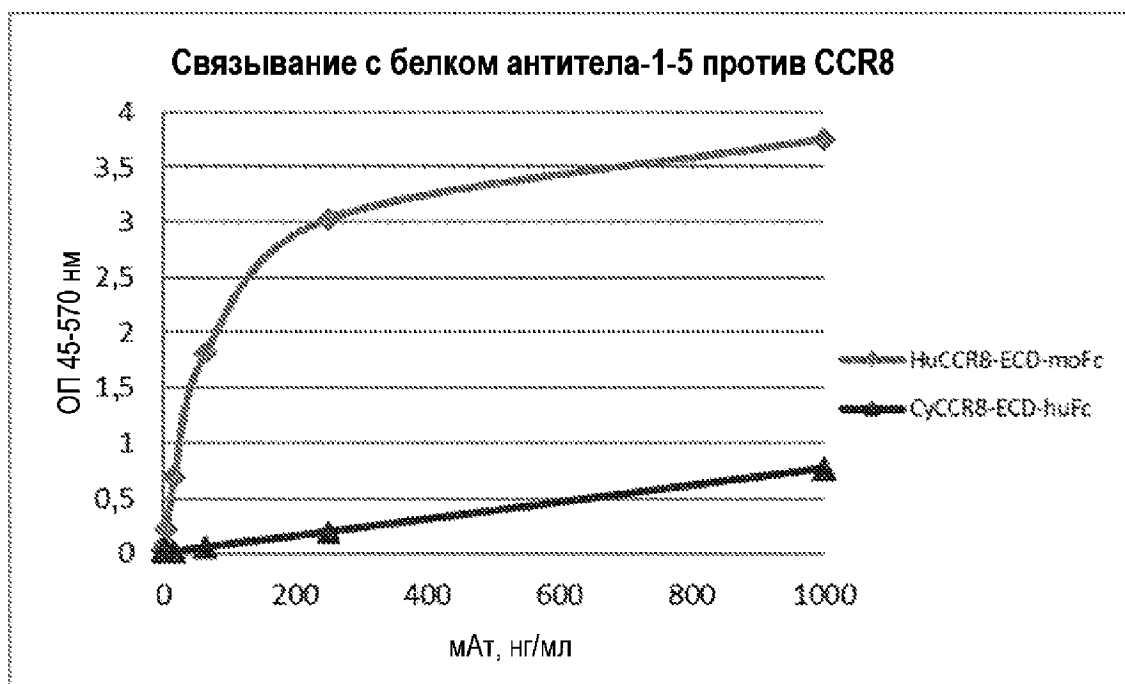
Фиг. 1I



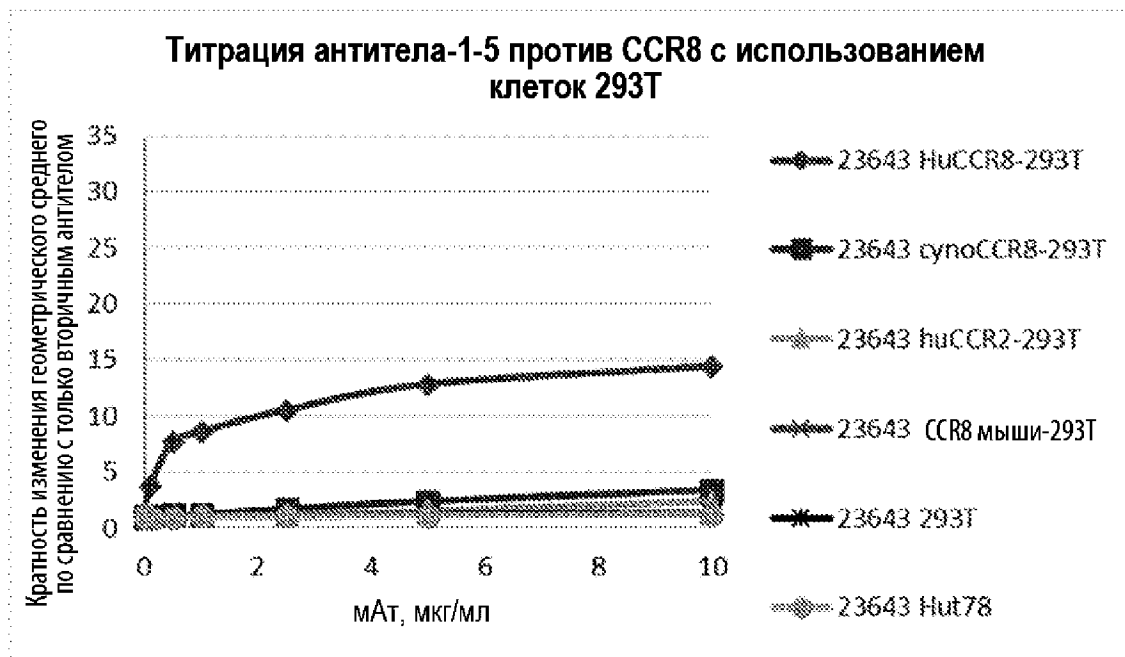
Фиг. 1J



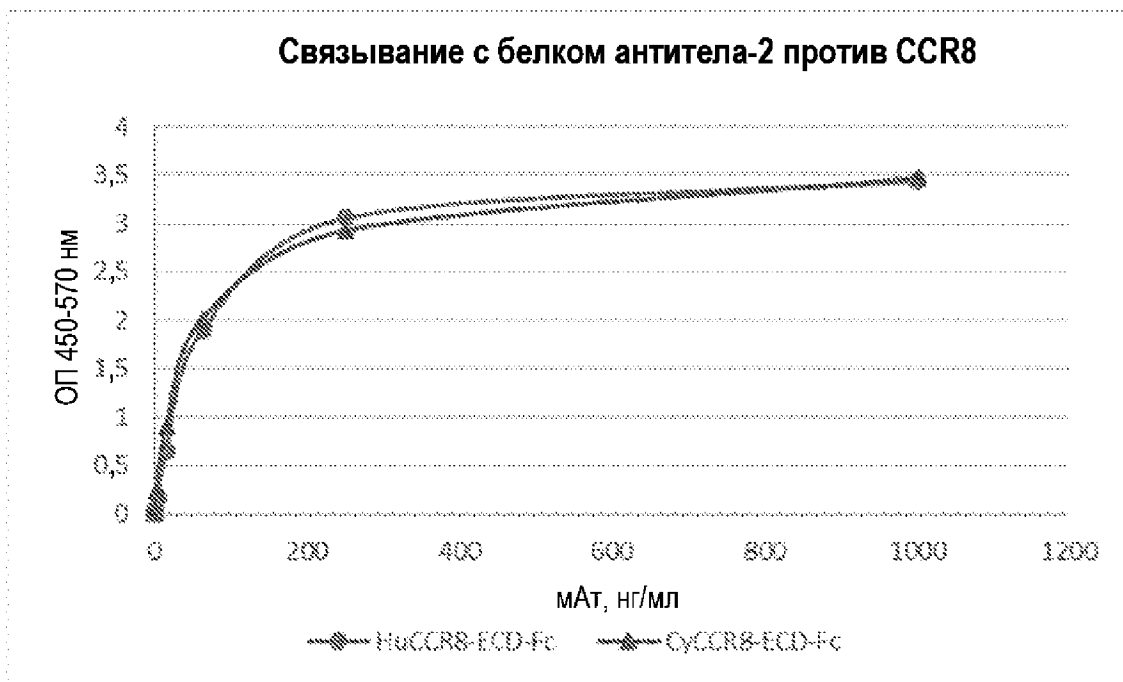
Фиг. 1К



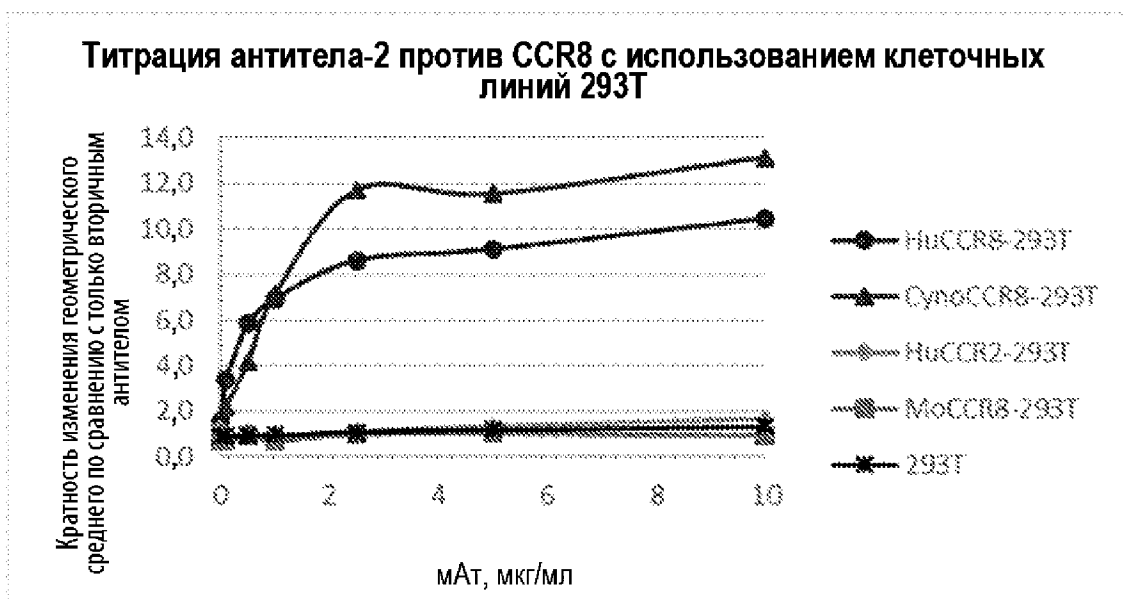
Фиг. 1L



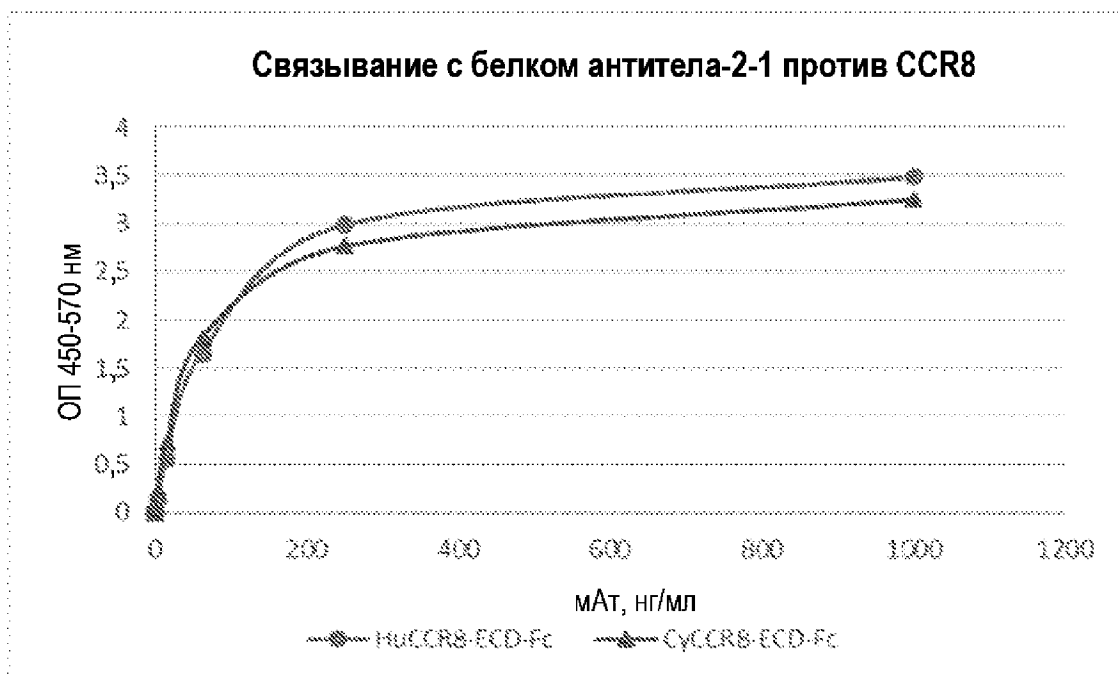
Фиг. 2А



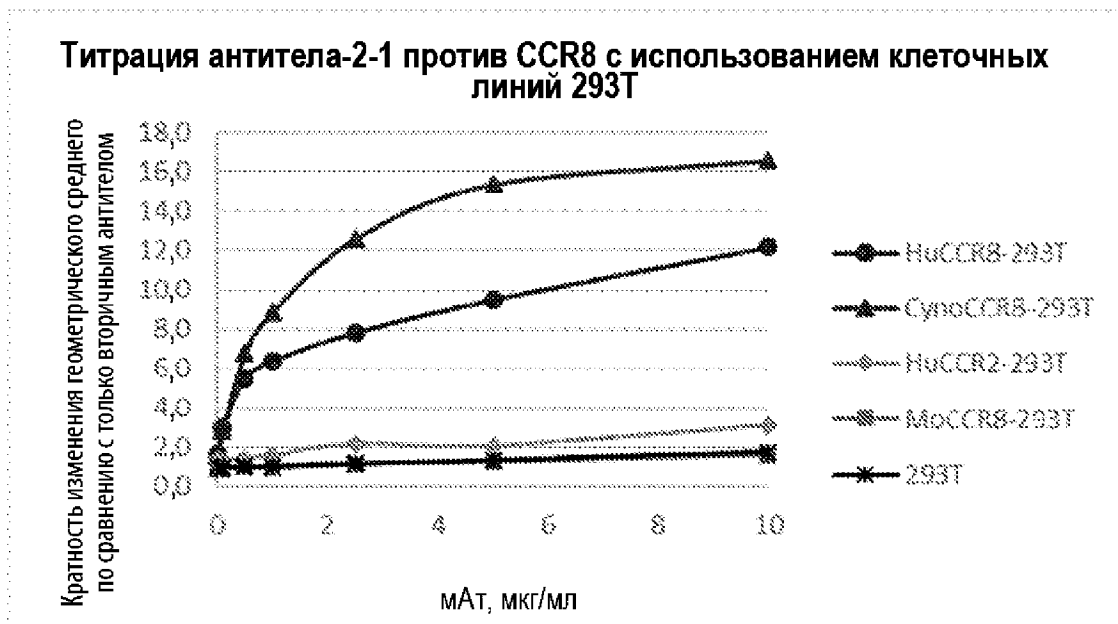
Фиг. 2В



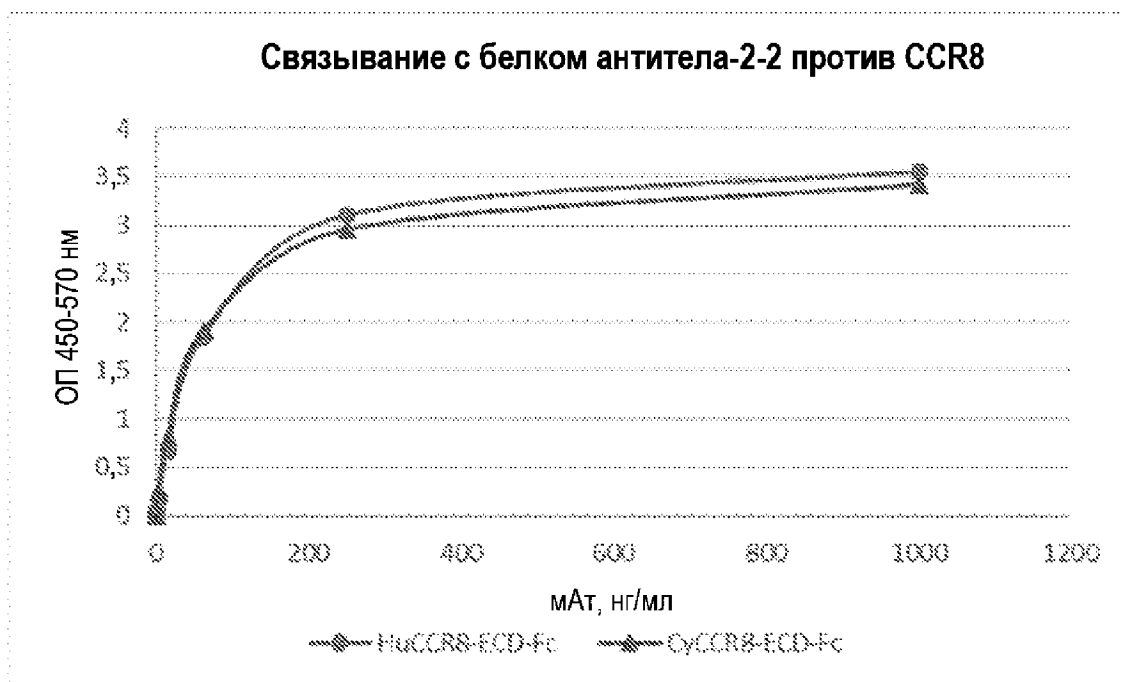
Фиг. 2С



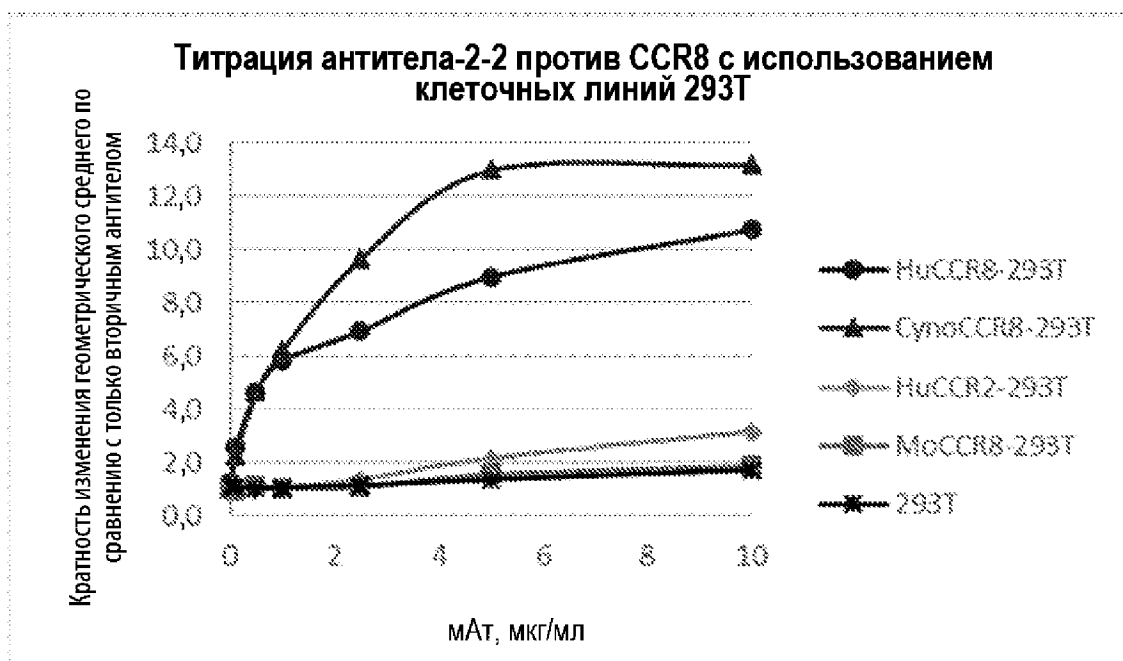
Фиг. 2D



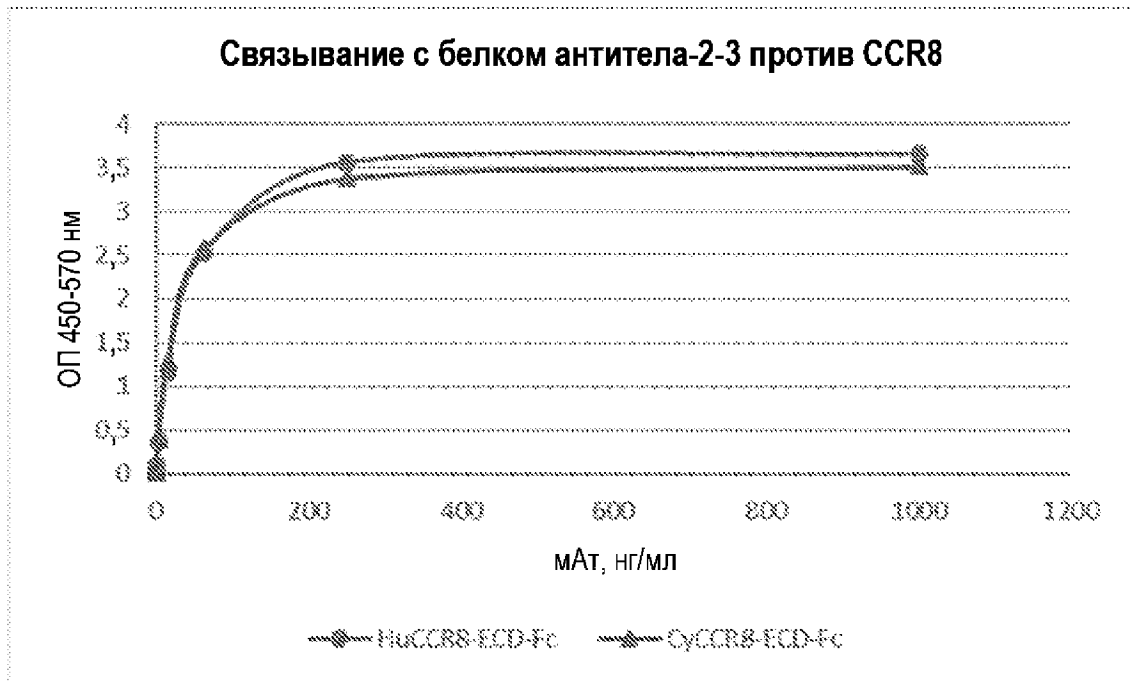
Фиг. 2Е



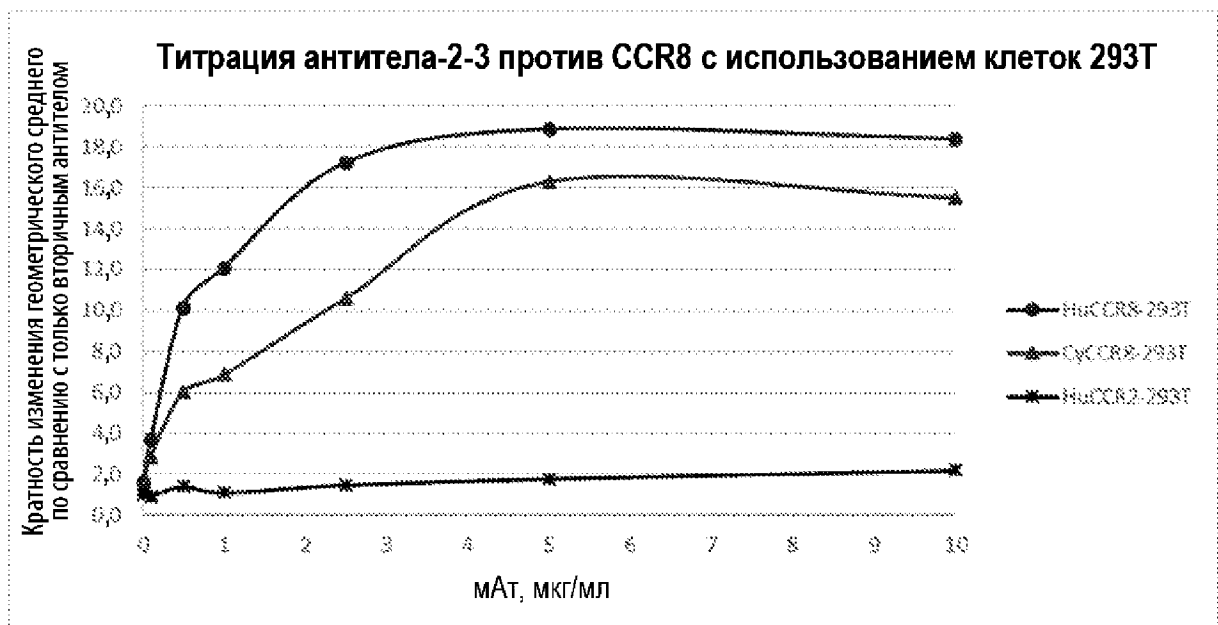
Фиг. 2F



Фиг. 2G

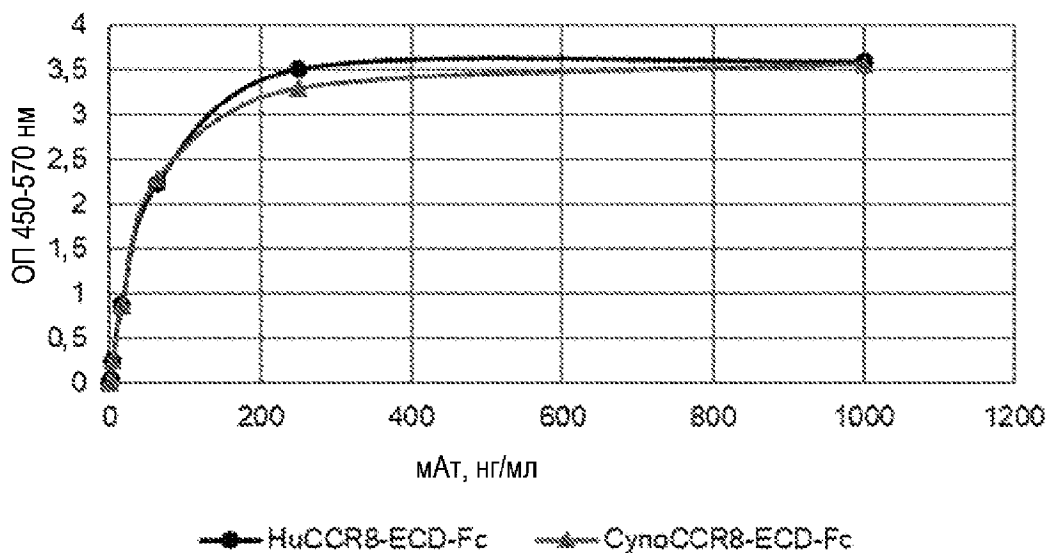


Фиг. 2H

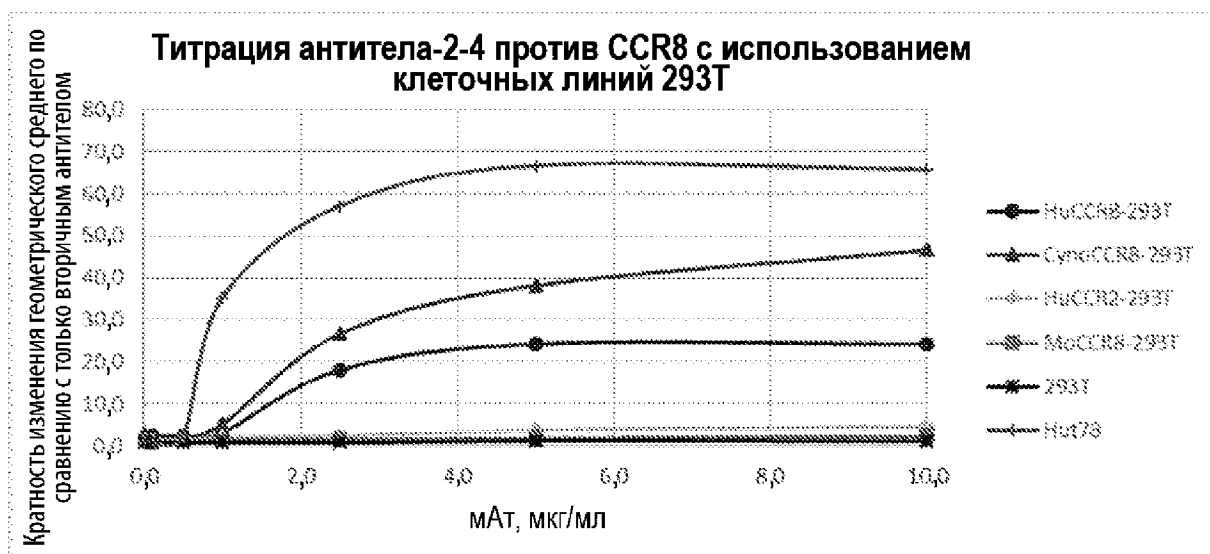


Фиг. 2I

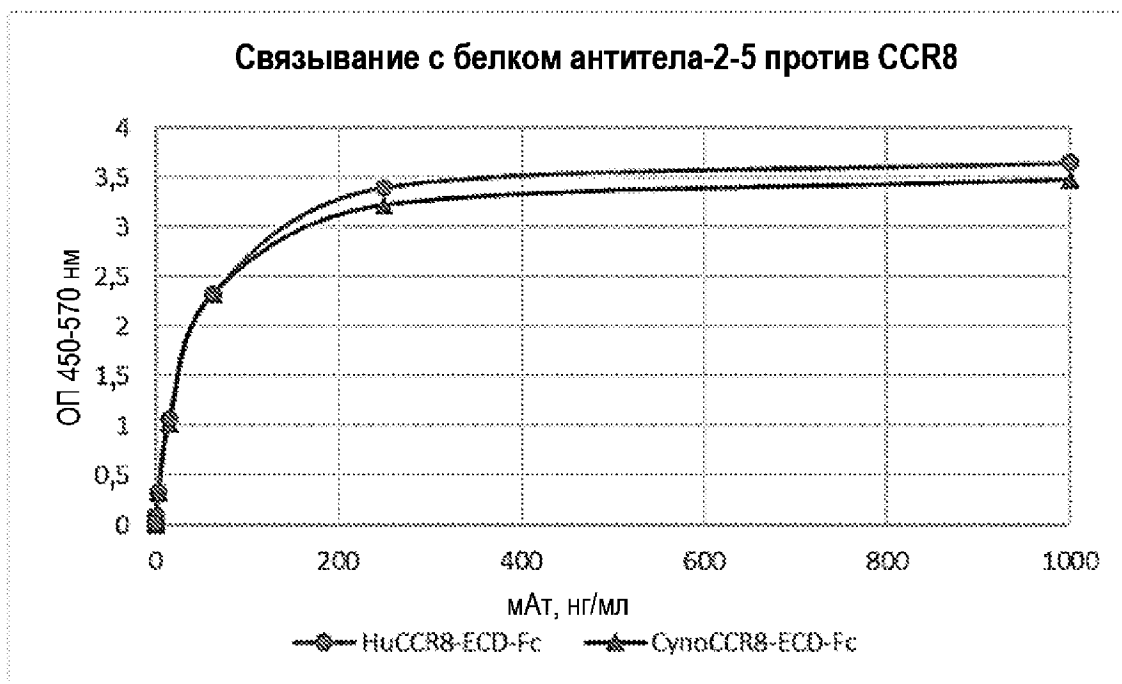
Связывание с белком антитела-2-4 против CCR8



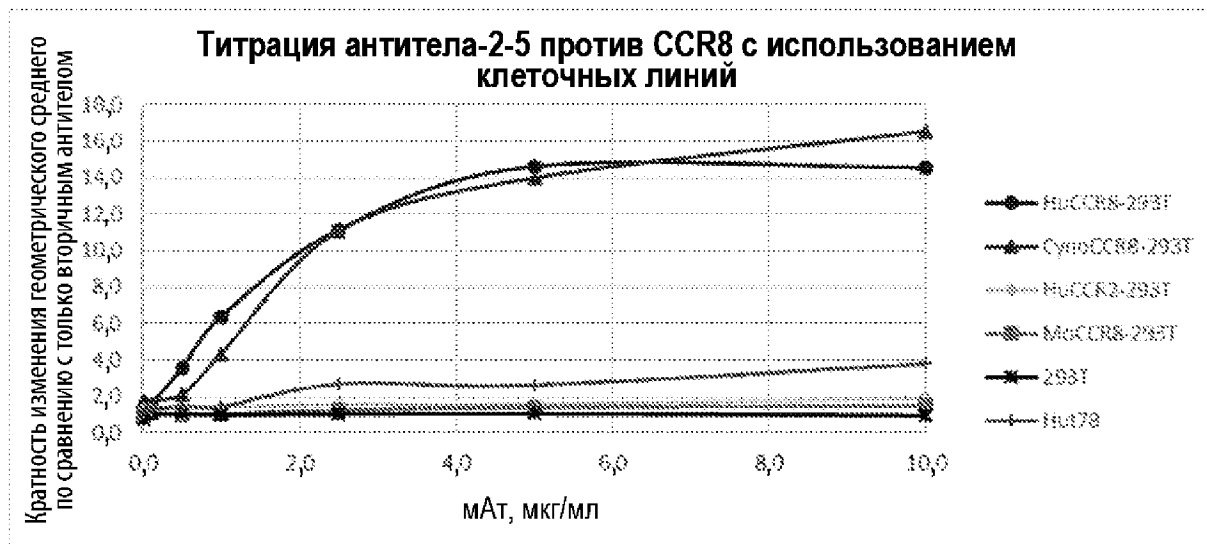
Фиг. 2J



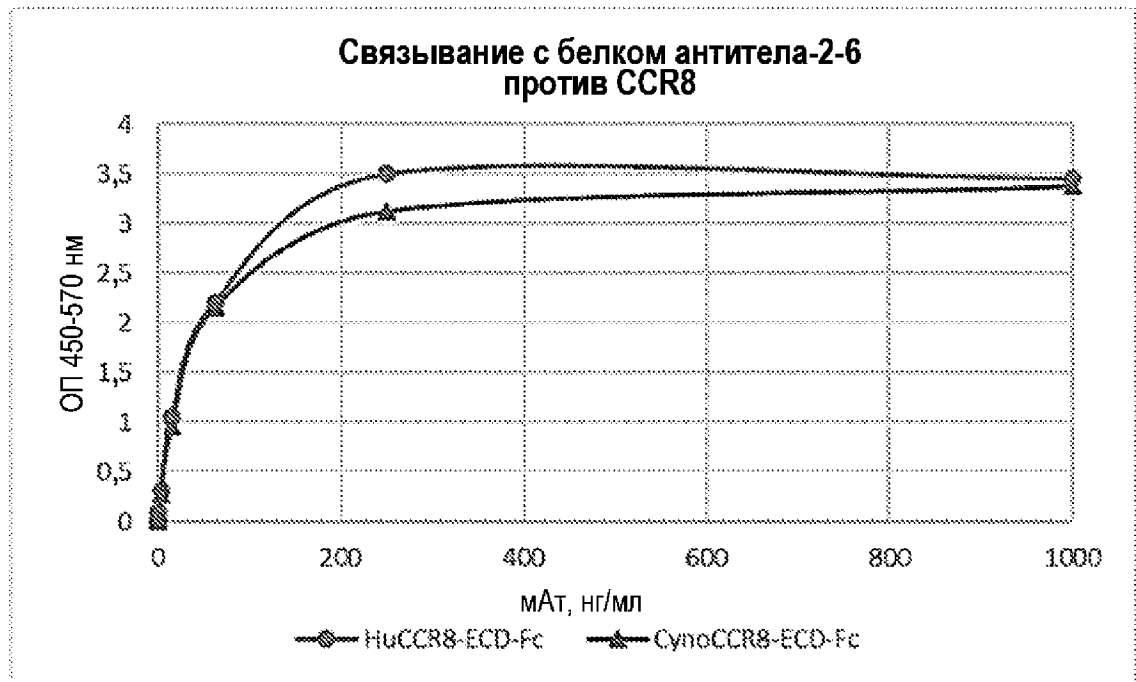
Фиг. 2К



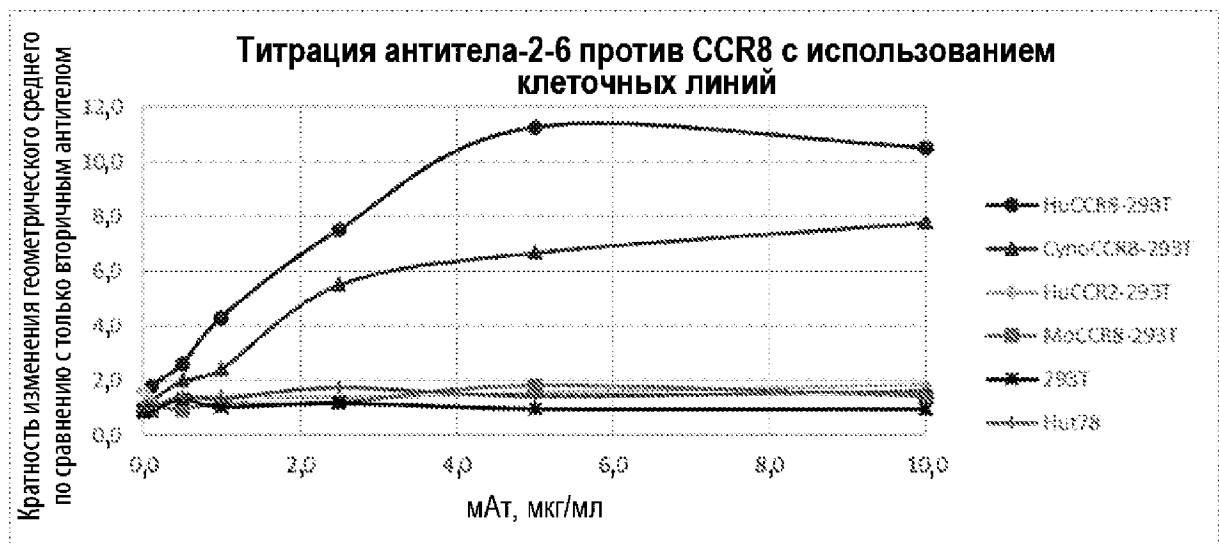
Фиг. 2L



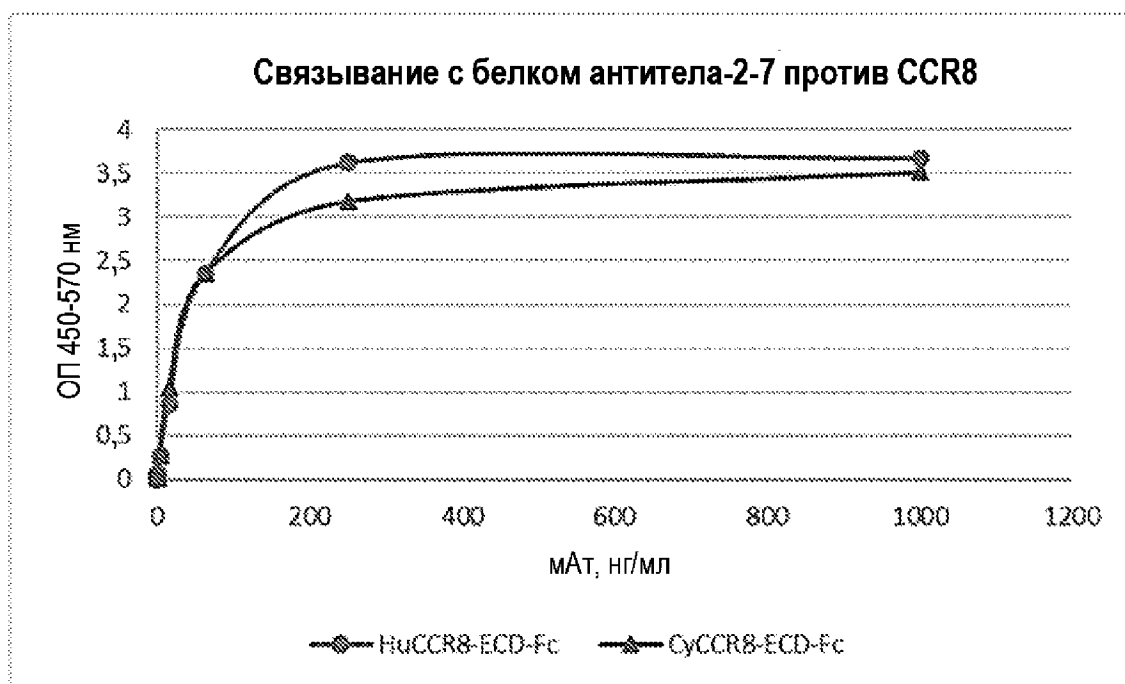
Фиг. 2М



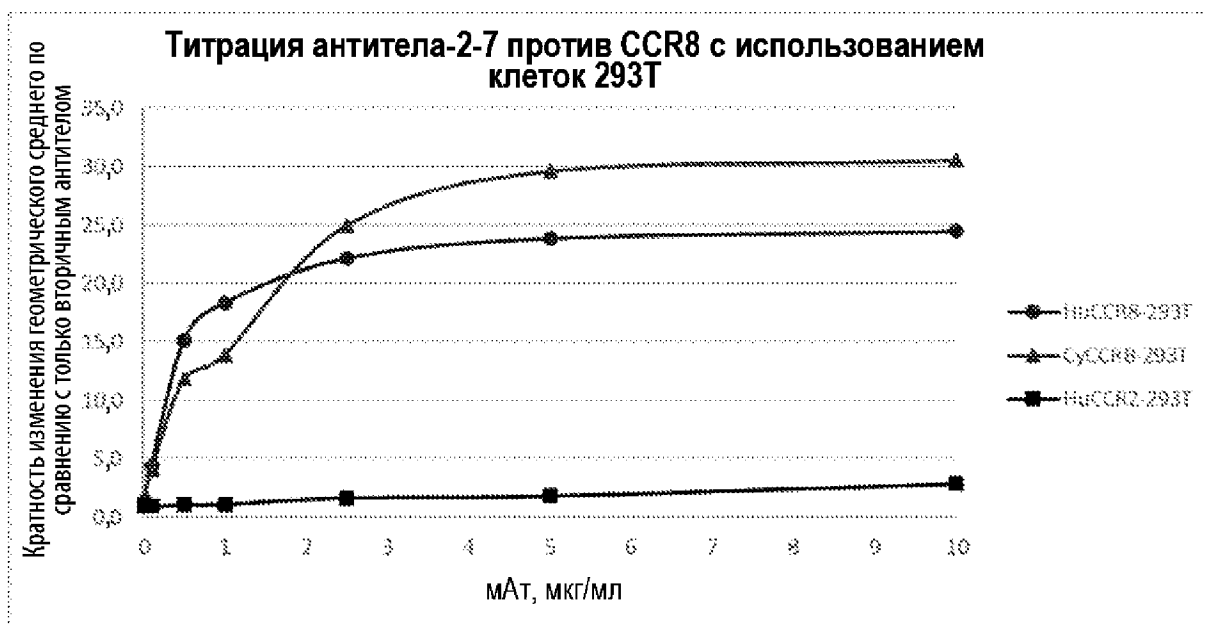
Фиг. 2N



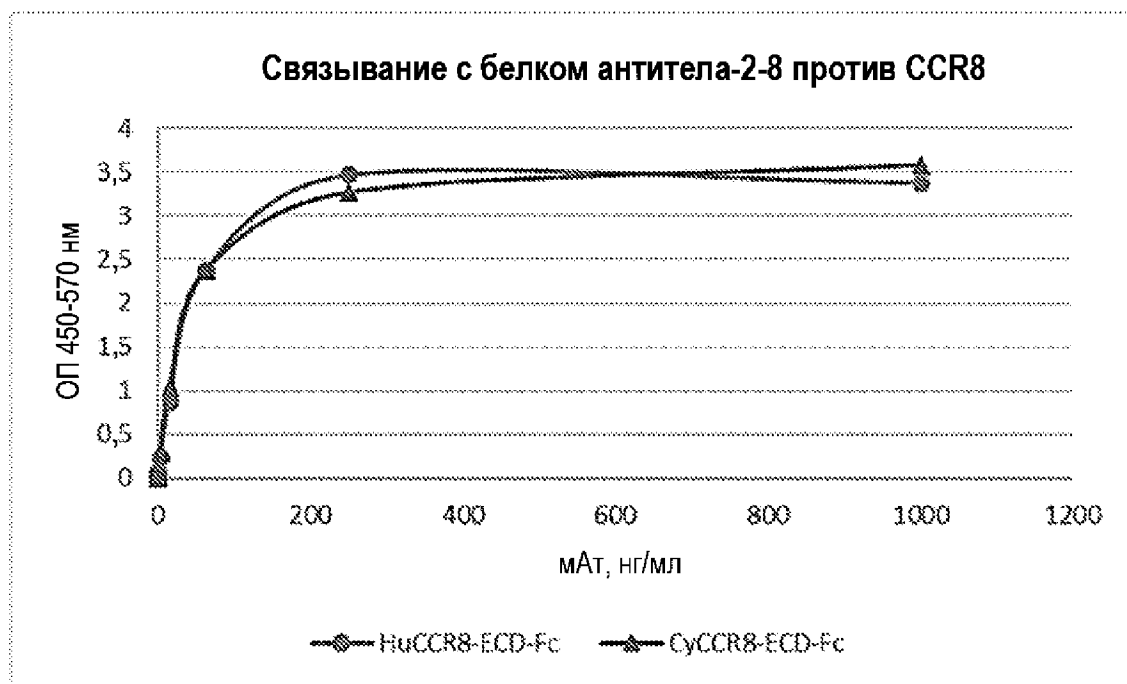
Фиг. 20



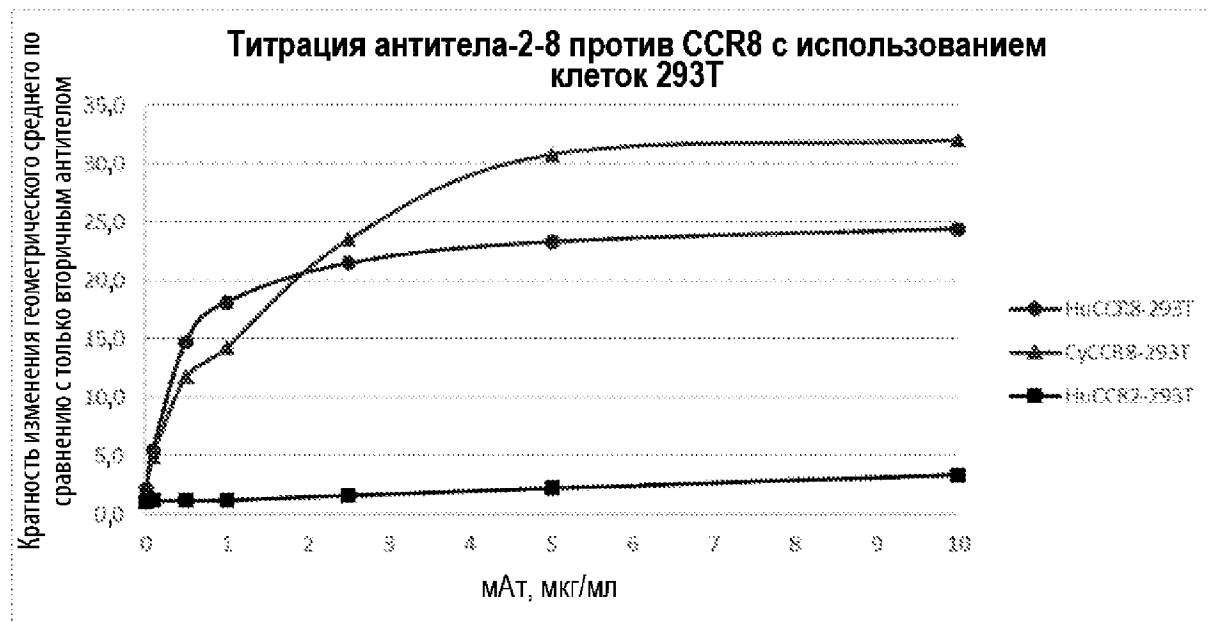
Фиг. 2Р



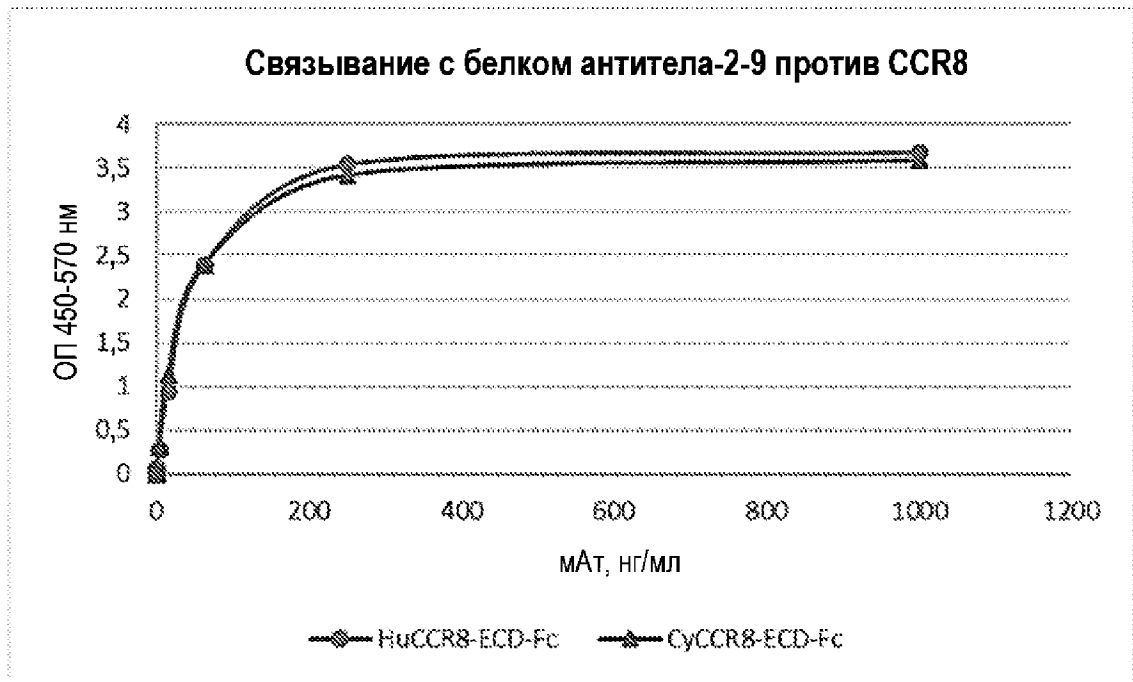
Фиг. 2Q



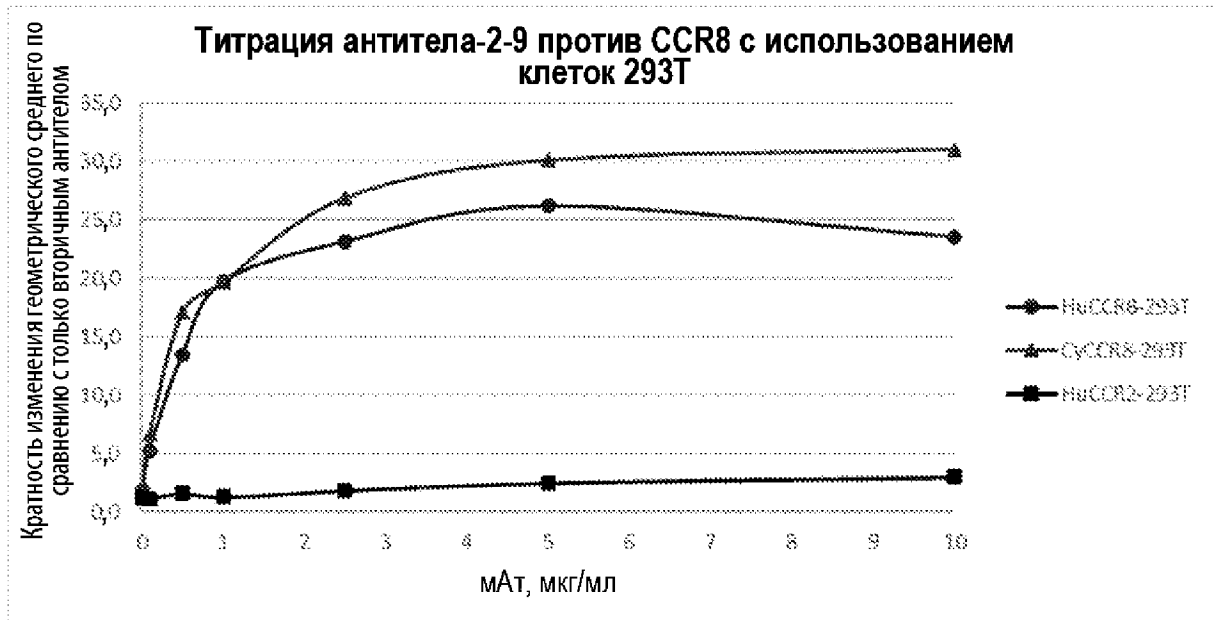
Фиг. 2R



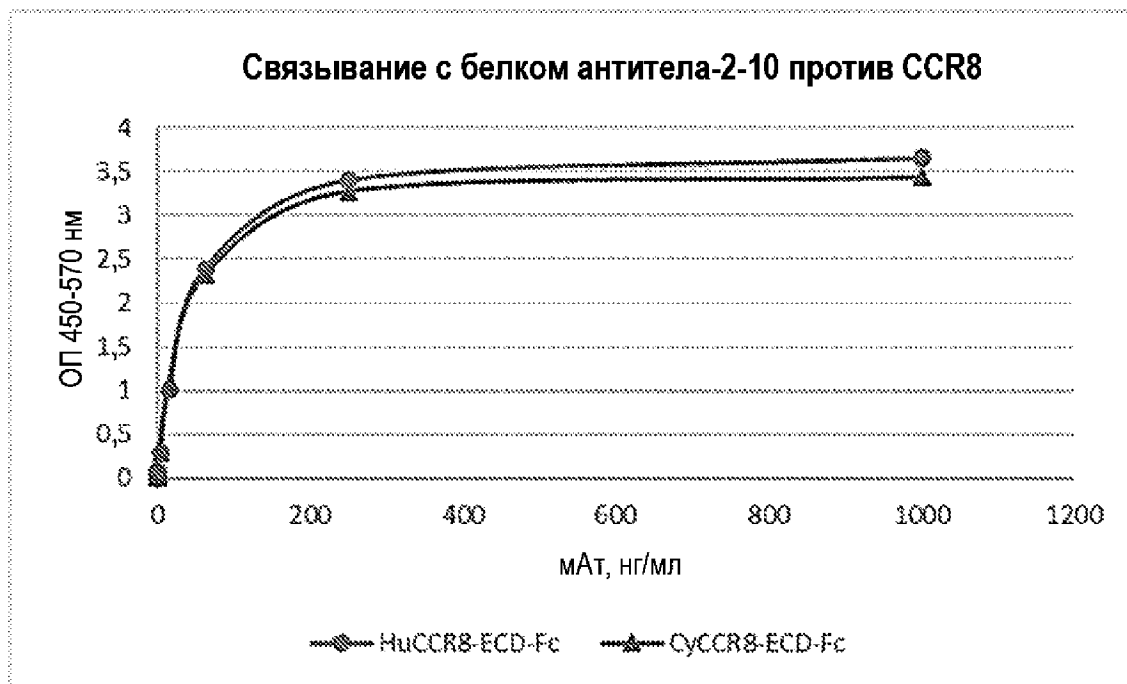
Фиг. 2S



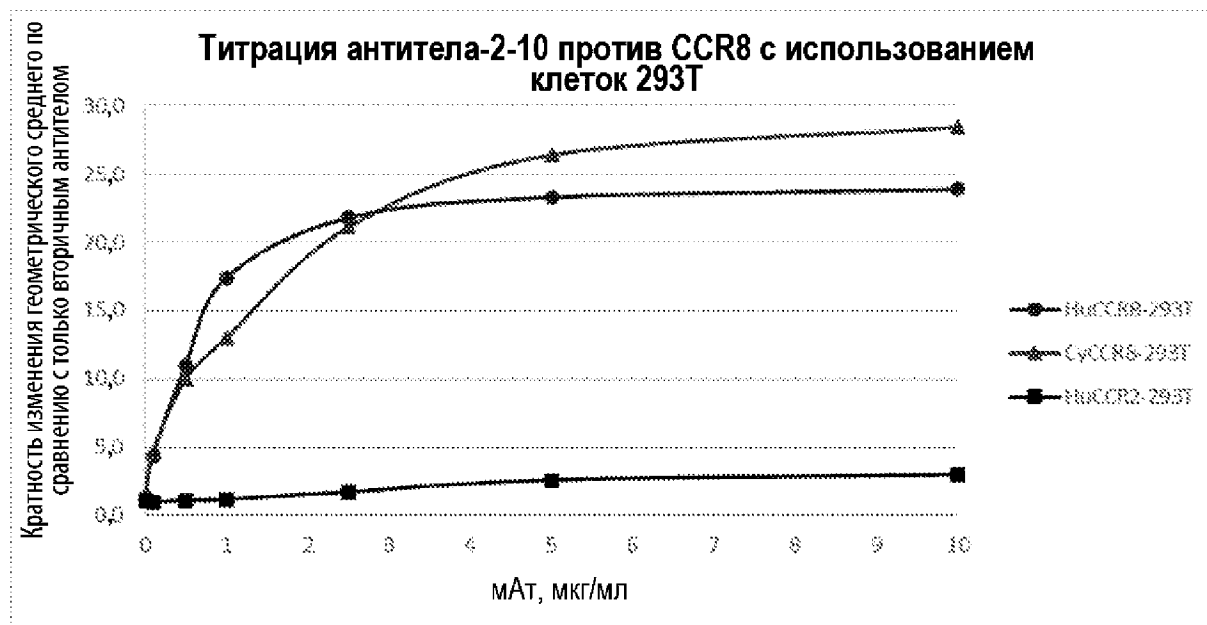
Фиг. 2Т



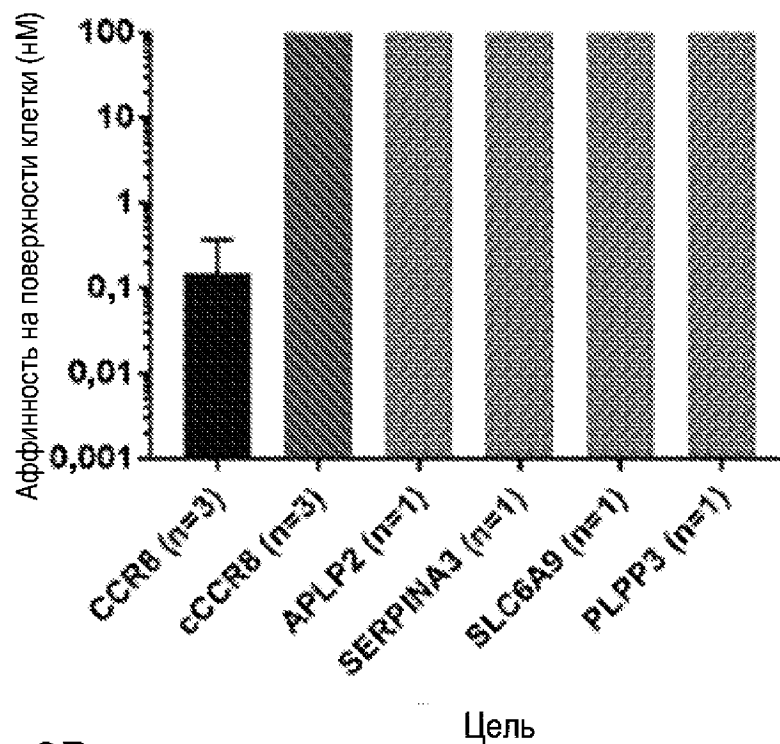
Фиг. 2U



Фиг. 2V

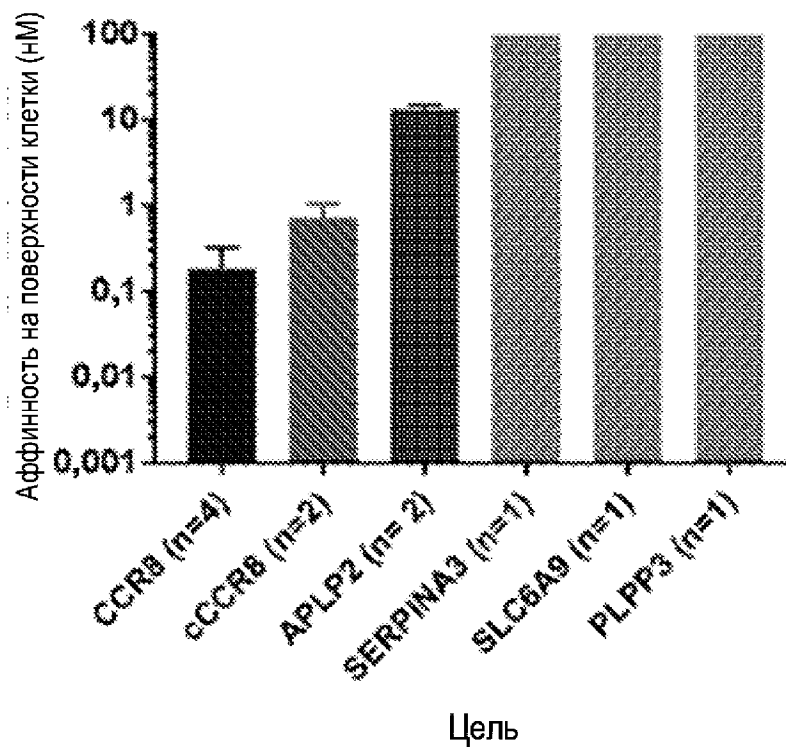


Фиг. 3А
Kd антитела-1 против CCR8 на поверхности клетки

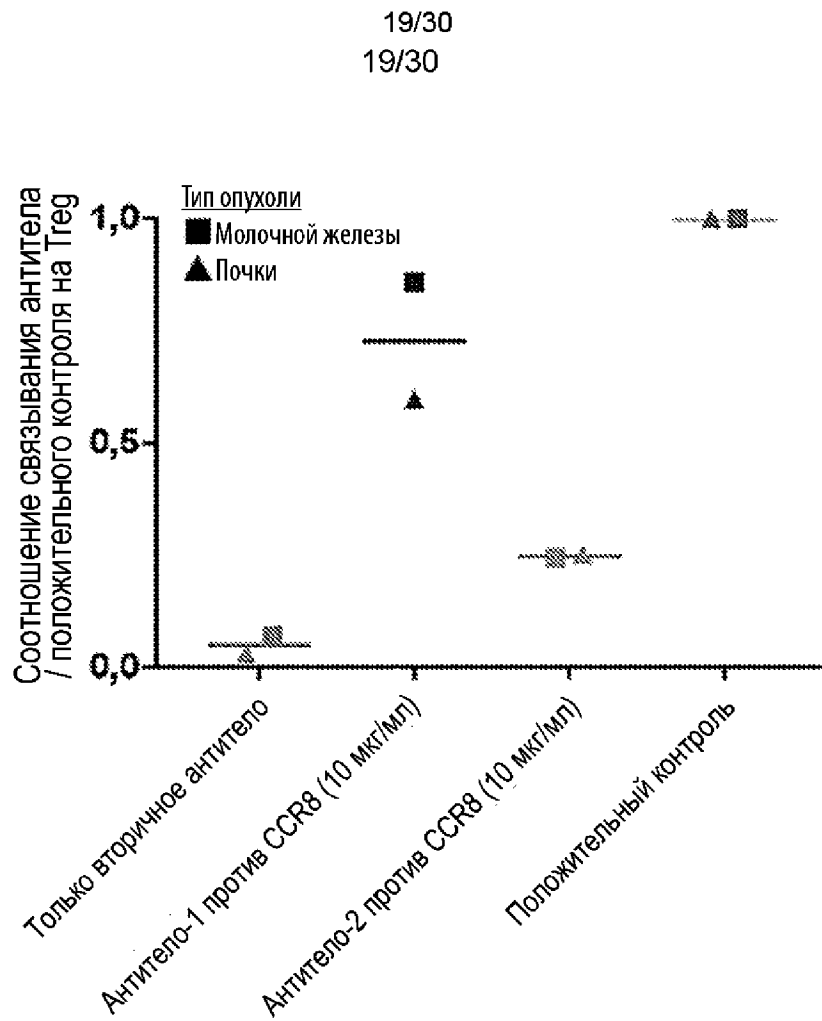


Фиг. 3В

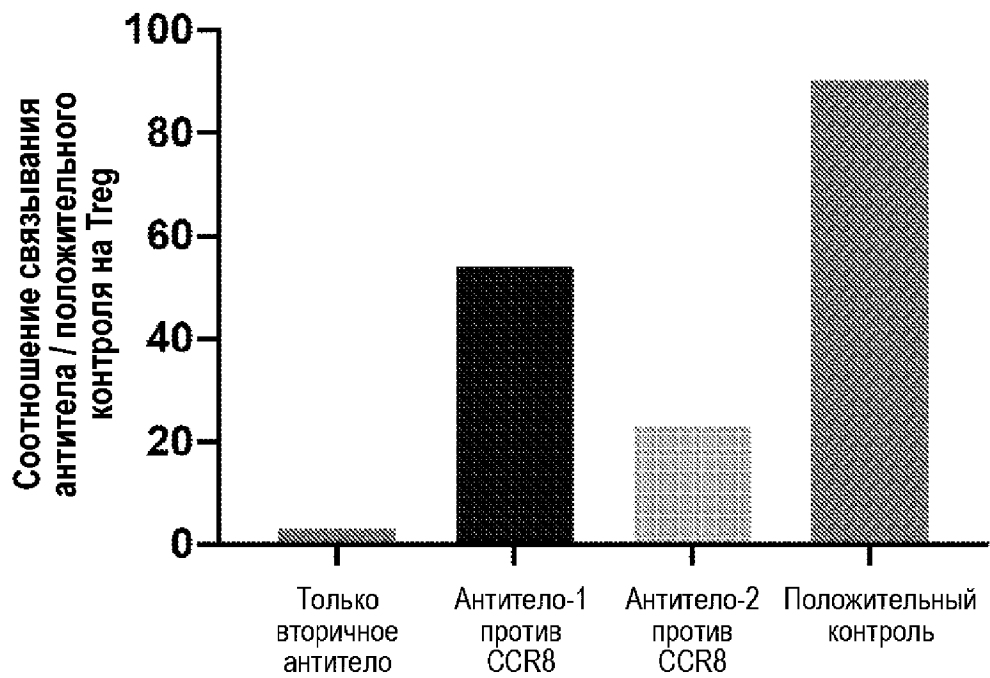
Kd антитела-2 против CCR8 на поверхности клетки



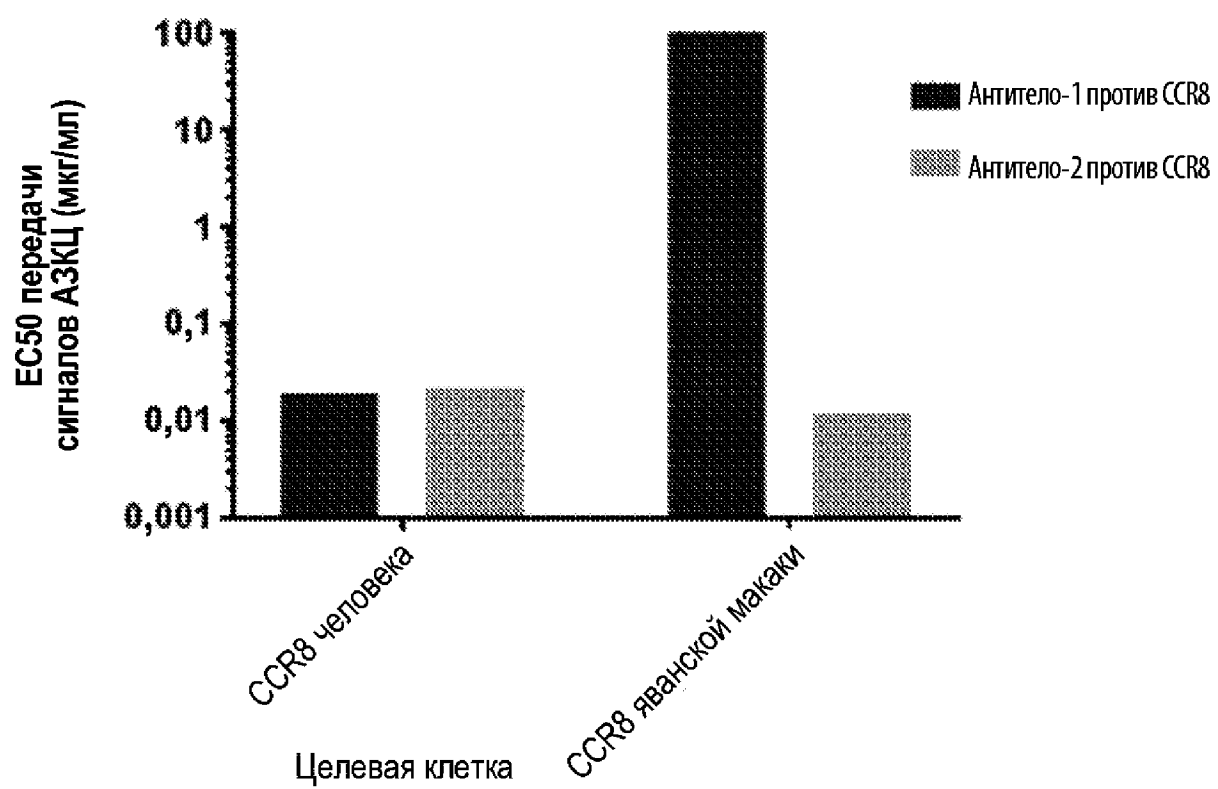
Фиг. 4А



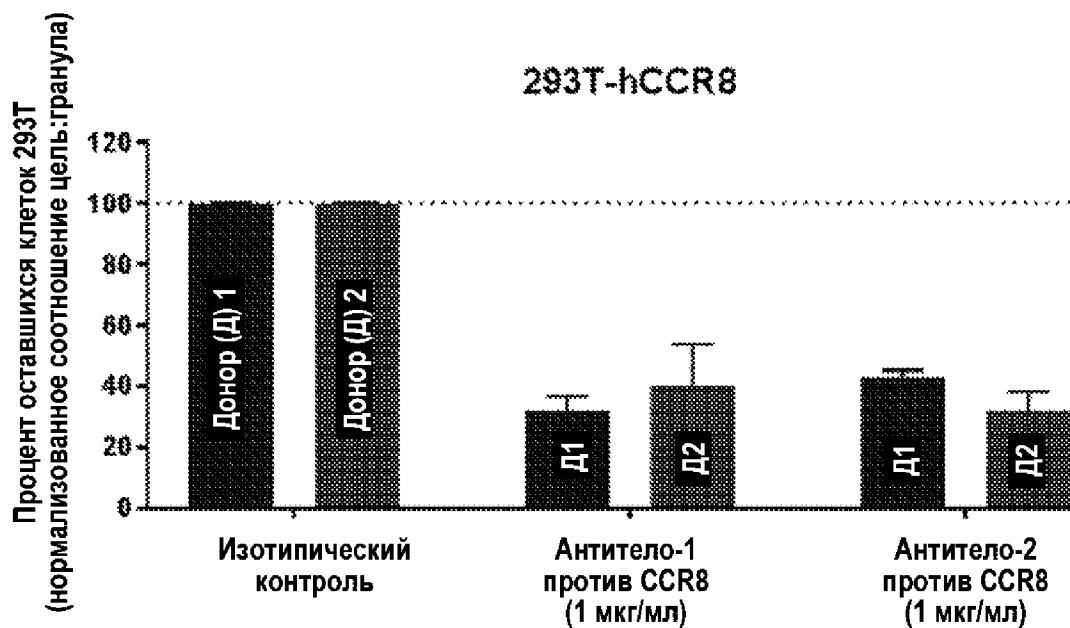
Фиг. 4В



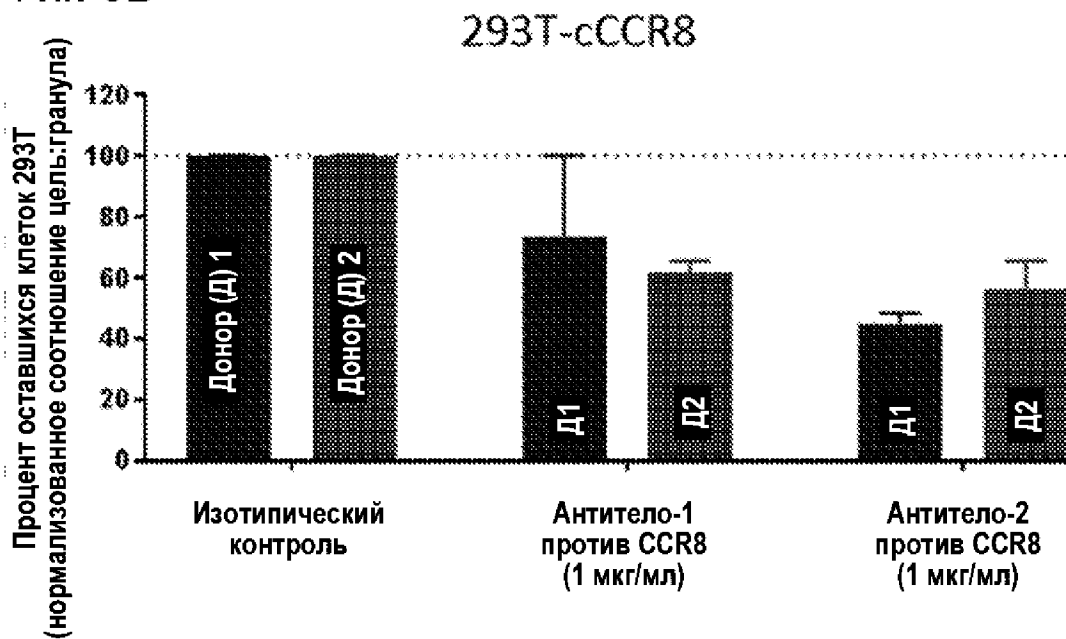
Фиг. 5



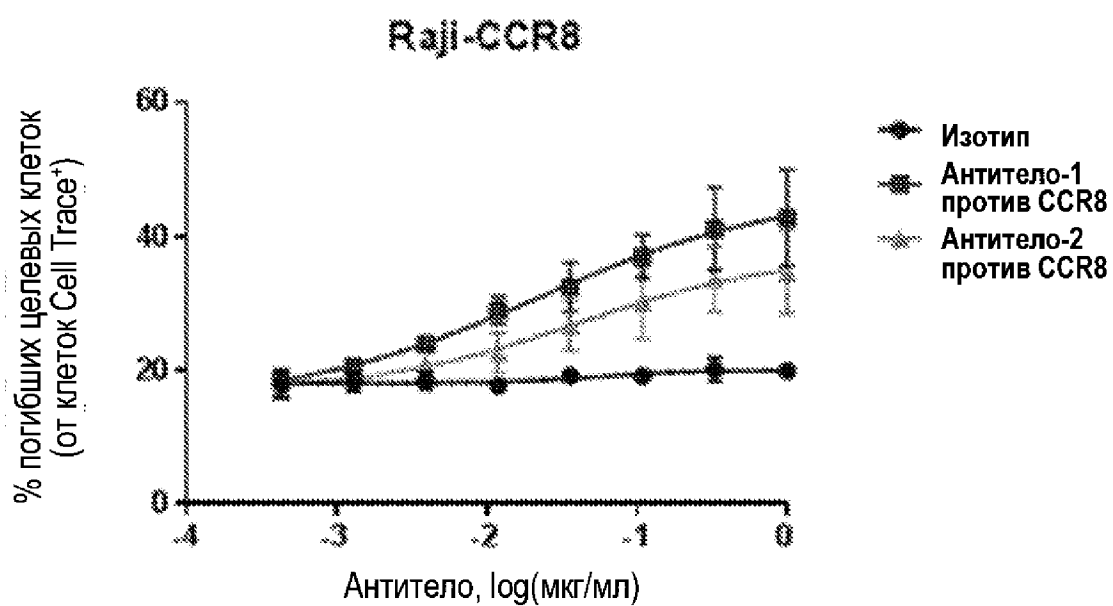
Фиг. 6А



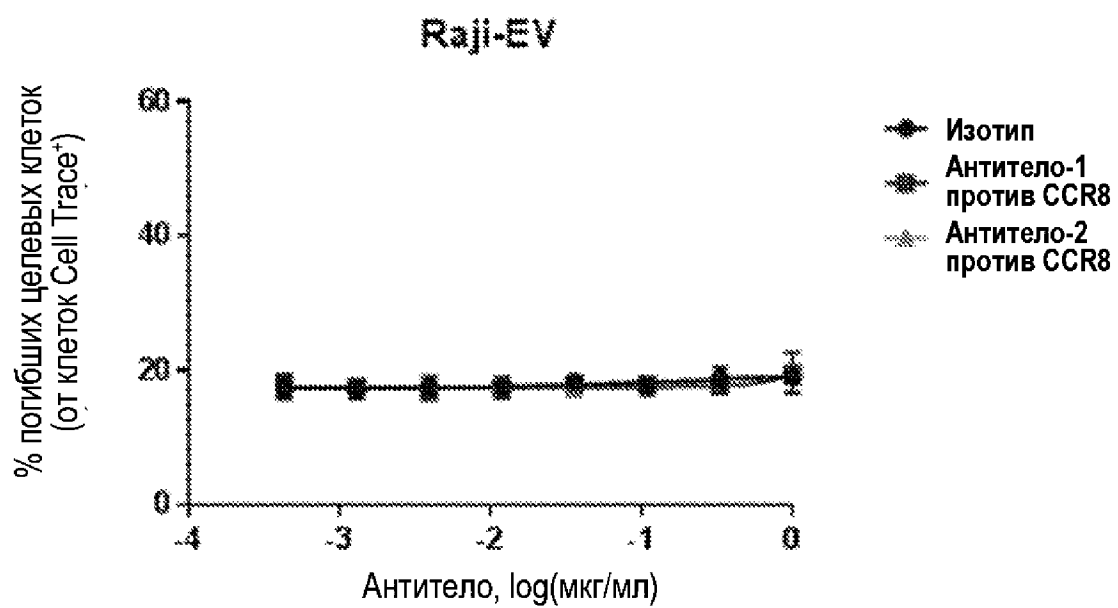
Фиг. 6В



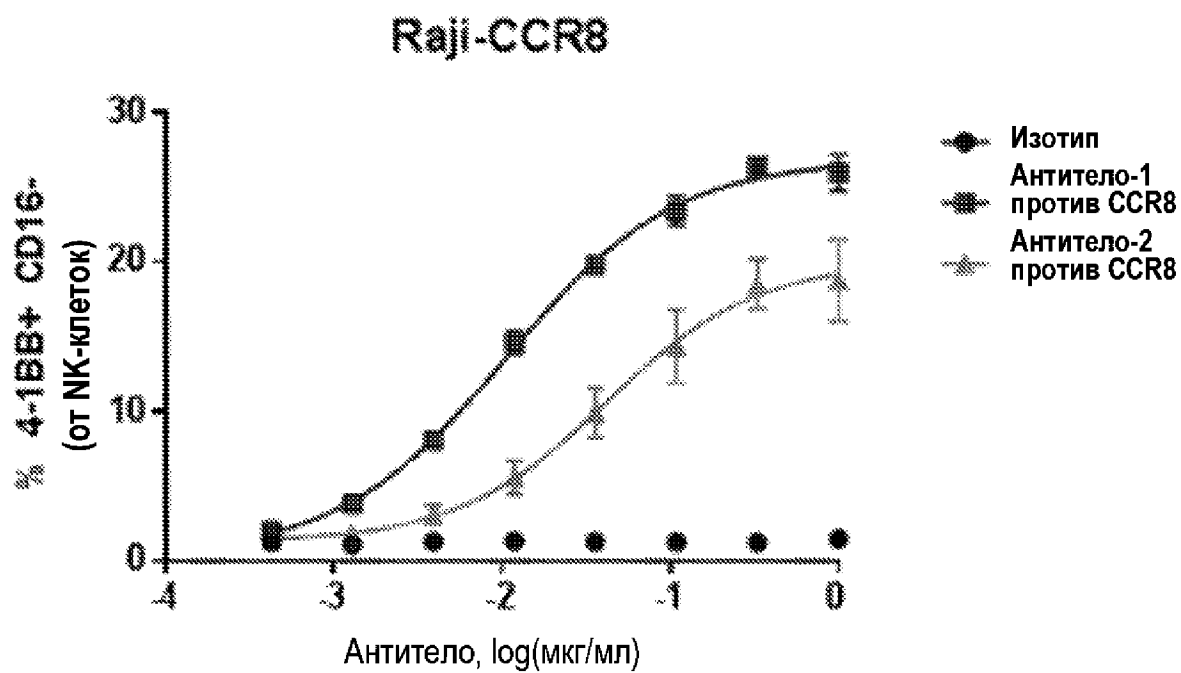
Фиг. 7А



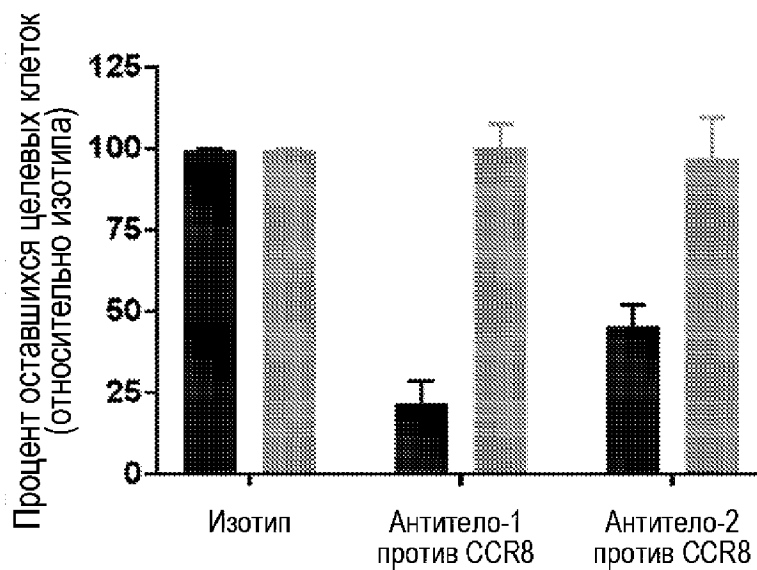
Фиг. 7В



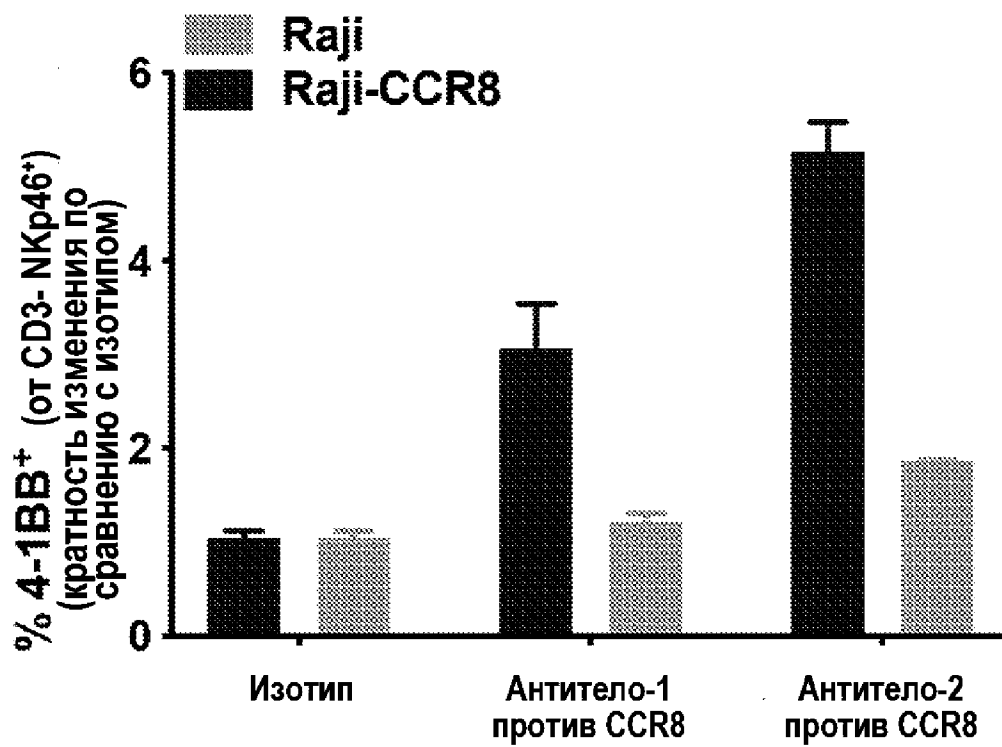
Фиг. 8А



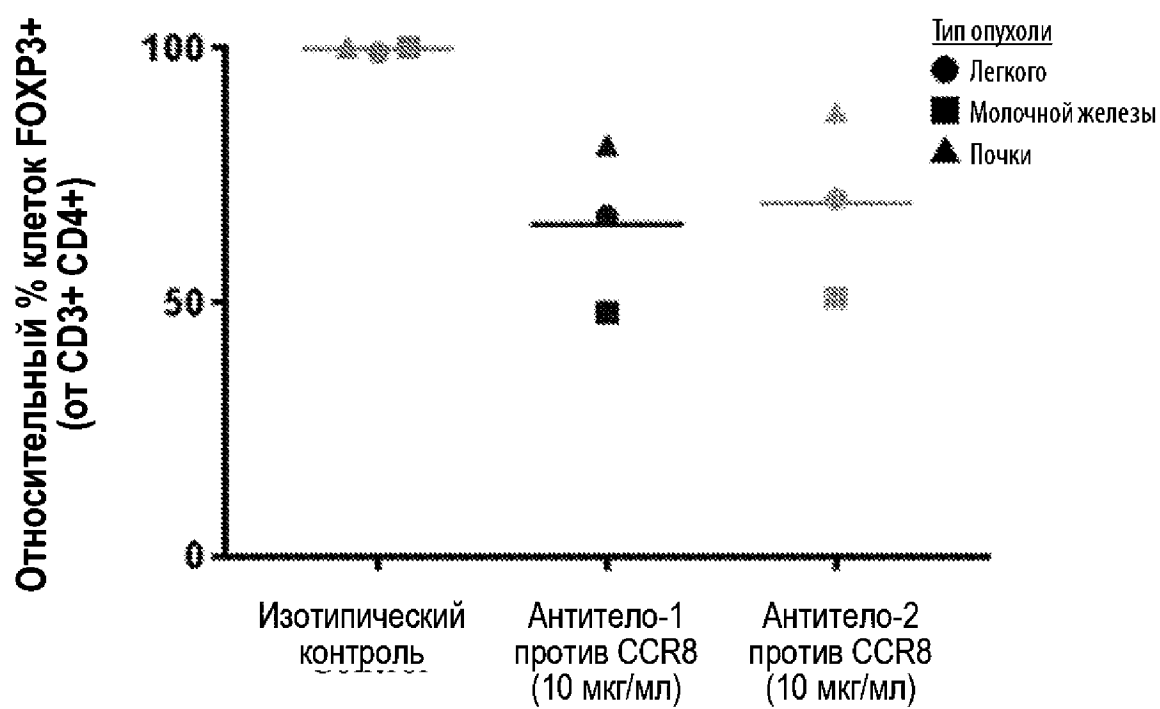
Фиг. 8В



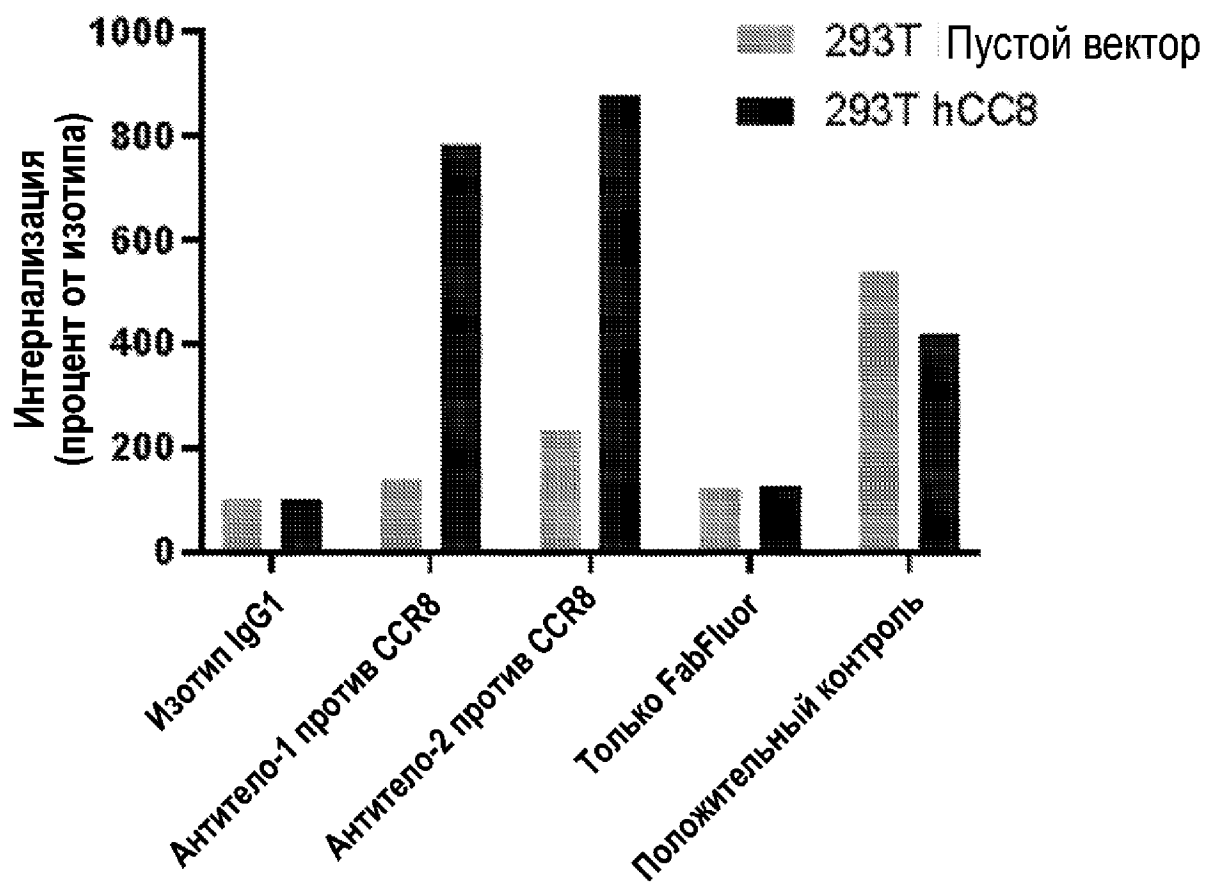
Фиг. 8С



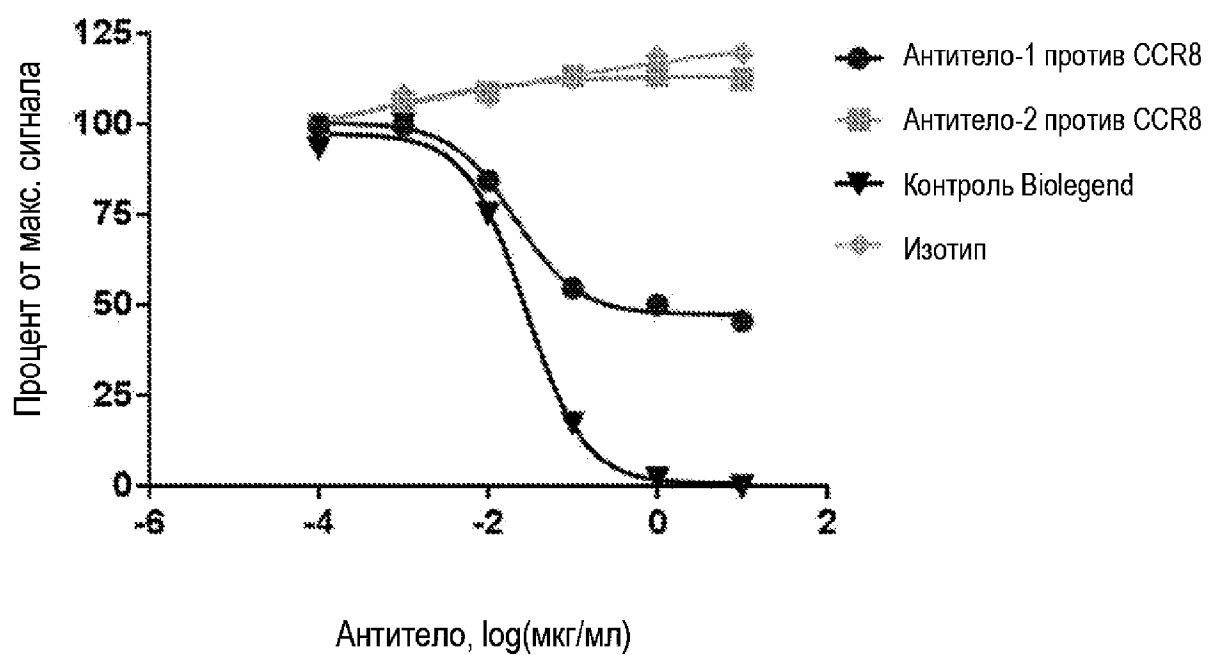
Фиг. 9



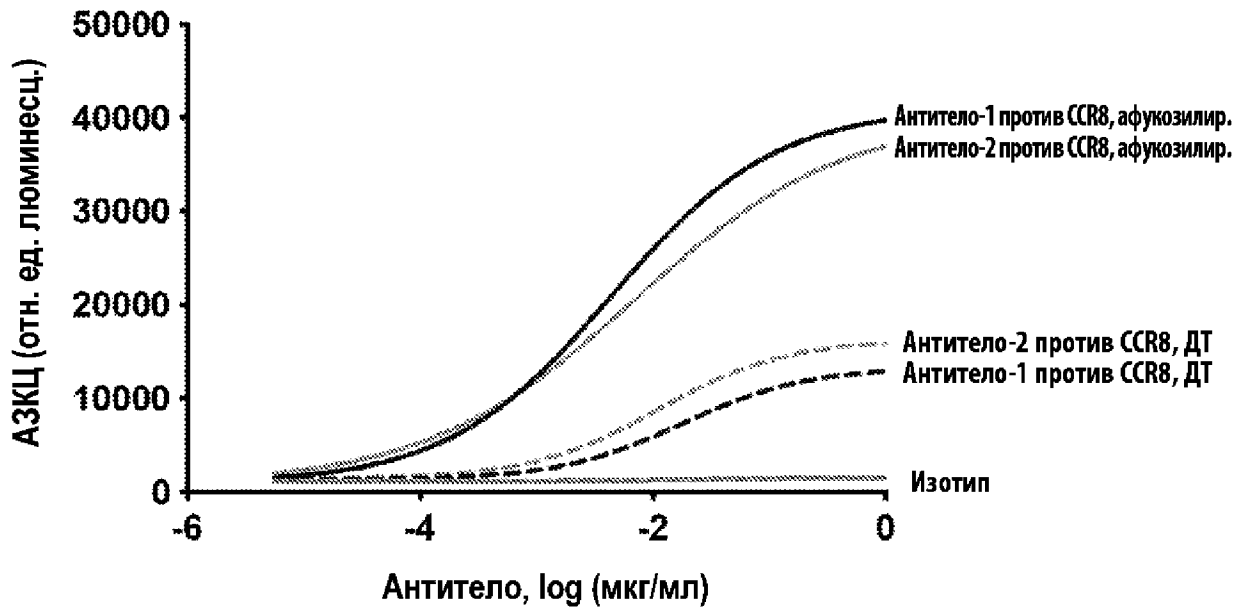
Фиг. 10



Фиг. 11

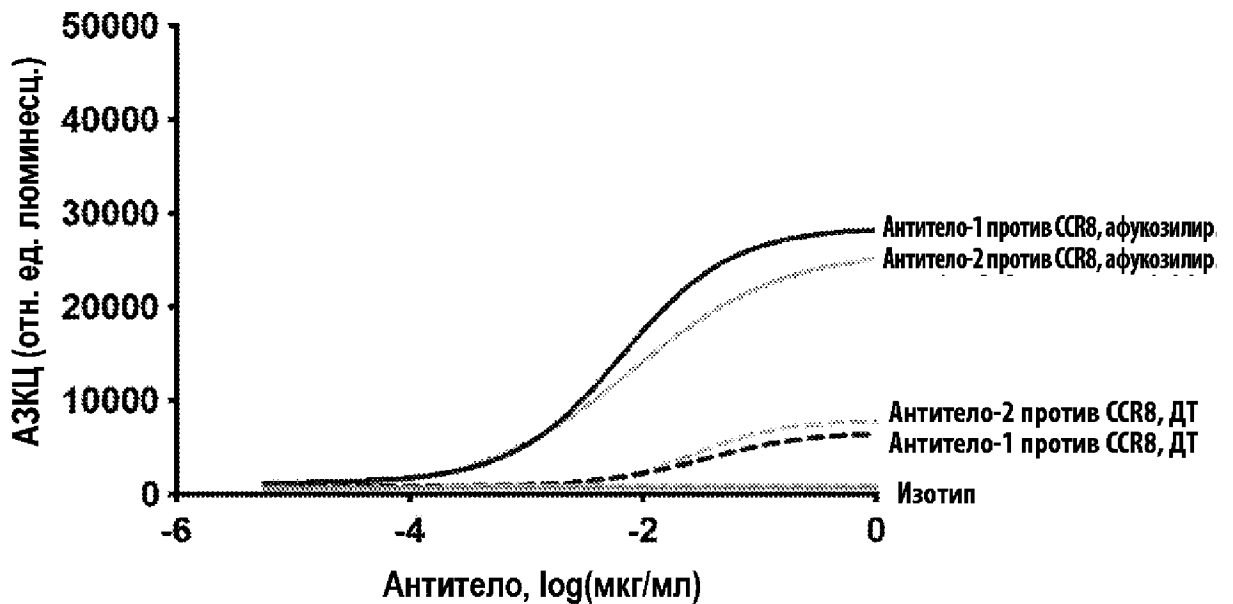


Фиг. 12А НК-клетки – аллель CD16 VV

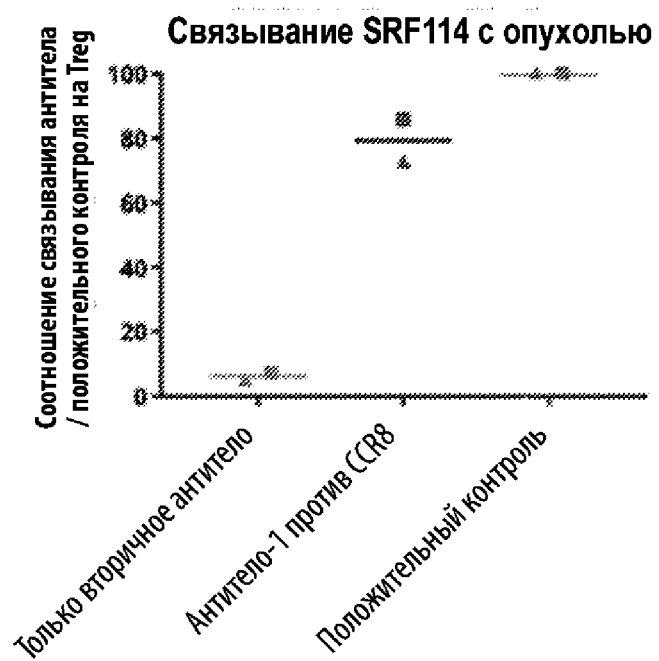


Фиг. 12В

НК-клетки – аллель CD16 FF

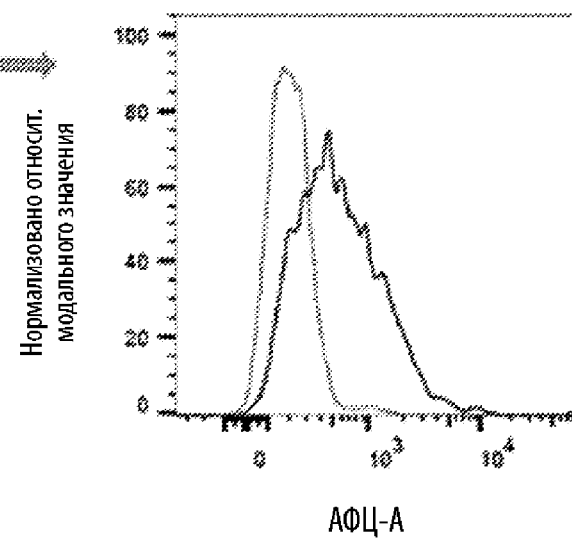


Фиг. 13А



Фиг. 13В

▲ Почка
■ Молочная железа



Фиг. 13С

