

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292701** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.01.18**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2021.03.22**

**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR8 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО  
НОВООБРАЗОВАНИЯ**

(31) **62/993,570; 63/041,992; 63/157,618**

(32) **2020.03.23; 2020.06.21; 2021.03.05**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/023430**

(87) **WO 2021/194942 2021.09.30**

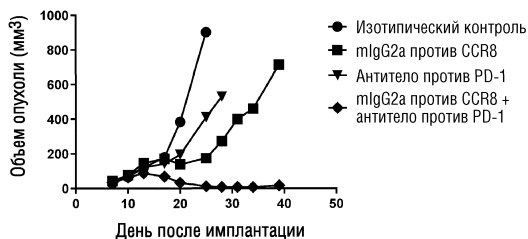
(71) Заявитель:  
**БРИСТОЛЬ-МЕЙЕРЗ СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Лань Рут Инь-Цзун, Аделакурн  
Олуфем А., Барман Ишита,  
Кэмпбелл Джозеф Ричард, Дион  
СиДжей Цзянь Чжэ, Финдайзен  
Феликс, Гринавальт Дэниэль М.,  
Джаин Рену, Джхатакия Эми Д., Ли  
Джон К., Ли Питер Сунг Кеун, Лян  
Линда, Лу Каи, Макдональд Брайан,  
Меско Пол Блейн, Раджпал Арвинд,  
Самбантхамоорти Шармила, Селби  
Марк Дж., Симерс Натан О., Стрп  
Павел, Терресина Габи А., Ван Си-Тао  
(US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Изобретение относится к выделенным антителам, например моноклональным антителам, специфически связывающимся с рецептором хемокинов с С-С-мотивом 8 (CCR8), экспрессирующимся на поверхности клетки, и опосредующим истощение CCR8-экспрессирующей клетки посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающим введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела против CCR8 в виде монотерапии или в комбинации с противоопухолевым средством, таким как ингибитор иммунных контрольных точек, например антитело против PD-1 или против PD-L1.



**A1**

**202292701**

**202292701**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-575778EA/030

### **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR8 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ**

На всем протяжении настоящей заявки ссылки на разные публикации приведены в скобках по имени автора и дате или номеру патента или патентной публикации. Полное цитирование этих публикаций можно найти в конце описания непосредственно перед формулой изобретения. Таким образом, описания этих публикаций включены в настоящую заявку в качестве ссылок в полном объеме для более полного описания уровня техники, известного специалисту в этой области на дату приоритета изобретения, описанного и заявленного в настоящем описании. Однако, эти описания включены в настоящую заявку только в той степени, в какой не существует противоречия между информацией, включенной посредством ссылки, и информацией, предоставленной явным раскрытием в настоящей заявке. Кроме того, цитирование ссылки в настоящем описании не следует истолковывать как признание того, что такая ссылка является предшествующим уровнем техники настоящего изобретения.

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По настоящей заявке испрашивается приоритет по временным заявкам США № 63/157618, поданной 5 марта 2021 года; № 63/041992, поданной 21 июня 2020 года; и № 62/993570, поданной 23 марта 2020 года, содержание каждой из которых включено, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### **СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Настоящая заявка включает список последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Копия ASCII создана 19 марта 2021 года, названа 20210319\_SEQ1\_13358WOPCT.txt и имеет размер 81920 байт.

#### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам (Ab), например, моноклональным антителам (mAb), специфически связывающимся с рецептором хемокинов с C-C-мотивом 8 (CCR8), и способам лечения злокачественного новообразования у индивидуума, включающим введение индивидууму Ab против CCR8 в виде монотерапии или в комбинации с противоопухолевым средством, таким как ингибитор иммунных контрольных точек.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Злокачественные новообразования человека несут многочисленные генетические и эпигенетические изменения, приводящие к образованию неоантигенов, потенциально распознаваемых иммунной системой (Chakravarthi et al., 2016). Использование атрибутов адаптивной иммунной системы для лечения злокачественного новообразования делает иммунотерапию уникальной среди способов лечения злокачественных опухолей по своей

пригодности для широкого диапазона злокачественных новообразований и по индуцированию длительных противоопухолевых эффектов.

Уже достигнут значительный успех в лечении различных солидных опухолей и гемобластозов посредством стимуляции активности цитотоксических Т-клеток с использованием ингибиторов контрольных точек, таких как Ab против PD-1, ниволумаба (OPDIVO®) и Ab против CTLA-4, ипилимумаба (YERVOY®). Однако, как правило, менее 15% пациентов получают долговременную пользу от лечения ингибитором контрольных точек при злокачественных новообразованиях, поддающихся такому лечению (Haslam and Prasad, 2019), и доказано, что ингибиторы контрольных точек менее эффективны при некоторых злокачественных новообразованиях, включая рак молочной железы и рак предстательной железы. Устойчивость иммуносупрессорных механизмов, в особенности опосредованных регуляторными Т-клетками ( $T_{reg}$ -клетками), может вносить вклад в наблюдаемую резистентность некоторых злокачественных новообразований или некоторых пациентов к лечению ингибиторами контрольных точек (Fares et al., 2019; Han et al., 2019). В качестве одного из средств преодоления этой резистентности, в настоящей заявке описывают способы стимуляции иммунной системы посредством снижения иммуносупрессорных эффектов  $T_{reg}$ -клеток.

Инфильтрирующие опухоль  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$   $T_{reg}$ -клетки, субпопуляция  $CD4^+$  Т-клеток, являются медиаторами иммунологической аутоотолерантности. Дефицит генов, участвующих в развитии и функционировании  $T_{reg}$ -клеток, приводит к системному аутоиммунитету у мышей (Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003; Tivol et al., 1995) и людей (Yagi et al., 2004; Kuehn et al., 2014), что свидетельствует о важной избыточной роли  $T_{reg}$ -клеток в поддержании иммунного гомеостаза.  $T_{reg}$ -клетки супрессируют иммунная система посредством множества механизмов, включая отрицательную регуляцию индуцирования и пролиферации эффекторных Т-клеток, секрецию хемокинов и ингибиторных цитокинов и супрессию созревания и функционирования дендритных клеток (Shitara and Nishikawa, 2018; Han et al., 2019). Механизмы, используемые  $T_{reg}$ -клетками для стимуляции аутоотолерантности, могут быть включены в микроокружение опухоли для супрессии противоопухолевого иммунного ответа. Фактически, системного истощения  $T_{reg}$ -клеток у мышей достаточно, чтобы сделать возможным иммуноопосредованное регрессирование опухоли (Teng et al., 2010). Таким образом, считают, что  $T_{reg}$ -клетки играют роль в опосредовании периферической толерантности к аутоантигенам, профилактике аутоиммунного заболевания и супрессии противоопухолевых иммунных ответов.

Таким образом, снижение активности или количества инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клеток определено как привлекательный подход для реверсирования иммуносупрессорной активности в микроокружении опухоли и усиления противоопухолевого иммунитета (Finotello and Trajanoski, 2017; Han et al., 2019). Разработаны или разрабатываются различные способы таргетинга  $T_{reg}$ -клеток при иммунотерапии злокачественных новообразований, включая ADCC-опосредованное

истощение  $T_{reg}$ -клеток с использованием антител (Ab) против антигенов, экспрессирующихся на  $T_{reg}$ -клетках, таких как CD25 (Arce Vargas et al., 2017), CCR4 (Ishida et al., 2012; Hagemann et al., 2014) и CTLA-4 (Korman et al., 2017), и ингибирование убиквитинлигазы E3 Siah2 (Scortegagna et al., 2020) и Yes-ассоциированного белка (YAP; Ni et al., 2018). Однако клинические попытки специфического таргетинга или истощения  $T_{reg}$  в микроокружении опухоли были безуспешными. Дифтерийный токсин, слитый с ИЛ-2 (денилейкин-дифтитокс), не мог эффективно снижать количество  $T_{reg}$  у пациентов с меланомой (Luke et al., 2016), и, несмотря на задокументированный опосредованный антителами против CTLA-4 истощение  $T_{reg}$  в моделях опухолей на мышах (Selby et al., 2013; Simpson et al., 2013), доказательства истощения  $T_{reg}$  ипилимумабом или тремелиумабом (Ab против CTLA-4 человека) в злокачественных новообразованиях человека являются нечеткими (Sharma et al., 2019a; Sharma et al., 2019b). Истощения  $T_{reg}$  достигали с помощью нефукозилированного (nf) Ab против CCR4 могамулизумаба, но также наблюдали значимое истощение общепринятых  $CD4^+$  Т-клеток и умеренное снижение количества  $CD8^+$  Т-клеток (Kurose et al., 2015), что ограничивает его пригодность в лечении солидных опухолей. Таким образом, сохраняется потребность в безопасном и эффективном  $T_{reg}$ -истощающем средстве, также сохраняющем эффекторные Т-клетки ( $T_{eff}$ ) для оптимальных противоопухолевых ответов.

CCR8 является хемокиновым рецептором, недавно идентифицированным в качестве потенциального специфического маркера инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клеток, т.к. экспрессия CCR8 подвергается селективной положительной регуляции в этих  $T_{reg}$ -клетках во многих злокачественных новообразованиях, включая рак молочной железы, колоректальный рак и рак легких (Plitas et al., 2016; De Simone et al., 2016; Wang et al., 2019), и в качестве основного члена IRF4-независимой эффекторной генетической программы  $T_{reg}$  (Alvisi et al., 2020). Эти  $CCR8^+$   $T_{reg}$ -клетки представляют собой высокоактивированную и супрессорную субпопуляцию  $T_{reg}$ -клеток, и высокое относительное количество  $CCR8^+$   $T_{reg}$ -клеток в этих типах опухолей ассоциировано с неблагоприятным прогнозом (Wang et al., 2019; De Simone et al., 2016). Таким образом, CCR8 может являться перспективной терапевтической мишенью для осуществления истощения резидентных  $T_{reg}$ -клеток опухоли для усиления противоопухолевого иммунитета. Таргетинг CCR8 при истощении супрессорных  $T_{reg}$ -клеток также может обладать преимуществом отсутствия истощения цитолитических эффекторных клеток, регулирующих противоопухолевые иммунные ответы. Кроме того, т.к. CCR8 редко экспрессируется на  $T_{reg}$ -клетках и  $T_{eff}$  в периферической крови или других тканях, таргетинг опухолевых  $CCR8^+$   $T_{reg}$ -клеток может иметь минимальный риск токсичности.

CCR8 является сопряженным с G-белком хемокиновым рецептором с семьей трансмембранными доменами (GPCR), экспрессирующимся, главным образом, на внутриопухолевых FOXP3<sup>hi</sup>  $T_{reg}$ -клетках (Wang et al., 2019; Plitas et al., 2016; De Simone et al., 2016). N-конец и области ECL2 CCR8 важны для связывания с его функциональным лигандом, лигандом рецептора хемокинов с C-C-мотивом 1 (CCL1), продуцирующимся



внутриопухолевыми миелоидными клетками и Т-клетками. В дополнение к влиянию на миграцию T<sub>reg</sub>-клеток в микроокружение опухоли (TME), взаимодействие CCL1:CCR8 также потенцирует иммуносупрессорную способность T<sub>reg</sub>-клеток посредством положительной регуляции CCR8, FOXP3, ИЛ-10 и других супрессорных факторов (Vila-Caballer et al., 2019).

В недавно выданном патенте США № 10087259 заявлен способ лечения злокачественного новообразования посредством введения пациенту со злокачественным новообразованием Ab-средства, специфически связывающегося с CCR8, таким образом, что инфильтрирующие опухоль T<sub>reg</sub> клетки специфически истощаются у пациента в большей степени, чем инфильтрирующие нормальную ткань Т-клетки. Однако в этом патенте не приведены примеры какого-либо Ab-средства, специфически связывающегося с CCR8, а также не продемонстрирован какой-либо способ лечения какого-либо злокачественного новообразования посредством введения индивидууму Ab против CCR8.

В патенте США № 10550191 заявлен способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение Ab против CCR8. В примерах показано, что одно Ab, коммерчески доступное Ab крысы IgG2b против CCR8 мыши (против mCCR8) (клон SA214G2; BioLegend, San Diego, CA), снижает объем различных опухолей в моделях опухолей на мышках. Не описано Ab против CCR8 человека (против hCCR8) или какое-либо химерное, гуманизированное или человеческое Ab, пригодное для использования в терапии на людях.

Публикация PCT № WO 2018/112033 относится к способам лечения злокачественного новообразования посредством введения индивидууму средства, индуцирующего цитотоксичность в инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клетках, экспрессирующих определенный продукт гена, включенный в таблицу 1 или 2, и, таким образом, снижающего количество или активность инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клеток у индивидуума. CCR8 не является продуктом гена, включенным в таблицу 1 или 2, но в примере 8 показан умеренный уровень противоопухолевой активности Ab против mCCR8 в модели аденокарциномы толстого кишечника MC38 на мышках.

Публикация PCT № WO 2019/157098 относится к иммуногенной композиции, содержащей рекомбинантный штамм *Listeria* и Ab против CCR8, и способу лечения опухоли у индивидуума, включающему индивидууму введение этой иммуногенной композиции. Аналогично патенту США № 10550191, в WO 2019/157098 не описано получение какого-либо Ab против CCR8, но вместо этого показано применение коммерческого Ab против mCCR8 SA214G2 в комбинации со средством на основе *Listeria* для лечения имплантированных опухолей карциномы толстого кишечника в модели на мышках.

В последнее время различные группы сообщают о получении гуманизированных Ab против CCR8 для применения в истощении опухолеассоциированных T<sub>reg</sub>-клеток и лечении злокачественных новообразований (см., например, Dépiset al., 2020; WO 2020/138489; Harbour BioMed, 2020).

Настоящее изобретение демонстрирует, что экспрессия CCR8 сильно ограничена опухолевыми  $T_{reg}$ -клетками из различных типов опухолей. Настоящее изобретение включает получение Ab против CCR8, в частности mAb против CCR8, включая человеческие, гуманизированные и химерные mAb против hCCR8, и в нем показано, что для опосредованного антителами против CCR8 истощения  $T_{reg}$  в моделях опухолей на мышцах необходимо вовлечение Fc. Настоящее изобретение также относится к разработке nf-Ab против hCCR8, опосредующих истощение опухолеспецифических  $T_{reg}$  в системах культур опухолей человека *ex vivo*. Лечение Ab против CCR8 в виде монотерапии или в комбинации с блокадой контрольных точек, например, ингибированием пути передачи сигнала PD-1/PD-L1, индуцирует мощные противоопухолевые ответы и может приносить клиническую пользу пациентам, не отвечающим на монотерапию против PD-1. Комбинация механизмов действия опосредованного антителами против CCR8 истощения  $T_{reg}$  и блокады контрольных точек предлагает уникальную возможность усиления уничтожения опухолевых клеток и, таким образом, лечения широкого диапазона злокачественных новообразований.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к выделенным Ab, предпочтительно - mAb, специфически связывающимся с CCR8, таким как CCR8 человека (hCCR8), экспрессирующимся на поверхности клетки, и демонстрирующим различные функциональные свойства, включая свойства, желательные для терапевтического Ab. Эти свойства включают связывание с высокой аффинностью с CCR8-экспрессирующими клетками, такими как инфильтрирующие опухоль, активированные  $CD4^+FOXP3^{high}$   $T_{reg}$ -клетки; иные, чем  $T_{reg}$ -клетки, связывание только с редкими и рассеянными иммунными клетками в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, но не связывание со многими другими тканями; опосредование истощения CCR8-экспрессирующих клеток, таких как инфильтрирующие опухоль, активированные  $CD4^+FOXP3^{high}$   $T_{reg}$ -клетки, посредством ADCC; опосредование специфического истощения инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клеток, но не CCR8<sup>+</sup> Т-клеток в нормальных тканях; ингибирование связывания CCL1 с CCR8 и ингибирование передачи сигнала CCR8/CCL1; отсутствие индуцирования интернализации CCR8 при связывании с CCR8 на поверхности клетки в присутствии или отсутствие перекрестно сшивающего Ab; опосредование специфического истощения CCR8<sup>+</sup>  $T_{reg}$ -клеток *in vitro* и в образцах опухолевых тканей человека *ex vivo*; и ингибирование роста опухолевых клеток у индивидуума, предпочтительно - человека, при введении индивидууму в виде монотерапии или в комбинации с другим противоопухолевым средством. В предпочтительных вариантах осуществления Ab против CCR8 является модифицированным mAb, содержащим модифицированную константную область тяжелой цепи, такую как гипофукозилированная или нефукозилированная (nf) константная область тяжелой цепи, связывающаяся с более высокой аффинностью с рецептором Fcγ (FcγR) и опосредующая повышенную ADCC по сравнению с немодифицированным mAb.

В частности, настоящее изобретение относится к выделенному Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, специфически связывающемуся с CCR8, экспрессируемым на поверхности клетки, и опосредующим истощение CCR8-экспрессирующих клеток посредством ADCC. В некоторых вариантах осуществления CCR8 является hCCR8, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых других вариантах осуществления Ab, например, mAb, или его антигенсвязывающая часть содержит константную область тяжелой цепи, имеющую изотип IgG1 или IgG3 человека.

Настоящее изобретение также относится к модифицированному mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающей части, содержащему модифицированную константную область тяжелой цепи, связывающуюся с более высокой аффинностью с рецептором Fcγ (FcγR) и опосредующую повышенную ADCC по сравнению с немодифицированным mAb или его антигенсвязывающей частью. В предпочтительных вариантах осуществления модифицированное mAb или его антигенсвязывающая часть содержит модифицированную константную область тяжелой цепи IgG1, демонстрирующую сниженное фукозилирование. В некоторых вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть связывается с N-концевым пептидом hCCR8, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub> (SEQ ID NO: 2), и дополнительно содержит сульфатированный остаток tyr-15 и/или сульфатированный остаток tyr-17. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть связывается с N-концевым пептидом hCCR8, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109), и дополнительно содержит сульфатированный остаток tyr-15 и сульфатированный остаток tyr-17.

В некоторых вариантах осуществления mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть демонстрирует по меньшей мере одно, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все из следующих свойств: (a) специфически связывается с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с EC<sub>50</sub> приблизительно 1 нМ или менее или EC<sub>50</sub> приблизительно 2 нМ или менее; (b) связывается с редкими или рассеянными иммунными клетками в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, но не связывается с тканью головного мозга, мозжечка, сердца, печени, почки, легких, миндалин, селезенки, тимуса, толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, надпочечника, гипофиза, кожи, периферического нерва, яичка или матки человека или моноклеарными клетками периферической крови (PBMC); (c) ингибирует связывание CCL1 с CCR8 и ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с IC<sub>50</sub> приблизительно 5 нМ или менее; (d) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клеток с EC<sub>50</sub> приблизительно 10 пМ или менее или EC<sub>50</sub> приблизительно 60 пМ или менее; (e) при введении индивидууму опосредует истощение инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клеток но, по существу, сохраняет CCR8<sup>+</sup> T-клетки в селезенке, крови, коже или тимусе; (f) при связывании с CCR8 на

поверхности клетки не вызывает интернализацию CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно сшивающего Ab; (g) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в виде монотерапии; и (h) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как ингибитор иммунных контрольных точек, для лечения злокачественного новообразования.

В частности, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть демонстрирует по меньшей мере следующие свойства: (a) специфически связывается с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с  $EC_{50}$  приблизительно 1 нМ или менее или  $EC_{50}$  приблизительно 2 нМ или менее; (b) ингибирует связывание CCL1 с CCR8 и ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с  $IC_{50}$  приблизительно 5 нМ или менее; (c) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клеток с  $EC_{50}$  приблизительно 10 пМ или менее или  $EC_{50}$  приблизительно 60 пМ или менее; (d) при введении индивидууму опосредует истощение инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клеток, но, по существу, сохраняет CCR8<sup>+</sup> Т-клетки в селезенке, крови, коже или тимусе; (e) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в виде монотерапии; и (f) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как ингибитор иммунных контрольных точек, для лечения злокачественного новообразования.

В других вариантах осуществления mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть демонстрирует по меньшей мере следующие свойства: (a) специфически связывается с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 1 нМ или менее или  $EC_{50}$  приблизительно 2 нМ или менее; (b) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клеток с  $EC_{50}$  приблизительно 10 пМ или менее или  $EC_{50}$  приблизительно 60 пМ или менее; (c) при введении индивидууму опосредует истощение инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клеток, но, по существу, сохраняет CCR8<sup>+</sup> Т-клетки в селезенке, крови, коже или тимусе; и (d) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как ингибитор иммунных контрольных точек, для лечения злокачественного новообразования.

Эти свойства подробно исследовали для некоторых Ab по изобретению, включая, например, Ab, обозначенные в настоящем описании как 14S15 и 4A19. mAb 4A19 является nf гуманизированным Ab, в то время как mAb 14S15 является nf химерным Ab, содержащим Fab-фрагмент мыши, пересаженный на Fc-область человека, и осуществляли несколько анализов, представленных в настоящем описании, с использованием mAb, включая 14S15 и 4A19. Затем mAb 14S15 гуманизировали для получения Ab, обозначенного как 14S15h, посредством модификации каркасных последовательностей так, чтобы они соответствовали ближайшим последовательностям зародышевой линии человека (см. пример 10). Заключительная итерация гуманизированного mAb,

полученного после созревания аффинности вариабельного домена тяжелой цепи, демонстрировала аффинность связывания с hCCR8, сравнимую и, фактически, немного большую, чем у исходной версии мыши или химерной версии этого Ab ( $K_D$  0,64 нМ для Fab-фрагмента 14S15h против 1,4 нМ для исходного mAb мыши). Таким образом, ожидают, что 14S15h будет проявлять те же или очень схожие функциональные свойства относительно продемонстрированных химерным mAb 14S15. Таким образом, указанные выше функциональные свойства, в отдельности или в комбинации, могут присутствовать в комбинации с структурными признаками mAb 14S15, 14S15h и 4A19.

Например, в некоторых вариантах осуществления Ab или его антигенсвязывающая часть может иметь одно или более указанных выше свойств (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 указанных выше свойств) и содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16. В качестве другого примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать следующие домены CDR, определенные способом Kabat: CDR1  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 33; CDR2  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 34; CDR3  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 35; CDR1  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 36; CDR2  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 37; и CDR3  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 38. В качестве дополнительного примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16. В качестве другого примера, такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 112. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или имеет гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

Например, в некоторых других вариантах осуществления изобретения Ab или его антигенсвязывающая часть может иметь одно или более указанных выше свойств (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 указанных выше свойств) и содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные

аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116. В качестве другого примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать следующие домены CDR, определенные способом Kabat: CDR1  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 103; CDR2  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 104; CDR3  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 105; CDR1  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 106; CDR2  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 107; и CDR3  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 108. В качестве дополнительного примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116. В качестве другого примера, такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 117, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 118. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или имеет гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

Например, в некоторых других вариантах осуществления изобретения Ab или его антигенсвязывающая часть может иметь одно или более указанных выше свойств (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 указанных выше свойств) и содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18. В качестве другого примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать следующие домены CDR, определенные способом Kabat: CDR1  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 45; CDR2  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 46; CDR3  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 47; CDR1  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 48; CDR2  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 49; и CDR3  $V_L$ , содержащую

последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 50. В качестве дополнительного примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18. В качестве другого примера, такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или имеет гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, специфически связывающемуся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержащему домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из следующих пар переменных областей тяжелой и легкой цепи:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 5, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 17;

(d)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18;

(e)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 7, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 19;

(f)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 8, и  $V_L$ , содержащую последовательно

связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 20;

(g)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 9, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 21;

(h)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 22;

(i)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 11, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 23;

(j)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 12, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 24;

(k)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 13, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 25;

(l)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

Выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержащее домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из следующих пар переменных областей тяжелой и легкой цепи, имеет следующие примеры:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую



последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116; и

(с)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18,

Выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержащее домены CDR1, CDR2 и CDR3 в следующей паре вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, имеет конкретный пример:

(а)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

Последовательности CDR можно определять различными способами, включая определения по Kabat, Chothia, AbM, системе Contact и IMGT. Если четко не указано иное, CDR в настоящем описании определены с помощью определений Kabat.

Настоящее изобретение также относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей любое из mAb против CCR8 или их антигенсвязывающих частей, представленных в настоящем описании. Настоящее изобретение относится к экспрессирующему вектору, содержащему указанную выделенную нуклеиновую кислоту, и клетке-хозяину, содержащей указанный экспрессирующий вектор. Эту клетку-хозяина можно использовать в способе получения mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, при этом способ включает экспрессию mAb или его антигенсвязывающей части в указанной клетке-хозяине и выделение mAb или его антигенсвязывающей части из клетки-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, представленного в настоящем описании, например, опосредующего истощение CCR8-экспрессирующих клеток, таким образом, что индивидуума подвергают лечению. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, представленного в настоящем описании, например, опосредующего истощение CCR8-экспрессирующих клеток, таким образом, что ингибируют рост опухолевых клеток у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления этих способов mAb против CCR8 при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клеток с  $EC_{50}$  приблизительно 10 пМ или менее. В некоторых других вариантах осуществления mAb против CCR8 при

связывании с CCR8 на поверхности клетки ингибирует связывание CCL1 с CCR8 и ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с  $IC_{50}$  приблизительно 5 нМ или менее. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, представленному в настоящем описании, например, опосредующему истощение CCR8-экспрессирующих клеток, для применения в способе лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, или для применения в способе ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, при этом каждый способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающему введение индивидууму комбинации терапевтически эффективных количеств (a) Ab против CCR8, например, mAb или его антигенсвязывающей части, представленного в настоящем описании, например, опосредующего истощение CCR8-экспрессирующих клеток, и (b) дополнительного терапевтического средства для лечения злокачественного новообразования, необязательно, где дополнительное терапевтическое средство является соединением, снижающим ингибирование или повышающим стимуляцию иммунной системы. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является антагонистическим Ab или его антигенсвязывающей частью, специфически связывающейся с PD-1, PD-L1 или CTLA-4. Способ также может являться способом ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума.

Если такие способы включают использование комбинации терапевтических средств, их можно обозначать по-разному. Например, если в способе лечения используют средства (A) и (B), например, для лечения злокачественного новообразования, их можно обозначать как: (i) средство (A) и средство (B) для использования в способе лечения злокачественного новообразования; (ii) средство (A) для использования со средством (B) в способе лечения злокачественного новообразования; или (iii) средство (B) для использования со средством (A) в способе лечения злокачественного новообразования. Таким образом, указанную выше комбинацию можно обозначать как:

(i) (A) mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть, например, опосредующее истощение CCR8-экспрессирующих клеток, и (B) дополнительное терапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования для использования в способе лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, или для использования в способе ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму комбинации терапевтически эффективных количеств (A) mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, например, опосредующего истощение CCR8-экспрессирующих клеток, и (B) дополнительного терапевтического средства для лечения злокачественного новообразования; или

(ii) (A) mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть, например, опосредующее истощение CCR8-экспрессирующих клеток, для использования с (B) дополнительным терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования в способе лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, или способе ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму комбинации терапевтически эффективных количеств (A) mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, например, опосредующего истощение CCR8-экспрессирующих клеток, и (B) дополнительного терапевтического средства для лечения злокачественного новообразования; или

(iii) (B) дополнительное терапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования для использования с (A) mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей частью, например, опосредующим истощение CCR8-экспрессирующих клеток, в способе лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, или способе ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму комбинации терапевтически эффективных количеств (B) дополнительного терапевтического средства для лечения злокачественного новообразования и (A) mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, например, опосредующего истощение CCR8-экспрессирующих клеток.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему: (a) одну или более доз в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела или фиксированную дозу от приблизительно 0,1 до приблизительно 2000 мг выделенного Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, специфически связывающегося с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и опосредующего истощение CCR8-экспрессирующих клеток посредством ADCC; (b) необязательно, одну или более доз в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 1600 мг mAb или его антигенсвязывающей части, специфически связывающегося с PD-1, PD-L1 или CTLA-4; и (c) инструкции по использованию выделенного Ab или его части, специфически связывающегося с CCR8, и, необязательно, mAb или его части, специфически связывающегося с PD-1, PD-L1 или CTLA-4, в терапевтических способах, представленных в настоящем описании.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и примеров, которые не следует истолковывать как ограничение. Содержание всех процитированных ссылок, включая научные статьи, записи в GenBank, патенты и патентные заявки, процитированные на всем протяжении настоящей заявки, конкретно включены в настоящее описание в качестве ссылки.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фигуры 1A-1C показаны анализы ген-генных корреляций CCR8 и FOXP3 человека в Атлас ракового генома (TCGA). A: С помощью основанной на взаимном ранге сети ген-генной корреляции среди данных секвенирования РНК всех негематологических опухолей TCGA идентифицируют CCR8 как T<sub>reg</sub>-селективный маркер. B: Анализ

секвенирования РНК отдельных клеток печеночноклеточной карциномы (НСС) свидетельствует о том, что CCR8 селективно экспрессируется на FOXP3<sup>high</sup> лимфоцитах в образцах опухоли НСС. С: Коэффициент ранговой корреляции Спирмена, проведенный на FOXP3<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, свидетельствует о том, что экспрессия CCR8 ассоциирована с более высокими уровнями экспрессии FOXP3.

На фигурах 2A-2F показано, что экспрессия CCR8, по сравнению с другими нацеленными на T<sub>reg</sub> молекулами, обогащена на опухолевых T<sub>reg</sub>-клетках. А: Проточно-цитометрический анализ частот CCR8-, CCR4-, CTLA-4- и CD25-положительных клеток среди T<sub>reg</sub>-клеток из опухоли и крови пациентов со злокачественными новообразованиями (колоректальным раком, раком почки, раком легких и меланомой) (n=8-18). В: Относительные уровни экспрессии (MFI) мишеней T<sub>reg</sub> на CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетках из крови (n=6-10) и опухолей (n=7-20) пациентов со злокачественными новообразованиями. С-Е: Частоты мишеней T<sub>reg</sub> на CD4<sup>+</sup> T<sub>conv</sub> из опухолей (С) и крови (D) и CD8<sup>+</sup> Т-клетках из опухолей (Е) (n=7-17) и образцов периферической крови (F) (n=5-13) пациентов со злокачественными новообразованиями. Не все маркеры анализировали для всех пациентов, и не все пациенты имели совпадающие образцы крови. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001. А-В: Двухсторонний ANOVA с последующим использованием поправки Бонферрони на множественность сравнений; С-F: Односторонний ANOVA с критерием Краскела-Уоллиса с последующим использованием критерия Данна.

На фигурах 3A-3C показаны проточно-цитометрические анализы, свидетельствующие о том, что CCR8 сильно экспрессируется на инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клетках. Уровень экспрессии CCR8 измеряли в разных популяциях Т-клеток. А: Процентная доля субпопуляций инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов, экспрессирующих CCR8. Значимо более высокая доля инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клеток экспрессирует CCR8 по сравнению с общепринятыми CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> (CD4 T<sub>conv</sub>) Т-клетками и CD8<sup>+</sup> Т-клетками (CD8). В: Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) PE-конъюгированного Ab против CCR8, связанного с субпопуляциями инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов. Опухолевые T<sub>reg</sub>-клетки также экспрессируют более высокие уровни CCR8 в пересчете на клетку по сравнению с CD4 T<sub>conv</sub> и CD8 клетками. С: Сравнение уровней экспрессии CCR8 T<sub>reg</sub> на CCR8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетках в крови и опухолевой ткани пациентов со злокачественными новообразованиями. Наблюдали низкий уровень экспрессии CCR8 на T<sub>reg</sub>-клетках в периферической крови по сравнению со значимо более высоким уровнем на инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клетках.

На фигурах 4A-4D показано, что CCR8 дифференциально экспрессируется на разных субпопуляциях T<sub>reg</sub>. А: Процентная доля клеток в разных популяциях Т-клеток в РВМС здоровых индивидуумов, экспрессирующих CCR8. CCR8 преимущественно экспрессируется на периферических T<sub>reg</sub>-клетках. В: Процентная доля клеток в разных субпопуляциях T<sub>reg</sub> здоровых индивидуумов, экспрессирующих CCR8. В популяции T<sub>reg</sub> CCR8 больше экспрессируется в популяции эффекторной памяти (ЕМ) и в меньшей степени в клетках центральной памяти (СМ), при этом очень немного CCR8

экспрессируется в наивных  $T_{reg}$ -клетках. С: Процентная доля клеток среди общепринятых клеток  $CD4 T_{conv}$ , экспрессирующих CCR8. Наблюдали низкую экспрессию CCR8 в любой субпопуляции этих клеток  $CD4 T_{conv}$ . D: Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) Аб против CCR8, связанного с  $CCR8^+$   $T_{reg}$ -клетками из периферической крови или инфильтрирующими опухоль  $T_{reg}$ -клетками от пациентов со злокачественными новообразованиями. У пациентов со злокачественными новообразованиями наблюдали более высокую экспрессию CCR8 в пересчете на клетку на инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клетках, чем на  $T_{reg}$ -клетках из периферической крови.

На фигуре 5 показано, что CCR8 экспрессируется на наиболее иммуносупрессорной популяции  $CD4^+FOXP3^{high} T_{reg}$ . Опухоли от 2 пациентов с меланомой и 1 пациента с почечноклеточной карциномой (RCC) подвергали диссоциации и окрашивали на экспрессию FOXP3 и CCR8. CCR8, в основном, экспрессируется  $CD4^+FOXP3^{high}$  популяцией, представляющей собой наиболее активированные  $T_{reg}$ -клетки.

На фигурах 6A-6D показаны процентные доли  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  Т-клетки, экспрессирующие CD25, CD39 и ИЛ-1R2. А: Процентные доли  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  клеток, экспрессирующих CD25; В: Процентные доли  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  клеток, экспрессирующих CD39; С: Процентные доли  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  клеток, экспрессирующих ИЛ-1R2; D: Процентные доли стимулированных  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  клеток, экспрессирующих ИЛ-1R2.

На фигурах 7A-7D показаны процентные доли  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD39, и ИЛ-1R2. А: Процентные доли  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  клеток, экспрессирующих CD25; В: Процентные доли  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  клеток, экспрессирующих CD39; С: Процентные доли  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  клеток, экспрессирующих ИЛ-1R2; D: Процентные доли стимулированных  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  клеток, экспрессирующих ИЛ-1R2.

На фигурах 8А и 8В показаны процентные доли  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  Т-клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR (8А) и процентные доли  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  Т-клеток, экспрессирующих этот маркер (8В).

На фигурах 9А-9С показаны процентные доли стимулированных  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  Т-клеток, экспрессирующих ИФН $\gamma$ , ИЛ-2 и гранзим В. А: Процентные доли стимулированных  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  клеток, экспрессирующих ИФН $\gamma$ ; В: Процентные доли стимулированных  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  клеток, экспрессирующих ИЛ-2; С: Процентные доли стимулированных  $CCR8^+$  и  $CCR8^-$  клеток, экспрессирующих гранзим В.

На фигурах 10А-10С показаны процентные доли стимулированных  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  Т-клеток, экспрессирующих ИФН $\gamma$ , ИЛ-2 и гранзим В. А: Процентные доли стимулированных  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  клеток, экспрессирующих ИФН $\gamma$ ; В: Процентные доли стимулированных  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  клеток, экспрессирующих ИЛ-2; С: Процентные доли стимулированных  $CCR4^+$  и  $CCR4^-$  клеток, экспрессирующих гранзим В.

На фигурах 11А и 11В показано связывание разных mAb против hCCR8 с hCCR8-экспрессирующими линиями клеток или активированными  $T_{reg}$ -клетками человека. А: Получали Аб против hCCR8, демонстрирующие различные диапазоны аффинностей связывания (бины  $EC_{50}$  в нМ) с hCCR8-трансфицированными линиями клеток (293F, CHO,

Raji) и активированными T<sub>reg</sub>-клетками человека. В: Показаны значения EC<sub>50</sub> (нМ) выбранной субпопуляции mAb против CCR8, связывающихся с активированными T<sub>reg</sub>-клетками.

На фигурах 12А и 12В показана кристаллическая структура Fab-фрагмента 4А19, связанного с N-концевым пептидом hCCR8. А: Fab-фрагмент 4А19, связанный с однократно сульфатированным (по tyr-17) N-концевым пептидом hCCR8, с разрешением 2,03 Å. Эпитоп, связанный mAb 4А19, содержит остатки 15-21 с сульфатированным остатком тирозина-17 в центре эпитопа; В: Fab-фрагмент 4А19, связанный с дважды сульфатированным (по tyr-15 и tyr-17) N-концевым пептидом hCCR8, с разрешением 1,80 Å. Эпитоп, связанный mAb 4А19, содержит остатки 12-22.

На фигурах 13А и 13В показана перекрестная тканевая реактивность разных mAb против hCCR8, используемых в количестве 1 мкг/мл (верхняя панель) и 3 мкг/мл (верхняя панель), в отношении нормальных РВМС человека и нормального тимуса человека, соответственно. А: Связывание mAb 18Y12 (левые панели), 16B13 (средние панели) и 4А19 (правые панели) с РВМС. mAb 18Y12 и 4А19 не связываются с РВМС, в то время как 16B13 демонстрирует высокий уровень связывания с мишенью, которая вряд ли является CCR8. В: Связывание mAb 18Y12 (левые панели), 16B13 (средние панели) и 4А19 (правые панели) с тканью тимуса. mAb 18Y12 не демонстрируют какого-либо окрашивания, в то время как наблюдали положительное окрашивание в случае mAb 4А19 в редких и рассеянных иммунных клетках в мозговом веществе тимуса. mAb 16B13 демонстрирует интенсивное и диффузное окрашивание в подавляющем большинстве иммунных клеток в тимусе с преобладающими цитоплазматическими и/или перинуклеарными паттернами.

На фигурах 14А-14С показано, что mAb против hCCR8 блокируют связывание CCL1 человека (hCCL1) с hCCR8. А: mAb против hCCR8 демонстрируют разные способности к блокированию связывания hCCL1 с hCCR8 на hCCR8-трансфицированными клетками CHO, что оценивали по ингибированию тока Ca. В: Процент блокады передачи сигнала CCL1 (CCL1-индуцированного тока Ca) показан для 7 выбранных Ab против hCCR8. С: Кривые IC<sub>50</sub> блокирования тока Ca показаны для 4 выбранных mAb против CCR8.

На фигурах 15А и 15В показано, что mAb против hCCR8 опосредуют перекрестную сшивку CD16 репортерных CD16-экспрессирующих клеток, что отражает потенциал mAb против CCR8 к ADCC. Совместные культуры CD16-экспрессирующих люцифераза-репортерных клеток с CCR8-экспрессирующими клетками Raji или активированными T<sub>reg</sub>-клетками обрабатывали Ab против CCR8 (с нефукозилированным (nf) остовом или остовом hIgG1 дикого типа). А: наблюдали диапазон способностей к перекрестной сшивке CD16. В: Показана перекрестная сшивка CD16 с использованием активированных T<sub>reg</sub> в качестве мишеней для выбранного набора mAb против hCCR8 с остовом hIgG1-nf.

На фигуре 16 показано, что Ab против CCR8 опосредуют уничтожение активированных  $T_{reg}$ -клеток аллогенными NK-клетками. Активированные  $T_{reg}$ -клетки сокультивировали с примированными аллогенными NK-клетками и титровали Ab против hCCR8. Гибель клеток измеряли по положительности по аннексину-V на  $T_{reg}$ -клетках.

На фигурах 17A и 17B показано, что mAb против CCR8 опосредуют уничтожение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток пациента аллогенными NK-клетками *in vitro*. Подвергнутые ферментативной диссоциации опухоли эндометрия пациента сокультивировали с примированными аллогенными NK-клетками в течение 24 часов при 37°C. Ab против CCR8, 14S15, специфически истощало опухолевые  $T_{reg}$ -клетки пациента (фигура 17A), но не общепринятые  $CD4^+$  T-клетки (фигура 17B). В отличие от этого, Ab против CCR4 (CCR4) опосредовало истощение и  $T_{reg}$ -клеток, и общепринятых  $CD4^+$  T-клеток (фигуры 17A и 17B).

На фигурах 18A-18I показано, что hIgG1-nfAb против hCCR8 опосредуют истощение  $CCR8^+$   $T_{reg}$  в системе культуры срезов опухолей пациентов *ex vivo* без добавления аллогенных NK-клеток. A-C: Типичные результаты для истощения  $T_{reg}$ -клеток (A),  $CD4^+$   $T_{conv}$  (B) и  $CD8^+$  T-клеток (C) периферической крови после обработки 14S15-IgG1-nf или IgG1-nf против hCCR4 *in vitro*. D-F: Типичные графики для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC) и анализа уничтожения аллогенными NK-клетками, в которых сравнивают 14S15-IgG1-nf (D), IgG1-nf против hCCR4 (E) и изотипическое Ab (F). A-F: 14S15-IgG1-nf, закрашенные круги; IgG1-nf против hCCR4, квадраты; изотипическое IgG1-nf, незакрашенные круги. G: С помощью совместной культуры аллогенных NK-клеток и опухоли NSCLC сравнивали 16B13-IgG1-nf с инертным Ab против hCCR8 и Ab изотипического контроля. G: IgG1-nf изотипа, незакрашенные круги; 14S15-IgG1-nf, закрашенные круги; 14S15-IgG1-инертное, треугольники. H и I: Результаты для первичных интактных срезов опухоли *ex vivo* из почечноклеточной карциномы (H) и рака желудка (I), культивированных в течение 24 ч. в присутствии 16B13-IgG1-nf или IgG1-nf изотипического контроля (3-5 технических параллелей для каждого условия). H и I: изотипическое IgG1-nf, незакрашенные круги; 14S15-IgG1-nf, закрашенные круги. \* $P < 0,05$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Общепринятый односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Тьюки (G). критерий Манна-Уитни (двухсторонний) (G-I).

На фигуре 19 показано, что Ab против CCR8 с перекрестной сшивкой или без нее не индуцируют интернализацию CCR8 на активированных  $T_{reg}$ -клетках. Активированные  $T_{reg}$ -клетки инкубировали с mAb против CCR8 4A19, Ab положительного контроля (против ICOS) и Ab изотипического контроля с перекрестно сшивающим Ab против Fc человека или без него. Экспрессию CCR8 на поверхности  $T_{reg}$  оценивали в разные моменты времени.

На фигурах 20A-20D показано истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток антителом против CCR8, когда расщепленные опухоли пациентов сокультивируют с аллогенными естественными киллерами (NK) *in vitro*. A: mAb 4A19 (CCR8-nf) индуцировало измеримое

истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток пациента, большее, чем истощение, вызванное нефукозилированным mAb против hCCR4 (CCR4-nf). В: И наоборот, nfAb против CCR4, но не mAb 4A19, индуцировало истощение  $CD4^+ T_{eff}$ -клеток. С: Ни антитело против CCR8, ни антитело против CCR4 не истощало  $CD8^+ T_{eff}$ . D: В отличие от 4A19 (CCR8-nf), ни контрольное mAb против гемоцианина морского блюдца (KLH)-nf с неродственным нацеливающим плечом (изотипическое), ни mAb 4A19 с инертным остовом (CCR8-инертное) не истощало  $T_{reg}$ -клетки.

На фигурах 21A-21D показано, что антитело против CCR8 ингибирует рост рака толстого кишечника CT26 в модели на мышах. A: Обработка рака толстого кишечника CT26 mIgG2a против CCR8, Ab против mCCR8, имеющим изотип mIgG2a, полученным из mAb крысы против mCCR8 BioLegend, клона SA214G2, значимо снижала рост опухоли и повышала количество мышей без опухолей. Показаны объемы отдельных опухолей. В: Изменения средних объемов опухолей. С: Наблюдали истощение опухолевых  $T_{reg}$  при введении антитела против CCR8, в то время как введение антитела против CCR8 не влияло на количество  $T_{reg}$ -клеток селезенки (D).

На фигурах 22A-22F показаны эффекты антитела против CCR8 в отношении популяций Т-лимфоцитов у мышей, имеющих аденокарциному толстого кишечника CT26, что анализировали посредством проточной цитометрии. A: Процентная доля CCR8-экспрессирующих  $CD4^+FOXP3^+$   $T_{reg}$ -клеток ( $T_{reg}$ ),  $FOXP3^+CD4^+$  эффекторных клеток( $CD4_{eff}$ ) и  $CD8^+$  Т-клеток ( $CD8T$ ) в селезенке, крови, опухолевых  $T_{reg}$ -клетках и коже. В: Процентная доля CCR8-экспрессирующих дважды отрицательных  $CD4^+CD8^-$  (DN), одиночно положительных  $CD4^+CD8^-$  (CD4 SP), одиночно положительных  $CD4^-CD8^+$  (CD8 SP) и дважды положительных  $CD4^+CD8^+$  (DP) тимоцитов. С: Процентная доля  $Foxp3^+$   $T_{reg}$ -клеток в селезенке, крови, опухоли и коже после введения mIgG2a mAb против CCR8 и антитела изотипического контроля. D: Процентная доля тимоцитов DP, CD8 SP, CD4 SP и DN в тимусе после введения mIgG2a против CCR8 и антитела изотипического контроля. E: Процентная доля  $CD4^+$  Т-клеток в коже после введения mIgG2a против CCR8 и антитела изотипического контроля. F: Процентная доля  $CD8^+$  Т-клеток в коже после введения mIgG2a против CCR8 и антитела изотипического контроля.

На фигурах 23A и 23B показано, что антитело против CCR8 ингибирует рост рака толстого кишечника MC38 в модели на мышах. A: Обработка рака толстого кишечника MC38 mIgG2a против CCR8 значимо снижала рост опухоли и повышала количество мышей без опухолей. В: Изменения средних объемов опухолей.

На фигурах 24A-24D показано, что индуцируемое Ab против mCCR8 истощение  $T_{reg}$  приводило к мощной эффективности отдельного средства и повышало фармакодинамические и фармакокинетические ответы в модели рака толстого кишечника MC38 на мышах. A: Однократная доза mAb против mCCR8 приводит к дозозависимому снижению объема опухоли, истощению  $T_{reg}$  (%  $Foxp3^+CD4^+$ ) (B) и повышению процентной доли инфильтрирующих опухоль  $CD8^+$  Т-клеток (C). Планками погрешностей



указано стандартное отклонение среднего значения. D: mAb против mCCR8 демонстрирует нелинейную PK в диапазоне доз от 0,03 до 3 мг/кг.

На фигурах 25A-25C показаны эффекты в отношении роста опухоли комбинации Ab мыши против mPD-1 и Ab мыши против mCCR8 по сравнению с терапией Ab против PD-1 или Ab против CCR8 в отдельности, что измеряли по изменениям в объемах опухолей в модели рака мочевого пузыря мыши MB49. A: mIgG2a против CCR8 и антитело против PD-1 индуцируют умеренные и низкие уровни, соответственно, ингибирования роста опухоли, но в комбинации демонстрируют синергическую эффективность в полном ингибировании роста опухоли. B: Введение mIgG2a против CCR8 в присутствии или отсутствии антитела против PD-1 значительно снижало доли опухолевых T<sub>reg</sub>, но повышало доли противоопухолевых CD8<sup>+</sup> T-клеток (C).

На фигуре 26 показаны эффекты в отношении роста опухоли комбинации Ab мыши против mPD-1 и Ab мыши против mCCR8 по сравнению с терапией антителом против PD-1 или Ab против CCR8 в отдельности, что измеряли по изменениям объемов опухолей в модели рака молочной железы мыши 4T1. Антитело против PD-1 не демонстрирует активность при ингибировании роста опухоли, при этом рост опухоли точно отражают, что у мышей, которым вводили комбинацию Ab отрицательного контроля, в то время как mIgG2a против CCR8 индуцирует умеренный уровень ингибирования роста опухоли. Антитело против CCR8 синергически взаимодействует с антителом против PD-1, почти полностью ингибируя рост опухоли.

На фигурах 27A и 27B показано, что Ab против mCCR8, содержащее инертную константную область Fc, демонстрирует противоопухолевую активность в модели фибросаркомы SA1N на мышах. A: Введение mIgG2a против CCR8 мощно снижало рост опухоли, при этом все 9 мышей не имели опухолей ко дню 25 после имплантации. Блокада CCR8 Fc-инертным Ab (mIgG1 против CCR8 D265A) частично снижала рост опухоли. B: Истощения опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток посредством введения антитела против CCR8 достигали с помощью введения mIgG2a против CCR8, но не Fc-инертного mIgG1 против CCR8 D265A.

На фигурах 28A-28F показано, что вовлечение Fc-рецептора необходимо для активности Ab против mCCR8 в модели опухоли MC38. Кривые среднего (A) и отдельного роста опухолей MC38, имплантированным мышам C57BL/6, которым вводили mIgG2a против CCR8 (n=10) (B), mIgG1 против CCR8 D265A (n=10) (C) или IgG2a изотипического контроля (n=10) (D) в дни 7, 10 и 14 после имплантации опухоли в количестве 200 мкг/мышь/введение. E: Опухоли MC38 собирали в день 15 после имплантации и оценивали истощение T<sub>reg</sub> посредством проточной цитометрии (n=5 на группу) \*\*P<0,01. Односторонний ANOVA с критерием Краскела-Уоллиса и критерием Данна. F: Доли Ccr8<sup>+/+</sup> и Ccr8<sup>-/-</sup> полученных от донора T<sub>reg</sub>-клеток в опухолях MC38 и периферических тканях через 13 дней post-MC38 имплантация опухоли. \*\*P<0,01. Двухсторонний ANOVA с последующим использованием поправки Бонферрони на множественность сравнений.

На фигурах 29А-29І показано, что mIgG2a против CCR8 индуцирует продуктивные анамнестические ответы в гетерологичной модели повторной стимуляции. Мышам, которым имплантировали опухоли CT26, рандомизировали после достижения опухолями 100-120 мм<sup>3</sup>. А-С: Кривые роста и истощение T<sub>reg</sub> в опухолях CT26, обработанных (А) mIgG2a против CCR8 (n=8), (В) mIgG2a против CTLA4 (n=8) или (С) mIgG2a изотипического контроля (n=8) через 1, 4 и 8 дней после рандомизации в количестве 0,2 мг/мышь/введение. Шесть опухолей из каждой группы анализировали посредством проточной цитометрии для оценки истощения T<sub>reg</sub> (D) и доли АН1-тетрамер<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Е) в день 9 после рандомизации. F: Доля АН1-тетрамер<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток в крови через 92 дней после введения. G: Доля АН1-тетрамер<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти (TEM) в крови через 5 дней после провокационной пробы с помощью LM-АН1А5. H и I: Окрашивание на внутриклеточные цитокины на (H) ИФНγ<sup>+</sup> и (I) полифункциональные ИФНγ<sup>+</sup>ФНОα<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки в селезенки после стимуляции пептидом АН1А5 в течение 5 ч. ns, не значимо; \*P<0,05, \*\*P<0,01. Односторонний ANOVA с критерием Краскела-Уоллиса и критерием Данна (D-I).

На фигурах 30А и 30В показана переменная экспрессия CCR8 во многих злокачественных новообразованиях человека. Иммуногистохимию (ИНС) осуществляли на 17 типах/подтипах злокачественных новообразований из двух наборов образцов (полноразмерные тканевые срезы и наборы МТВ). А: Полноразмерные тканевые срезы подвергали анализу визуализации всего препарата CCR8<sup>+</sup> клеток на фиксированных формалином, погруженных в парафин (FFPE) препаратах 6 типах/подтипах злокачественных новообразований с 14-24 образцами на тип опухоли. В: Набор многоопухолевых блоков (МТВ) демонстрировал 16 типов/подтипов опухолей с 20 случаями/тип опухоли. Каждый МТВ содержал 5 случаев отдельного показания на блок FFPE и 1 образец гиперпластической миндалины в качестве положительного контроля.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к mAb, связывающимся специфически и с высокой аффинностью с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клеток, и способам лечения злокачественных новообразований у индивидуума, включающим введение индивидууму Ab против CCR8 в виде монотерапии или в комбинации с противоопухолевым средством, таким как ингибитор иммунных контрольных точек, химиотерапевтическое средство и/или лучевая терапия. Эффекты CCR8-опосредованного истощения T<sub>reg</sub> в отдельности и в комбинации с блокадой PD-1 при мощном ингибировании роста опухоли показаны в настоящем описании на многочисленных, разнообразных доклинических моделях опухолей на мышах.

### **Термины**

Для лучшего понимания настоящего изобретения сначала определены некоторые термины. В рамках изобретения, если в настоящем описании не указано иначе, каждый из следующих терминов должен обладать значением, приведенным ниже. Дополнительные определения приведены на всем протяжении настоящей заявки.

Термины "введение" или "вводить" относятся к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, индивидууму с использованием любых из различных способов и систем доставки, известных специалистам в этой области. Предпочтительным путем введения терапевтических Ab, таких как Ab против CCR8 и против PD-1, является внутривенное (IV) введение. Другие пути введения включают подкожный (SC), интраперитонеальный (IP), внутримышечный (IM), спинальный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. В рамках изобретения фраза "парентеральное введение" означает иные способы введения, чем энтеральное и топическое введение, как правило, посредством инъекции, и включает, в качестве неограничивающих примеров, внутривенную, интраперитонеальную, внутримышечную, внутриаартериальную, интратекальную, внутрелимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, Ab по изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как топический, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или топически. Введение также можно осуществлять, например, однократно, множество раз и/или за один или более длительных периодов времени.

Термин "антитело" (Ab) должен включать, в качестве неограничивающих примеров, гликопротеин иммуноглобулин (Ig) специфически связывающийся с антигеном и содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями, или его антигенсвязывающую часть. Каждая H-цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи IgG Ab содержит три константных домена,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как  $V_L$ ) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи IgG Ab содержит один константный домен,  $C_L$ . Области  $V_H$  и  $V_L$  можно дополнительно разделять на области гипервариабельности, названные определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, являющимися более консервативными, названными каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  содержит три CDR и четыре FR, расположенные от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Используют различные способы определения границ доменов CDR в Ab, включая определения Kabat, Chothia, AbM, системы Contact и IMGT. Константные области Ab могут опосредовать связывание Ig с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки

иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В рамках изобретения и в соответствии с общепринятым использованием, Ab, описанное как содержащее тяжелую цепь и/или легкую цепь, относится к Ab, содержащему "по меньшей мере одну" из перечисленных тяжелых и/или легких цепей и которое, таким образом, будет включать Ab, имеющие две или более тяжелые и/или легкие цепи. В частности, описанные таким образом Ab будут включать общепринятые Ab, имеющие две, по существу, идентичные тяжелые цепи и две, по существу, идентичные легкие цепи. Цепи Ab могут являться, по существу, идентичными, но не полностью идентичными, если они отличаются из-за посттрансляционных модификаций, включая, например, С-концевое расщепление остатков лизин, и альтернативных профилей гликозилирования.

Ig можно получать из любого из общеизвестных изотипов, включая, в качестве неограничивающих примеров IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в этой области и включают, в качестве неограничивающих примеров, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. Термин "изотип" относится к классу или подклассу Ab (например, IgM, IgG1 или IgG4), кодируемому генами константной области тяжелой цепи. Термин "антитело" включает, в качестве примера, природные и неприродные Ab, моноклональные и поликлональные Ab, химерные и гуманизированные Ab, человеческие или не принадлежащие человеку Ab, полностью синтетические Ab и одноцепочечные Ab. Не принадлежащее человеку Ab можно гуманизировать частично или полностью рекомбинантными способами для снижения его иммуногенности для человека. Если не указано конкретно, и если контекст не указывает на иное, термин "антитело" также включает антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающую часть любого из указанных выше Ig и включает моновалентный и двухвалентный фрагмент или часть и одноцепочечное Ab.

Термин "выделенное" Ab относится к Ab, по существу, не содержащему другие Ab, имеющие другие антигенные специфичности (например, выделенное Ab, специфически связывающееся с CCR8, по существу, не содержит Ab, специфически связывающиеся с иными антигенами, чем CCR8, такими как Ab, связывающиеся с CCR4). Однако, выделенное Ab, специфически связывающееся с CCR8 человека (hCCR8), может иметь перекрестную реактивность в отношении других антигенов, таких как полипептиды CCR8 других биологических видов, таких как мышь и яванский макак. Кроме того, в некоторых контекстах термин "выделенное" Ab также может означать Ab, очищенное таким образом, чтобы, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества. Для сравнения, термин "выделенная" нуклеиновая кислота относится к химическому веществу нуклеиновой кислоте, значительно отличающемуся, т.е. имеющему иную химическую идентичность, природу и пригодность, чем нуклеиновые кислоты в том виде, в котором они существуют в природе. Например, выделенная ДНК, в отличие от нативной ДНК, является отдельной частью нативной ДНК, а не неотъемлемой

частью более крупного структурного комплекса, хромосомы, обнаруживаемой в природе. Кроме того, выделенную ДНК, в отличие от нативной ДНК, можно использовать в качестве праймера для ПЦР или зонда для гибридизации, в частности, для измерения экспрессии генов и детекции биомаркерных генов или мутаций для диагностики заболевания или прогнозирования эффективности терапевтического средства. Кроме того, в некоторых контекстах термин "выделенная" нуклеиновая кислота может означать нуклеиновую кислоту, очищенную таким образом, чтобы, по существу, не содержать другие клеточные компоненты или другие загрязнения, например, другие клеточные нуклеиновые кислоты или белки, с использованием стандартных способов, хорошо известных в этой области.

Термин "моноклональное" Ab (mAb) относится к неприродному препарату молекул Ab единого молекулярного состава, т.е. молекулам Ab, первичные последовательности которых являются, по существу, идентичными и демонстрирующим одну специфичность связывания и аффинность для конкретного эпитопа. mAb является примером выделенного Ab. mAb можно получать с помощью гибридомы, рекомбинантных, трансгенных или других способов, известных специалистам в этой области.

Термин "химерное" Ab относится к Ab, в котором переменные области получают из одного биологического вида и константные области получают из другого биологического вида, таким как Ab, в которых переменные области получают из Ab мыши и константные области получают из Ab человека.

Термин mAb "человека" (HuMAb) относится к mAb, имеющему переменные области, в которых и каркасные области, и области CDR получают из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Кроме того, если Ab содержит константную область, ее также получают из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Ab человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, встроенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*). Однако, в рамках изобретения термин Ab "человека" не предназначен для включения Ab, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, пересажены на каркасные последовательности человека. Термины Ab "человека" и "полностью человеческие" Ab используют в качестве синонимов.

Термин "гуманизированное" mAb относится к mAb, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR не принадлежащего человеку mAb заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В одном из вариантов осуществления гуманизированной формы Ab некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, в то время как некоторые, большинство или все аминокислоты в одной или более областях CDR являются неизмененными. Небольшие

добавления, делеции, инсерции, замены или модификации аминокислот допустимы при условии, что они не нарушают способность Ab связываться с конкретным антигеном. "Гуманизированное" Ab сохраняет антигенную специфичность, схожую с исходным Ab.

Термин Ab "против антиген" относится к Ab, специфически связывающемуся с антиген. Например, Ab против CCR8 является Ab, специфически связывающимся с CCR8, в то время как Ab против PD-1 является Ab, специфически связывающимся с PD-1. В рамках изобретения Ab "против PD-1/против PD-L1" является Ab, используемым для нарушения пути передачи сигнала PD-1/PD-L1, которое может являться Ab против PD-1 или Ab против PD-L1.

термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" Ab относится к одному или более фрагментам Ab, например, mAb, сохраняющим способность специфически связываться с антигеном, связываемым целым Ab.

Термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность" ("ADCC") относится к клеточно-опосредованной цитотоксической активности *in vitro* или *in vivo*, при которой неспецифические эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) на поверхности эффекторных клеток (например, естественных киллеров (NK), макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов), распознают Fc-область Ab, связанных с поверхностными антигенами на клетке-мишени, и активно лизируют клетку-мишень. В принципе, любая эффекторная клетка с активирующим FcR может активироваться для опосредования ADCC. терапевтические Ab по настоящему изобретению для использования на людях, предпочтительно, являются Ab против hCCR8, специфическим модифицированными для опосредования повышенной активности ADCC против клеток, экспрессирующих CCR8. Активность ADCC Ab можно измерять, как описано, например, в любом из примеров 17-20.

Термины "повышенная ADCC" или "повышенная активность ADCC" модифицированного Ab по настоящему изобретению относятся к уровням активности ADCC выше ADCC, индуцированной немодифицированным Ab. Модифицированное Ab IgG1 против CCR8 по настоящему изобретению, демонстрирующее повышенную ADCC, например, является модифицированной формой Ab, индуцирующей более высокую ADCC, чем Ab с его нативным константным доменом IgG1. Нефукозилированное (nf) mAb является примером модифицированного Ab, индуцирующего повышенную ADCC посредством улучшенного связывания IgG с активирующим FcγRIIIA. В некоторых вариантах осуществления уровень повышения активности ADCC является по меньшей мере 2-кратным, предпочтительно - по меньшей мере 10-кратным, более предпочтительно - по меньшей мере 100-кратным снижением EC<sub>50</sub>, например, измеряемой по снижению EC<sub>50</sub> лизиса клеток в анализе лизиса NK-клетками, например, анализе лизиса NK-клетками, описанном в примере 17.

Термин "злокачественное новообразование" относится к широкой группе различных заболеваний, отличающихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Положительно регулируемое деление клеток и рост приводят к образованию

злокачественных опухолей, инвазирующих соседние ткани, и которые также могут метастазировать в отдаленные части организма через лимфатическую систему или кровоток.

"Рецептор хемокинов с С-С-мотивом 8" ("CCR8"; также известный в этой области, например, как CY6, TER1, CCR-8, CKRL1, CDw198, CMKBR8, GPRCY6, CMKBRL2 или CC-CKR-8) является GPCR с семью трансмембранными доменами; показано, что этот GPCR экспрессируется, главным образом, на внутриопухолевых FOXP3<sup>hi</sup> T<sub>reg</sub>-клетках. В рамках изобретения термин "CCR8" включает CCR8 человека (hCCR8), варианты, изоформы, видовые гомологи hCCR8, такие как CCR8 мыши (mCCR8), и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hCCR8. Полные аминокислотные последовательности hCCR8 и mCCR8 можно найти в GENBANK® под регистрационными номерами AAI07160.1 и NP\_031746.1, соответственно.

Термин "рецептор поверхности клетки" относится к молекулам или комплексам молекул, экспрессирующимся на поверхности клетки, способным получать сигнал и передавать сигнал через плазматическую мембрану клетки.

Термин "эффекторная функция" относится к взаимодействию Fc-области Ab с FcR или лигандом или биохимическому событию, являющемуся его результатом. Примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q, обусловленную комплементом цитотоксичность (CDC), связывание FcR, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), и отрицательную регуляцию рецептора поверхности клетки (например, В-клеточного рецептора; BCR). Для таких эффекторных функций, как правило, необходимо комбинирование Fc-области со связывающим доменом (например, варибельным доменом Ab).

"Fc рецептор" или "FcR" является рецептором, связывающимся с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, связывающиеся с IgG Ab, содержат рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих рецепторов (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) и одного ингибиторного рецептора (FcγRIIB). Различные свойства FcγR человек обобщены в таблице 1. Основная часть типов врожденных эффекторных клеток коэкспрессирует один или более активирующих FcγR и ингибиторный FcγRIIB, в то время как NK-клетки селективно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIA у людей), но не ингибиторный FcγRIIB у мышей и людей.

Таблица 1. Свойства FcγR человека

| Fcγ   | Аллельные варианты | Аффинность к IgG человека | Преференциальный изотип | Клеточное распределение |
|-------|--------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| FcγRI | He                 | Высокая (K <sub>D</sub> ) | IgG1=3>4>>2             | Моноциты, макрофаги,    |

|         |         |                         |             |                                                                |
|---------|---------|-------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------|
|         | описаны | ~10 нМ)                 |             | активированные<br>нейтрофилы, дендритные<br>клетки?            |
| FcγRIIA | H131    | От низкой до<br>средней | IgG1>3>2>4  | Нейтрофилы, моноциты,<br>макрофаги, эозинофилы,                |
|         | R131    | Низкая                  | IgG1>3>4>2  | дендритные клетки,<br>тромбоциты                               |
| FcγRIIA | V158    | Средняя                 | IgG1=3>>4>2 | NK-клетки, моноциты,                                           |
|         | F158    | Низкая                  | IgG1=3>>4>2 | макрофаги, тучные клетки,<br>эозинофилы, дендритные<br>клетки? |
| FcγRIIB | I232    | Низкая                  | IgG1=3=4>2  | В-клетки, моноциты,                                            |
|         | T232    | Низкая                  | IgG1=3=4>2  | макрофаги, дендритные<br>клетки, тучные клетки                 |

Термин "Fc-область" (область кристаллизуемого фрагмента), "Fc-домен" или "Fc" относится к С-концевой области тяжелой цепи Ab, опосредующей связывание Ig с тканями или факторами организма-хозяина, включая связывание с FcR, находящимися на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках), или первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область представляет собой полипептид, содержащий константную область Ab, за исключением первого домена константной области Ig. В Ab изотипов IgG, IgA и IgD Fc-область состоит из двух идентичных белковых фрагментов, полученных из второго (C<sub>H2</sub>) и третьего (C<sub>H3</sub>) константных доменов двух тяжелых цепей Ab; Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены C<sub>H</sub> 2-4) в каждой полипептидной цепи. В случае IgG Fc-область содержит домены Ig Cγ2 и Cγ3 и шарнирный домен между Cγ1 и Cγ2. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяют как пролегающую от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 до С-конца тяжелой цепи, где нумерация соответствует индексу EU по Kabat. Домен C<sub>H2</sub> Fc-области IgG человека пролегает от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, в то время как домен C<sub>H3</sub> расположен на С-концевой стороне домена C<sub>H2</sub> в Fc-области, т.е. он пролегает от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 IgG. В рамках изобретения Fc-область может являться нативной последовательностью Fc или вариантом Fc.

В рамках изобретения термины "фукозилирование" и "отсутствие фукозилирования" относятся к наличию и отсутствию, соответственно, корового остатка фукозы на N-связанном гликане в положении N297 Ab. Если не указано иначе или не



очевидно из контекста, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области Ab соответствует общепринятой нумерации EU (индексу EU по Kabat et al., 1991).

Термин "иммунный ответ" относится к биологическому ответу позвоночных против чужеродных факторов, где ответ защищает организм от этих факторов и вызываемых ими заболеваниями. Иммунный ответ опосредован действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, НК-клетки, макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, продуцируемых любыми из этих клеток или печенью (включая Ab, цитокины и комплемент), что приводит к селективному таргетингу, связыванию, повреждению, деструкции и/или элиминации из организма позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенов, злокачественных или других аномальных клеток, или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

Термин "иммунотерапия" относится к лечению индивидуума, страдающего или имеющего риск заражения или возникновения рецидивирования заболевания, способом, включающим индуцирование, усиление, супрессию или иную модификацию иммунного ответа.

Термин "монотерапия" относится к одному типу лечения, такому как, например, введение пациенту одного лекарственного средства или использование лучевой терапии или хирургического вмешательства в отдельности, для лечения заболевания или состояния. Введение лекарственного средства самого по себе не представляет собой монотерапию, если в одном курсе лечения ему предшествует или после него следует другой тип лечения заболевания или состояния, такой как введение дополнительного лекарственного средства.

В отличие от этого, термин "комбинированное лечение" относится к варианту лечения, в котором комбинируют по меньшей мере два типа терапии, таких как, например, введение пациенту двух или более лекарственных средств или введение лекарственного средства с проведением лучевой терапии или хирургическим вмешательством, для лечения заболевания или состояния. Эти два или более способа лечения можно не использовать одновременно в отношении пациента, но являются частью одного курса лечения. В некоторых вариантах осуществления разные способы терапии используют одновременно. В других вариантах осуществления использование одной терапии перекрывается с использованием по меньшей мере одной другой терапии. В дополнительных вариантах осуществления разные способы терапии используют последовательно.

Термин "потенцирующий иммунный ответ" означает повышение эффективности или мощности иммунного ответа, который может являться существующим или индуцированным иммунным ответом, у индивидуума. Этого повышения эффективности и мощности можно достигать, например, посредством снижения или преодоления механизмов, супрессирующих иммунный ответ организма-хозяина, стимуляции

механизмов, повышающих эндогенный иммунный ответ организма-хозяина, или усиления иммунного ответа, вызванного иммунотерапевтическим средством.

Термин "белок программируемой гибели клетки-1" (PD-1) относится к иммуноингибиторному рецептору, принадлежащему к семейству CD28, экспрессирующемуся преимущественно на ранее активированных Т-клетках *in vivo* и связывающемуся с двумя лигандами, PD-L1 и PD-L2. В рамках изобретения термин "PD-1" включает PD-1 человека (hPD-1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-1 и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-1. Полную аминокислотную последовательность hPD-1 можно найти в GENBANK® под регистрационным номером U64863.

"Лиганд белка программируемой гибели клетки-1" (PD-L1) представляет собой один из двух гликопротеиновых лигандов поверхности клетки для PD-1 (другим является PD-L2), отрицательно регулирующий активацию Т-клеток и секрецию цитокинов после связывания с PD-1. В рамках изобретения термин "PD-L1" включает PD-L1 человека (hPD-L1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L1 и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L1. Полную последовательность hPD-L1 можно найти в GENBANK® под регистрационным номером Q9NZQ7.

Термин "индивидуум" включает любого человека или неявляющегося человеком животного. Термин "неявляющееся человеком животное" включает, в качестве неограничивающих примеров, позвоночных, таких как неявляющиеся человеком приматы, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В предпочтительных вариантах осуществления индивидуум является человеком. Термины "индивидуум" и "пациент" используют в настоящем описании взаимозаменяемо.

"Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства или терапевтического средства является любым количеством лекарственного средства или средства, которое при использовании в отдельности или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает индивидуума от дебюта заболевания или способствует регрессированию заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, повышение частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания, профилактика или снижение нарушения или недееспособности по причине заболевания или иное улучшение симптомов заболевания у индивидуума. Кроме того, термины "эффективный" и "эффективность" в отношении лечения включают фармакологическую эффективность и физиологическую безопасность. Термин "фармакологическая эффективность" относится к способности лекарственного средства способствовать регрессированию заболевания, например, регрессированию злокачественного новообразования, у пациента. Термин "физиологическая безопасность" относится к приемлемому уровню токсичности или других физиологических нежелательных явлений на клеточном, органном и/или организменном уровне (нежелательных явлений), являющихся результатом введения лекарственного средства. Эффективность терапевтического средства можно оценивать различными способами,

известными специалисту в этой области, например, на людях во время клинических испытаний, в модельных системах на животных, являющихся прогностическими в отношении эффективности у людей, или посредством оценки активности средства в анализах *in vitro*.

В качестве примера лечения опухолей, терапевтически эффективное количество противоопухолевого средства предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на приблизительно 20%, предпочтительно - по меньшей мере на приблизительно 40%, более предпочтительно - по меньшей мере на приблизительно 60%, даже более предпочтительно - по меньшей мере на приблизительно 80%, и еще более предпочтительно - на приблизительно 100% относительно неподвергнутых лечению индивидуумов. Способность средства или лечения ингибировать рост опухоли можно оценивать в модельной системе на животных, такой как любая из моделей опухолей аденокарциномы толстого кишечника CT26, аденокарциномы толстого кишечника MC38, фибросаркомы SA1N, карциномы молочной железы 4T1 и карциномы мочевого пузыря MB49 на мышах, являющихся прогностическими в отношении эффективности для опухолей человека. Альтернативно, ингибирование роста опухоли можно измерять посредством оценки способности средства или лечения ингибировать рост клеток *in vitro* с использованием анализов, известных специалисту в этой области. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения регрессирование опухоли можно наблюдать, и оно может продолжаться у человека в течение по меньшей мере приблизительно 30 дней, более предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 60 дней, или даже более предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 6 месяцев.

Терапевтически эффективное количество лекарственного средства включает "профилактически эффективное количество", которое является любым количеством лекарственного средства, которое при введении в отдельности или в комбинации с другим терапевтическим средством индивидууму, имеющему риск развития заболевания (например, индивидууму, имеющему предзлокачественное состояние, имеющему риск развития злокачественного новообразования) или рецидивирования заболевания, ингибирует развитие или рецидивирование заболевания (например, злокачественного новообразования). В предпочтительных вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает развитие или рецидивирование заболевания. Термин "ингибирование" развития или рецидивирования заболевания означает уменьшение вероятности развития или рецидивирования заболевания или профилактику развития или рецидивирования заболевания полностью.

Термины "лечение" или "терапия" индивидуума относятся к любому типу вмешательства или способа, включая введение активного средства, осуществляемого в отношении индивидуума с целью реверсирования, облегчения, улучшения, ингибирования, замедления или профилактики дебюта, прогрессирования, развития, тяжести или рецидивирования симптома, осложнения или состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием.

В рамках изобретения термины в единственном числе следует понимать как относящиеся к "одному или более" из любых перечисленных компонентов.

Термин "приблизительно" при использовании в отношении числового значения относится к значению, являющемуся достаточно близким к указанному значению и находящемуся в приемлемом диапазоне ошибок, что определяет специалист в этой области, которое будет частично зависеть от того, как значение измеряют или определяют, т.е. ограничений системы измерения. Например, термин "приблизительно" может означать диапазон  $\pm 50\%$  от указанного референсного значения, предпочтительно - диапазон  $\pm 25\%$ , или более предпочтительно - диапазон  $\pm 10\%$ . Когда в настоящей заявке приведены конкретные значения, значение термина "приблизительно", если не указано иначе, следует понимать как находящееся в приемлемом диапазоне ошибок для этого конкретного значения в соответствии с практикой в этой области.

Термин "по существу, тот же" относится к достаточно высокой степени сходства между двумя или более числовыми значениями, композициями или характеристиками, что специалист в этой области будет рассматривать различия между этими значениями, композициями или характеристиками как имеющие небольшую или не имеющие биологическую и/или статистическую значимость в контексте измеряемого свойства. Различия между измеряемыми числовыми значениями могут составлять, например, менее приблизительно 50%, предпочтительно - менее приблизительно 25%, и более предпочтительно - менее приблизительно 10%.

Как представлено в настоящем описании, любой диапазон концентраций, диапазон процентных долей, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, если это целесообразно, его доли (такие как одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иначе.

Различные аспекты изобретения дополнительно подробно описаны в следующих подразделах.

#### *Специфическая экспрессия CCR8 в сильно иммуносупрессорных инфильтрирующих опухоли $T_{reg}$ -клетках*

Различные эксперименты, приведенные в настоящем описании, свидетельствуют о том, что CCR8 экспрессируется специфически  $T_{reg}$ -клетками в опухолях человека, и в отличие от CCR4, мишени для истощения  $T_{reg}$ , в настоящее время проходящей клинические испытания, CCR8 селективно экспрессируется на супрессорных опухолевых  $T_{reg}$ -клетках и минимально на провоспалительных  $T_{eff}$ . Анализ ген-генная корреляции CCR8 и FOXP3 человека по Атласу ракового генома (TCGA; National Cancer Institute, 2021) (пример 1) показал, что экспрессия CCR8 имеет наиболее высокую корреляцию с FOXP3 (главным транскрипционным регулятором  $T_{reg}$ -клеток) в большинстве типов злокачественных новообразований (фигура 1A). CCR8 экспрессируется на опухолевых FOXP3<sup>hi</sup>  $T_{reg}$ -клетках, но экспрессию редко наблюдают на  $T_{reg}$ -клетках и  $T_{eff}$  в периферической крови. CCR8 также селективно экспрессируется на FOXP3<sup>hi</sup> лимфоцитах

в образцах опухоли НСС, но не FOXP3<sup>mid</sup> и FOXP3<sup>neg</sup> CD8 и CD4 T<sub>eff</sub> в опухолях пациентов (фигура 1B). Экспрессия CCR8 ассоциирована с более высокими уровнями экспрессии FOXP3 и каноническими маркерами T<sub>reg</sub>-клеток (IL2RA, IKZF2, BATF), в то время как более низкая экспрессия CCR8 ассоциирована с маркерами цитотоксических Т-клеток (GZMA, CD8A; фигура 1C).

При сравнении профилей экспрессии на различных T<sub>reg</sub>-ассоциированных молекулах (пример 3) было показано, что CCR8 больше экспрессировался на опухолеассоциированных FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетках, чем T<sub>reg</sub> из крови совпадающей пациента, в то время как наблюдали небольшие различия в экспрессии CCR4, CTLA-4 и CD25 на T<sub>reg</sub>-клетках из опухоли и крови (фигура 2A). Высокое относительное количество CCR8 на клетку на опухолевых FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетках по сравнению с T<sub>reg</sub>-клетками периферической крови (фигура 2B), сопряженное с низкой частотой экспрессии CCR8 на CD4<sup>+</sup> T<sub>conv</sub> (фигура 2C и D) и CD8<sup>+</sup> Т-клетках (фигура 2E и F) в опухоли и периферической крови позволяет предполагать, что CCR8 представляет собой высоко селективный терапевтический маркер для таргетинга опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток с низким риском повреждения популяций противоопухолевых T<sub>eff</sub>-клеток.

Проточно-цитометрический анализ уровня экспрессии CCR8 в различных субпопуляциях Т-лимфоцитов, ассоциированных с опухолями человека (пример 4), показал, что CCR8 экспрессируется значительной частью резидентных T<sub>reg</sub>-клеток опухоли (медиана 82%), что определяли по FOXP3 (фигура 3A). В отличие от этого, гораздо более низкая доля инфильтрирующих опухоль CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток экспрессирует CCR8 (медианы 12,65% и 4,55%, соответственно; фигура 3B). В то время как небольшая доля CD4 T<sub>conv</sub>-клеток экспрессирует CCR8, уровень экспрессии CCR8 в пересчете на клетку является значимо более высоким на T<sub>reg</sub>-клетках, чем на CD4 T<sub>conv</sub>-клетках (медиана MFI 2106 против 132, P<0,0001), в то время как CD8<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют пренебрежимо малые уровни CCR8 (фигура 3B). Показано, что T<sub>reg</sub>-клетки в периферической крови также экспрессируют CCR8, но на значимо более низком уровне, чем на инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клетках (фигура 3C).

Дифференциальную экспрессию CCR8 на разных субпопуляциях T<sub>reg</sub> человека также анализировали посредством проточной цитометрии (пример 5). Обнаружено, что в РВМС здоровых индивидуумов CCR8 преимущественно экспрессируется на T<sub>reg</sub>-клетках периферической крови, но только на небольшой части (медиана 21%) этих периферических T<sub>reg</sub>-клетках (фигура 4A) по сравнению с экспрессией на инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клетках с медианой приблизительно 82% (ср. фигуру 3A). Таким образом, опосредованное Ab против CCR8 истощение клеток, вероятно, не будет значимо влиять на компартмент периферических T<sub>reg</sub> из-за низкой доли CCR8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клеток в популяции периферических T<sub>reg</sub>. Это означает более низкий риск аутоиммунной токсичности, ассоциированной с истощением опухолеассоциированных T<sub>reg</sub>-клеток посредством таргетинга CCR8 по сравнению с беспорядочным истощением неопухолеассоциированных T<sub>reg</sub>-клеток. В популяции T<sub>reg</sub> CCR8 больше экспрессируется в

популяции клеток эффекторной памяти и в меньшей степени в клетках центральной памяти, при этом лишь немного CCR8 экспрессируется на наивных  $T_{reg}$ -клетках (фигура 4B) или общепринятых  $CD4^+$  Т-клетках (фигура 4C). У пациентов со злокачественными новообразованиями наблюдают более высокую экспрессию CCR8 в пересчете на клетку на инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клетках, чем на  $T_{reg}$ -клетках периферической крови, что измеряли по MFI связанного Ab против CCR8 (фигура 4D).

По сравнению с другими нацеленными на  $T_{reg}$  nf-средствами в клинических условиях (CCR4-могамулизумабом и CTLA-4-Ipi-nf), CCR8 экспрессируется специфически на наиболее активированной и иммуносупрессорной субпопуляции опухолевых  $FOXP3^{hi}$   $T_{reg}$ -клеток, ассоциированных с плохой выживаемостью (Plitas et al., 2016; Wang et al., 2019), по существу, исключая  $T_{eff}$ , экспрессирующие гранзим и другие эффекторные цитокины. Две опухоли меланомы и опухоль RCC подвергали диссоциации и окрашивали на экспрессию FOXP3 и CCR8 (пример 6). На фигуре 5 показано, что CCR8 экспрессируется на наиболее иммуносупрессорной популяции  $CD4^+$   $FOXP3^{high}$   $T_{reg}$ , представляющей собой наиболее активированные  $T_{reg}$ -клетки. В образцах меланомы, где наблюдают четкую популяцию  $FOXP3^{mid}$ , основную экспрессию CCR8 обнаруживают в  $FOXP3^{high}$  Т-клетках с уровнем экспрессии CCR8, значимо более низким в опухолевых  $FOXP3^{mid}$  и  $FOXP3^{neg}$  Т-клетках, в основном, являющихся эффекторными клетками, экспрессирующими гранзим и другие эффекторные цитокины. В образце RCC, в котором большинство  $FOXP3^+$  Т-клеток пациент демонстрировало высокие уровни FOXP3, экспрессия CCR8 перекрывалась с экспрессией FOXP3. Показано, что  $FOXP3^{high}$   $CD4^+$  Т-клетки являются истинными  $T_{reg}$ -клетками, в отличие от  $FOXP3^{mid}$   $CD4^+$  Т-клеток, которые могут являться активированными общепринятыми Т-клетками или покоящимися  $T_{reg}$ -клетками.

Исследовали экспрессию функционально значимых молекул в популяциях  $CCR8^+$  инфильтрирующих опухоль Т-клеток относительно  $CCR8^-$  инфильтрирующих опухоль Т-клеток (пример 7). Показано, что  $CCR8^+$  клетки из образцов опухолей пациентов коэкспрессируют несколько белков с потенциальными иммуносупрессорными функциями, такие как CD25, ИЛ-1R2 и CD39 (фигуры 6A-D), в то время как не наблюдали сравнимого обогащения в  $CCR4^+$  Т-клетках (фигуры 7A-D). При использовании HLA-DR в качестве маркера активации экспрессия CCR8 также коррелирует с более высоким уровнем экспрессии HLA-DR (фигура 8A) и, таким образом, позволяет идентифицировать активированные  $T_{reg}$ -клетки, в то время как экспрессия CCR4 этого сделать не позволяет (фигура 8B). Таким образом, истощение  $CCR8^+$  клеток приведет к удалению активированных иммуносупрессорных  $T_{reg}$ -клеток, экспрессирующих CD25, CD39 и ИЛ-1R2, в то время как  $T_{reg}$ -клетки, экспрессирующие эти молекулы, не будут удалены при CCR4-нацеленном истощении. Кроме того, стимуляция диссоциированных опухолевых клеток пациента ex vivo с помощью форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) и иономицина приводила к индуцированию минимальной продукции ИЛ-2, ИФН $\gamma$  и гранзима В в  $CCR8^+$  фракции  $CD4^+$  Т-клеток (фигуры 9A-C). В отличие от этого,  $CCR4^+CD4^+$  Т-клетки

являлись основными продуцентами ИФН $\gamma$  и ИЛ-2 (фигуры 10А и В), что позволяет предполагать, что нацеленное истощение CCR4<sup>+</sup>, но не CCR8<sup>+</sup> клеток, может быть вредным для противоопухолевого иммунитета.

Данные, приведенные в примерах 1-7 и обобщенные выше, свидетельствуют о том, что не все CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-клетки в опухоли экспрессируют CCR8, и CCR8<sup>+</sup> фракция, по-видимому, представляет собой более иммуносупрессорную субпопуляцию FOXP3<sup>+</sup> клеток. Таким образом, экспрессия CCR8 является признаком субпопуляции высоко супрессорных T<sub>reg</sub>, которые обогащены в опухоли и могут противодействовать противоопухолевому иммунитету. Высокая специфичность экспрессии CCR8 в отношении опухолеспецифических T<sub>reg</sub>-клеток и, в частности, наиболее активированных и иммуносупрессорных внутриопухолевых CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>high</sup> T<sub>reg</sub>-клеток, делает CCR8 оптимальной мишенью для опосредования истощения этих высоко иммуносупрессорных T<sub>reg</sub>-клеток посредством ADCC с помощью Ab против CCR8.

Таким образом, в экспериментах, представленных в настоящем описании (пример 8), получали mAb против hCCR8 и подвергали их скринингу для идентификации Ab, демонстрирующих многочисленные свойства, желательные для терапевтического Ab для лечения злокачественного новообразования (примеры 9-31). В настоящем описании показано, что суррогатное Ab мыши mIgG2a против mCCR8 мощно ингибировало рост опухоли во многих моделях опухолей на мышах, и нефукозилированные (nf) Ab против hCCR8 истощали опухолевые T<sub>reg</sub>-клетки человека в образцах опухоли пациента *ex vivo* и *in vitro*, при этом сохраняя провоспалительные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>-клетки, регулирующие противоопухолевые иммунные ответы (примеры 20 и 22). Истощение опухолеассоциированных T<sub>reg</sub>-клеток снижает их иммуносупрессорный эффект и, таким образом, повышает общий иммунный ответ для борьбы со злокачественным новообразованием. Кроме того, т.к. CCR8 редко экспрессируется на T<sub>reg</sub>-клетках и T<sub>eff</sub> в периферической крови или других тканях, таргетинг T<sub>reg</sub>-клеток несет минимальные риски токсичности. Для сравнения, обработка IgG1-nf против hCCR4 *in vitro* приводит к истощению и T<sub>reg</sub>, и CD4<sup>+</sup> T<sub>conv</sub>-клеток на периферии и в микроокружении опухоли (примеры 20 и 22). Это согласуется с доказательствами того, что могамулизумаб (против CCR4) истощает популяции T<sub>eff</sub> в периферической крови в клинических условиях (Kurose et al., 2015).

#### *Получение mAb против hCCR8*

Хемокиновые рецепторы, включая CCR8, общепринято являлись "очень трудными антигенами для разработки Ab против них" из-за их низких профилей на поверхности клеток и относительной недоступности для связывания Ab (WO2007/044756). Кроме того, Ab, полученные против пептидов, соответствующих внеклеточным доменам хемокиновых рецепторов, зачастую не могут распознавать интактный рецептор на клетке, вероятно, из-за различий во вторичной структуре. Из-за этих затруднений попытки получить Ab против хемокиновых рецепторов имели небольшой успех (WO2007/044756). CCR8 является

особенно трудным GPCR, описанным как "крайне проблемная" мишень для получения Ab против него (Harbour BioMed, 2020).

Начальные попытки получить Ab против hCCR8 посредством иммунизации мышей hCCR8-экспрессирующими клетками были безуспешными. Однако в настоящем исследовании получили mAb против hCCR8 (пример 8) после попыток иммунизации разных грызунов разными антигенами hCCR8 и различными комбинациями этих антигенов.

#### *Иммунизация грызунов*

Гуманизированные или человеческие mAb против CCR8 получали посредством иммунизации разных грызунов, включая обычных мышей C57Bl/6, разных линий трансгенных мышей, экспрессирующих репертуар Ig человека, в частности, полученных CCR8<sup>-/-</sup> нокаутной линии мышей, крыс и хомяков, иммуногенами, содержащими различные антигены hCCR8, включая клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки BAF3 мыши и клетки НЕК 293F человека, гиперэкспрессирующие hCCR8, или очищенные плазматические мембраны этих клеток. Эти иммуногены усиливали химически синтезированными пептидами N-конца hCCR8 (остатки 1-35 hCCR8), которые, что важно, содержали однократно или дважды сульфатированные остатки тирозина в положениях 15 и/или 17, конъюгированные с бычьим сывороточным альбумином (BSA) или гемоцианином морского блюдца (KLH). Затем некоторые из mAb, полученных в нетрансгенных мышцах, модифицировали в гуманизированные или химерные производные.

Белки зачастую демонстрируют посттрансляционные модификации, некоторые из которых, например, гликозилирование, очень хорошо изучены и задокументированы. Для сравнения, сульфатирование некоторых внеклеточных остатков тирозина изучено мало, и к настоящему времени есть только 32 подтвержденные молекулы, которые, как задокументировано, содержат сульфатированные тирозины (Mehta et al., 2020). Несмотря на то, что дополнительные белки с сульфатированными тирозинами еще не открыты, считают, что сульфатированные тирозины достаточно редки (Moore, 2003). Как химическое вещество, они очень отличаются от всех других аминокислот и, таким образом, представляют собой превосходную фокусную точку для получения Ab с очень высокой специфичностью и низким нецелевым связыванием. Хемокиновые рецепторы, включающие CCR8, составляют один из нескольких классов белков, которые, как задокументировано, содержат сульфатированные тирозины на своем N-конце (Ludeman and Stone, 2014). В случае нескольких из этих рецепторов обнаружено, что сульфатирование тирозина является ключевым для вовлечения лиганда, т.е. хемокина (Zhu et al., 2011). Таким образом, вероятно, Ab, захватывающее тирозинсульфаты, будет нарушать связывание между хемокином и хемокиновым рецептором и, таким образом, предотвращать активацию хемокинового рецептора. Как обсуждалось в другом месте настоящего описания, Ab по изобретению, связывающиеся с эпитопом, содержащим по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность



V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109), например, содержащим 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или все аминокислоты в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109), и, в частности, где аминокислоты Y<sub>15</sub> и Y<sub>17</sub> сульфатированы, представляют особый интерес, и в примере 11 показано, что mAb4A19 связывается с дважды сульфатированным N-концом CCR8 с K<sub>D</sub> приблизительно 1,6 нМ (см. таблицу 5).

*Сниженное фукозилирование, отсутствие фукозилирования и гипофукозилирование mAb против CCR8*

Взаимодействие Ab с FcγR можно усиливать посредством модификации остатка гликана, присоединенного к каждому Fc-фрагменту по остатку N297 (нумерация EU). В частности, отсутствие коровых остатков фукозы сильно повышает ADCC посредством улучшенного связывания IgG с активирующим FcγRIIIA без изменения связывания антигена или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC; Natsume et al., 2009). Связывание nf-Ab с CCR8 на T<sub>reg</sub>-клетках человека облегчает вовлечение FcγR на NK-клетках и миеломоноцитарных T<sub>eff</sub>. Это вовлечение FcγR запускает активацию NK-клеток, приводящую к повышенному уничтожению T<sub>reg</sub> посредством ADCC. Существуют убедительные доказательства того, что афукозилированные опухолеспецифические Ab приводят к повышенной терапевтической активности в моделях на мышах in vivo (Nimmerjahn and Ravetch, 2005; Mössner et al., 2010).

Модификацию гликозилирования Ab можно осуществлять, например, посредством экспрессии Ab в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Некоторые из mAb против hCCR8, представленных в настоящем описании, обладают сниженным или устраненным фукозилированием и демонстрируют повышенную ADCC, особенно полезную в способах по настоящему изобретению. Таким образом, mAb против hCCR8, представленные в настоящем описании, можно получать в форме, в которой они обладают сниженным или устраненным фукозилированием, например, посредством экспрессии mAb против hCCR8 в клетках с измененным аппаратом гликозилирования, и в результате демонстрируют повышенную ADCC, особенно полезную в способах по настоящему изобретению. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования описаны в этой области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев для экспрессии рекомбинантных Ab по изобретению, чтобы, таким образом, получать Ab, например, mAb, с измененным гликозилированием. Например, в линиях клеток Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует фермент фукозилтрансфераза, (α-(1,6)-фукозилтрансфераза FUT8; см. патентную публикацию США № 2004/0110704; Yamane-Ohnuki et al., 2004), таким образом, что в Ab, экспрессирующихся в эти линии клеток, отсутствует фукоза в их углеводах. В EP 1176195 также описана линия клеток с функционально поврежденным геном FUT8, а также линии клеток, имеющие небольшую активность или не имеющие активность по добавлению фукозы к N-ацетилглюкозамину, связывающемуся с Fc-областью Ab, например, линия клеток миеломы крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В этой области описаны многие другие способы получения Ab со сниженным фукозилированием.

Гипофукозилированные или nf химерные, гуманизированные или человеческие Ab против hCCR8, представленные в настоящем описании, получали посредством экспрессии в Fut8<sup>-/-</sup> нокаутных клетках Expi293 (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA), в которых отсутствует фермент FUT8, необходимый для фукозилирования.

Т.к. nf Ab демонстрируют значительно повышенную ADCC по сравнению с фукозилированным Ab, препараты Ab могут не быть полностью несодержащими фукозилированные тяжелые цепи, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению. Остаточные уровни фукозилированных тяжелых цепей не будут значимо мешать активности ADCC препарата, по существу, nf тяжелых цепей. Несмотря на это, Ab, продуцируемые в общепринятых клетках CHO, которые являются полностью компетентными по добавлению коровой фукозы к N-гликанам, могут содержать от нескольких процентов до 15% nf Ab. Nf Ab могут демонстрировать в приблизительно 10 раз более высокую аффинность к CD16 и до 30-100-кратное повышение активности ADCC, таким образом, даже небольшое повышение доли nf Ab может значительно повышать активность ADCC препарата. Любой препарат, содержащий больше nf Ab, чем продуцировалось бы в нормальных клетках CHO, например, клетках CHO дикого типа, имеющих неизмененный аппарат гликозилирования, в культуре может демонстрировать некоторый уровень повышенной ADCC. Такие препараты Ab обозначают в настоящем описании как препараты, имеющие сниженное фукозилирование. В зависимости от исходного уровня отсутствия фукозилирования, полученного от нормальных клеток CHO, например, клеток CHO дикого типа, препараты со сниженным фукозилированием могут содержать всего 50%, 30%, 20%, 10% и даже 5% nf Ab. Сниженное фукозилирование можно функционально определять как препараты, демонстрирующие приблизительно 2-кратное или большее повышение ADCC по сравнению с Ab, полученными в нормальных клетках CHO, и без ссылки на какую-либо фиксированную процентную долю nf молекул.

Однако в рамках изобретения, если не указано иначе, уровень отсутствия фукозилирования является структурно определенным. В частности, "нефукозилированные" (nf) или "афукозилированные" (термины, используемые в качестве синонимов) препараты Ab являются препаратами Ab, содержащими более 95% nf тяжелых цепей Ab, включая 100%; термин "гипофукозилированные" относится к препаратам Ab, в которых от 80 до 95% тяжелых цепей не содержат фукозу; и термин "гипофукозилированные или нефукозилированные" относится к препаратам Ab, в которых 80% или более тяжелых цепей не содержат фукозу.

Уровень фукозилирования в препарате Ab можно определять известным в этой области способом, включая, в качестве неограничивающих примеров, электрофорез в геле, жидкостную хроматографию (LC) и масс-спектрометрию (MS). Если не указано иначе, в целях по настоящему изобретению уровень фукозилирования в препарате Ab определяют посредством хроматографии гидрофильных взаимодействий (или жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, HILIC). Для определения уровня

фукозилирования препарата Ab образцы подвергают денатурации, обрабатывают ПНГазой F для расщепления N-связанных гликанов, которые затем анализировали на содержание фукозы. LC/MS полноразмерных цепей Ab является альтернативным способом детекции уровня фукозилирования препарата Ab, но масс-спектроскопия по своей природе является менее количественной.

*Терапевтические mAb против hCCR8 должны иметь высокий потенциал к ADCC*

Из-за больших трудностей, с которыми авторы настоящего изобретения столкнулись при получении Ab против CCR8 в предварительных экспериментах по иммунизации, иммунизации в конечном итоге осуществляли с использованием широко спектра антигенов, как описано выше и в примере 8. Полученные гибридомы подвергали скринингу, как описано в примере 9, для подтверждения связывания Ab с CCR8 и с N-концевым пептидом CCR8. Выбранные Ab мыши гуманизировали, как описано в примере 10.

Настоящее изобретение также относится к способу получения Ab против CCR8, включающему иммунизацию грызуна по меньшей мере однократно с использованием одного или более антигенов hCCR8 по схеме иммунизации, включающей одну или более иммунизаций, где схема иммунизации включает в по меньшей мере одной из иммунизаций введение антигена hCCR8, являющегося KLN-конъюгированным пептидом hCCR8, включающим остатки Y15 и Y17 hCCR8, и где остатки Y15 и Y17 являются остатками сульфотирозина. Предпочтительно, оба остатка Y15 и Y17 являются остатками сульфотирозина.

Необязательно, пептид hCCR8 содержит или состоит из по меньшей мере наиболее N-концевых 25, 30 или 35 аминокислот hCCR8. Необязательно, пептид hCCR8 состоит из наиболее N-концевых 35 аминокислот hCCR8.

Необязательно, грызун представляет собой мышь, крысу или хомяка. Предпочтительно, грызун представляет собой мышь.

Необязательно, грызуна иммунизируют клеткой, экспрессирующей hCCR8 или, предпочтительно, фракцией, обогащенной плазматической мембраной, выделенной из клетки, экспрессирующей CCR8, в по меньшей мере одной из иммунизаций в отдельности или в комбинации с KLN-конъюгированным пептидом hCCR8. Необязательно, схема иммунизации включает иммунизацию грызуна с использованием клеток НЕК 293F, экспрессирующих hCCR8, и KLN-конъюгированного, N-концевого пептида hCCR8. Необязательно, схема иммунизации включает иммунизацию грызуна фракциями, обогащенными плазматическими мембранами, клеток BAF3, экспрессирующих hCCR8, и KLN-конъюгированным пептидом hCCR8.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к выделенному Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, специфически связывающемуся с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и опосредующему истощение CCR8-экспрессирующей клетки посредством ADCC. В некоторых вариантах осуществления CCR8, с которым связывается mAb или его антигенсвязывающая часть,

является hCCR8, последовательность которого приведена как SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления CCR8 является mCCR8, последовательность которого приведена как SEQ ID NO: 120.

Ab изотипов IgG1 и IgG3 человека могут опосредовать ADCC посредством связывания с активирующими Fcγ-рецепторами, в частности, рецептором CD16 (FcγRIIIa), экспрессируемым NK-клетками и моноцитами человека (см. таблицу 1). Многие терапевтический Ab, которые были коммерциализированы, имеют изотип IgG1 человека, который может индуцировать сильную ADCC и CDC по сравнению с другими изотипами Ab человека. Кроме того, терапевтические Ab IgG1 имеют длительную стабильность в крови, опосредованную связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Активность нескольких терапевтических Ab, включая антитело против CD20 ритуксимаб (RITUXAN®) (Dall'Ozzo et al., 2004), антитело против Her2 трастузумаб (HERCEPTIN®) (Gennari et al., 2004), антитело против фактора некроза опухоли α (против ФНОα) инфликсимаб (REMICADE®) (Louis et al., 2004) и антитело против RhD (Miescher et al., 2004), по меньшей мере частично, опосредована ADCC.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть содержит константную область тяжелой цепи, принадлежащую изотипу IgG1 или IgG3 человека. В предпочтительных вариантах осуществления mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть принадлежит IgG1 человека.

Настоящее изобретение также относится к модифицированному mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающей части, содержащему модифицированную константную область тяжелой цепи, связывающуюся с более высокой аффинностью с аFcγR, и опосредующему повышенную ADCC по сравнению с соответствующим немодифицированным mAb или его антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления модифицированное mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть опосредует по меньшей мере, (a) в приблизительно 2 раз повышенную активность ADCC; (b) в приблизительно 5 раз повышенную активность ADCC; (c) в приблизительно 10 раз повышенную активность ADCC; (d) в приблизительно 30 раз повышенную активность ADCC или (e) в приблизительно 100 раз повышенную активность ADCC, например, что измеряют по снижению EC<sub>50</sub> лизиса клеток в анализе лизиса NK-клетками, например, анализе лизиса NK-клетками, описанном в примере 17. В некоторых вариантах осуществления модифицированное mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть содержит модифицированную константную область тяжелой цепи IgG1, демонстрирующую сниженное фукозилирование.

В дополнительных вариантах осуществления модифицированное mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть содержит модифицированную константную область тяжелой цепи IgG1, являющуюся гипофукозилированной или нефукозилированной. В некоторых других вариантах осуществления модифицированное mAb или его антигенсвязывающая часть содержит модифицированную константную

область тяжелой цепи IgG1, содержащую мутацию или множество мутаций, опосредующих повышенную ADCC. В дополнительных вариантах осуществления мутация или множество мутаций выбраны из G236A; S239D; F243L; E333A; G236A/I332E; S239D/I332E; S267E/H268F; S267E/S324T; H268F/S324T; G236A/S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; S267E/H268F/S324T; и G236A/S239D/A330L/I332E. В некотором варианте осуществления модифицированное mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть содержит модифицированную константную область тяжелой цепи IgG1, являющуюся гипофукозилированной или нефукозилированной, и дополнительно содержит мутацию или множество мутаций, таких как указанные выше, опосредующую повышенную ADCC.

*Функциональный скрининг mAb против hCCR8, опосредующих ADCC*

Клоны человеческих, гуманизированных и химерных mAb против hCCR8 подвергали функциональному скринингу для идентификации Ab, демонстрирующих свойства, желательные для терапевтического Ab, включая Ab, связывающиеся с hCCR8 с высокой аффинностью (пример 11), связывающиеся специфически с CCR8-экспрессирующими клетками человека (пример 14), блокирующие связывание лиганда CCL1 с CCR8 (пример 15), опосредующие ADCC CCR8-экспрессирующих клеток, включая T<sub>reg</sub>-клетки, при связывании с CCR8 на поверхности таких клеток (примеры 17, 19 и 20), не вызывая интернализацию CCR8 клетки (пример 21), способствующие истощению опухолеассоциированных T<sub>reg</sub>-клетки человека *in vitro* (пример 22) и в образцах срезов опухолей человека *ex vivo* (пример 20), опосредующие специфическое истощение опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток при сохранении CCR8<sup>+</sup> T-клеток в нормальных тканях (пример 24) и снижающие рост опухоли в доклинических моделях опухолей на мышах при введении мышам в виде монотерапии или в комбинации с ингибитором контрольных точек (примеры 23-29).

Клоны подвергали селекции для дальнейшей характеристики после того, как они изначально продемонстрировали связывание с CCR8 на клетках человека с субнанолярными значениями EC<sub>50</sub> и специфическое связывание с CCR8-экспрессирующими клетками без перекрестной реактивности в отношении различных тканей человека, неэкспрессирующих CCR8. ДНК, кодирующую вариabельные области этих Ab, секвенировали посредством секвенирования нового поколения и выбирали клоны по разнообразию на основе гомологии последовательности и ограниченным потенциальным недостаткам последовательности, например, дезамидированию аспарагина, окислению метионина и участкам гликозилирования. Учитывая их активность при опосредовании ADCC CCR8-экспрессирующих клеток, кинетику связывания и разнообразие семейства последовательностей, некоторые выбранные клоны mAb дополнительно тестировали на функции, которые считают желательными для терапевтического Ab, включая способность ингибировать рост опухоли в моделях опухолей на мышах, и подвергали оптимизации последовательности для уменьшения недостатков последовательностей, оптимизации аффинностей связывания и возвращения

к аминокислотам зародышевой линии. Выбранные mAb также анализировали на их биофизические свойства с помощью различных анализов, таких как аналитическая эксклюзионная хроматография, капиллярное изоэлектрофокусирование, анализы гидрофобности, анализы термической стабильности и склонности к агрегации, для идентификации клонов, подходящих для дальнейшей разработки.

#### *Характеризация аффинности связывания mAb против CCR8 с CCR8*

Некоторые из mAb против CCR8 по настоящему изобретению связываются с hCCR8 с высокой аффинностью. Ab, как правило, специфически связываются со своим когнатным антигеном с высокой аффинностью, что отражает константа диссоциации ( $K_D$ ) от 1 мкМ до 10 пМ или менее. Любую  $K_D$  более приблизительно 100 мкМ, как правило, считают свидетельствующей о неспецифическом связывании. В рамках изобретения термин Ab IgG, "специфически связывающееся" с антигеном, относится к Ab, связывающемуся с антигеном и по существу идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает, что оно имеет  $K_D$  приблизительно 100 нМ или менее, предпочтительно - приблизительно 10 нМ или менее, более предпочтительно - приблизительно 5 нМ или менее, и даже более предпочтительно - приблизительно от 5 нМ и 0,1 нМ или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "по существу идентичным" указанному антигену, если он демонстрирует высокую степень идентичности последовательности в отношении указанного антигена, например, если он демонстрирует по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно - по меньшей мере 95%, более предпочтительно - по меньшей мере 97%, или даже более предпочтительно - по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении последовательности указанного антигена.

В рамках изобретения термин " $K_D$ " предназначен для обозначения константы диссоциации для конкретного взаимодействия Ab-антиген, получаемой из соотношения  $k_{off}$  и  $k_{on}$  (т.е.  $k_{off}/k_{on}$ ) и выражаемой как молярная концентрация (например, нМ). Термин " $k_{on}$ " относится к скорости ассоциации или "скорости прямой реакции" для взаимодействия ассоциации Ab и его антигена, в то время как термин " $k_{off}$ " относится к скорости диссоциации комплекса Ab-антиген. Значения  $K_D$  Ab можно определять хорошо известными в этой области способами, такими как поверхностный плазмонный резонанс (SPR), анализ кинетического исключения (KinExA®; Saphidyne Instruments, Boise, ID) или интерферометрия биослоя (BLI; ForteBio, Fremont, CA). Значения  $K_D$ , определенные разными способами для одного Ab, могут варьироваться значительно, например, в до 1000 раз. Таким образом, при сравнении значений  $K_D$  для разных Ab важно определять эти значения  $K_D$  одним и тем же способом. Если не указано конкретно, и если контекст не указывает на иное, значения  $K_D$  для связывания Ab, представленного в настоящем описании, определяли посредством SPR с использованием биосенсорной системы BIAcore® (GE Healthcare, Chicago, IL).

Аффинности связывания Ab с мишенью, такой как hCCR8, также можно определять посредством измерения  $EC_{50}$  для связывания с CCR8-экспрессирующими

линиями клеток, представляющей собой концентрацию Ab, при которой достигают половины максимального связывания. В исследованиях связывания mAb с линиями клеток CHO, 293F, Raji, экспрессирующими CCR8, определяли EC<sub>50</sub> менее 1 нМ (фигура 11A). При связывании с активированными T<sub>reg</sub>-клетками, эти Ab демонстрировали более широкий диапазон аффинностей связывания, при этом менее половины Ab демонстрировали связывание с EC<sub>50</sub> менее 1 нМ (фигура 11A). Выбранный набор mAb, показанный на фигуре 11B, демонстрируют EC<sub>50</sub> в диапазоне от пикомолярных до наномолярных значений.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с экспрессирующими CCR8 человека клетками CHO с EC<sub>50</sub>: приблизительно 10 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 5 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 2 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 1,7 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 1 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 0,5 нМ или менее; и даже более предпочтительно - приблизительно 0,1 нМ или менее. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть связывается с hCCR8-экспрессирующими клетками CHO с EC<sub>50</sub> приблизительно 0,1 нМ. В некоторых других предпочтительных вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть связывается с hCCR8-экспрессирующими клетками CHO с EC<sub>50</sub> приблизительно 1,7 нМ. В некоторых вариантах осуществления mAb связывается с EC<sub>50</sub> от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ. В некоторых других вариантах осуществления EC<sub>50</sub> составляет от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 2 нМ. В некоторых других вариантах осуществления EC<sub>50</sub> составляет от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 5 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления EC<sub>50</sub> составляет от приблизительно 1 нМ до приблизительно 2 нМ. В других вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть связывается с hCCR8 человека с EC<sub>50</sub> от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 1 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления значение EC<sub>50</sub> измеряют посредством анализа связывания, описанного в примере 11.

В некоторых других вариантах осуществления настоящего изобретения mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с активированными T<sub>reg</sub>-клетки человека с EC<sub>50</sub>: приблизительно 50 нМ или менее, приблизительно 14 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 5 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 2 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 0,5 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 0,3 нМ или менее; даже более предпочтительно - приблизительно 0,1 нМ или менее; и еще более предпочтительно - приблизительно 0,03 нМ или менее. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть связывается с hCCR8-экспрессирующими

клетками СНО с  $EC_{50}$  приблизительно 1,7 нМ. В некоторых вариантах осуществления mAb связывается с  $EC_{50}$  от приблизительно 0,03 нМ до приблизительно 10 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления  $EC_{50}$  составляет от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ. В более предпочтительных вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть связывается с hCCR8 человека с  $EC_{50}$  от приблизительно 0,2 нМ до приблизительно 2 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления значение  $EC_{50}$  измеряют посредством анализа связывания, описанного в примере 11.

Как показано посредством рентгеноструктурной кристаллографии, Fab-фрагмент выбранного mAb против hCCR8, 4A19, связывается с эпитопом, содержащим остатки 15-21 в N-концевом пептиде hCCR8 (пример 11) с сульфатированным остатком тирозина-17 в центре эпитопа (фигура 12A). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающей части, представленное в настоящем описании, связывается с N-концевым эпитопом CCR8 человека, что определяют посредством рентгеноструктурной кристаллографии, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность  $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$  (SEQ ID NO: 2). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления пептид эпитопа содержит сульфатированный остаток тирозина-17. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6 или все аминокислоты в пептиде, имеющем последовательность SEQ ID NO: 2.

Связывание дважды сульфатированного пептида (сульфатированного по  $Y_{15}$  и  $Y_{17}$ ) с Fab-фрагментом 4A19 подтверждало идентичность и ориентацию центра эпитопа. Это дополнительно делает возможной уточнение границ более длинного линейного эпитопа, содержащего N-концевые остатки 12-22 (VTDYYYPDIFS; SEQ ID NO: 109) hCCR8 (фигура 12B). Удлинение эпитопа с одного конца, выявленное с помощью моноссульфатированного пептида, вероятно, является следствием того, что сульфо- $Y_{15}$  занимает большой сегмента N-концевого пептида hCCR8, что делает возможной визуализацию его взаимодействий с 4A19 Ab. Последовательность эпитопа, наблюдаемая в структуре с дважды сульфатированным пептидом, может составлять целый эпитоп, связанный mAb 4A19, т.к. это Ab получали с использованием стратегии иммунизации, включающей множество иммунизаций N-концевым пептидом hCCR8 для усиления иммунного ответа на N-конец hCCR8. Если другие аминокислотные остатки в N-концевом пептиде образовали часть эпитопа, это, вероятно, наблюдали бы в кристаллической структуре, но этого не было (фигура 12B).

Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления пептид эпитопа, связанный 4A19, содержит сульфатированные остатки тирозина-15 и тирозина-17. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты  $Y_{15}$  и/или  $Y_{17}$  этого пептида являются сульфатированными. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления обе аминокислоты  $Y_{15}$  и  $Y_{17}$  этого пептида являются сульфатированными.



Настоящее изобретение относится к Ab, например, mAb, или его антигенсвязывающей части, способному опосредовать ADCC и специфически связывающемуся с эпитопом на hCCR8, последовательность которого приведена как SEQ ID NO: 1, где эпитоп локализован в N-концевом домене hCCR8 в пептиде, охватывающем аминокислотные остатки приблизительно 15-21 (Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>; SEQ ID NO: 2), что определяют посредством рентгеноструктурной кристаллографии. В некотором варианте осуществления эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub> (SEQ ID NO: 2). В других вариантах осуществления эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6 или все аминокислоты в пептиде, имеющем последовательность Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub> (SEQ ID NO: 2). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления эпитоп содержит все 7 аминокислот, имеющих последовательность SEQ ID NO: 2.

Настоящее изобретение также относится к Ab, например, mAb, или его антигенсвязывающей части, способному опосредовать ADCC и специфически связывающемуся с эпитопом на hCCR8, последовательность которого приведена как SEQ ID NO: 1, где эпитоп локализован в N-концевом домене hCCR8 в пептиде, охватывающем аминокислотные остатки приблизительно 12-22 (V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub>; SEQ ID NO: 109), что определяют посредством рентгеноструктурной кристаллографии. В некотором варианте осуществления эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109). В других вариантах осуществления эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или все аминокислоты в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления эпитоп содержит все 11 аминокислот, имеющих последовательность SEQ ID NO: 109. В некоторых других вариантах осуществления эпитоп состоит из пептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 109.

В некоторых аспектах по настоящему изобретению mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть связывается с N-концевым пептидом hCCR8, содержащим сульфатированные остатки tyr-15 и tyr-17 (например, пептид N-концевых остатков CCR8 1-35, сульфатированный в положениях tyr-15 и tyr-17 (CCR8-2-сульфо)) с K<sub>D</sub>: приблизительно 100 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 50 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 10 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 5 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 1,6 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 1,0 нМ или менее; и даже более предпочтительно - приблизительно 0,5 нМ или менее; и еще более предпочтительно - приблизительно 0,1 нМ или менее. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть связывается с N-концевым пептидом эпитопа, например, пептидом N-концевых остатков CCR8 1-35, сульфатированным в положениях Tyr15 и Tyr17 (CCR8-2-сульфо)), с K<sub>D</sub> приблизительно 1,6 нМ. В некоторых вариантах осуществления mAb связывается с K<sub>D</sub> от приблизительно

100 нМ до приблизительно 0,1 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления  $K_D$  составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 0,5 нМ. В более предпочтительных вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть связывается с  $K_D$  от приблизительно 10 нМ до приблизительно 1 нМ. В еще более предпочтительных вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть связывается с  $K_D$  от приблизительно 2 нМ до приблизительно 1 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления значение  $K_D$  измеряют способом SPR, описанным в примере 11.

Сульфатирование тирозина (tyr-15 и tyr-17) на N-конце hCCR8 необходимо для связывания Ab 4A19 (см. пример 11). Если только один остаток тирозина, tyr-15, сульфатирован, Fab-фрагмент 4A19 слабее связывается с N-концевым пептидом, о чем свидетельствует  $K_D$  более чем в 10 раз более высокая и приблизительно в 1000 раз более высокая, чем у дважды сульфатированного пептида, в то время как наблюдают приблизительно 10-кратное снижение аффинности, если только tyr-17 сульфатирован (таблица 5). Таким образом, настоящее изобретение относится к mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающей части, связывающемуся с N-концевым пептидом hCCR8, содержащим один сульфатированный остаток, tyr-17 (CCR8-сульфо-Y17): приблизительно 100 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 50 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 25 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 10 нМ или менее; и даже более предпочтительно - приблизительно 1,0 нМ или менее. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть связывается с однократно сульфатированным пептидом эпитопа с  $K_D$  приблизительно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления mAb связывается с  $K_D$  от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления  $K_D$  составляет от приблизительно 50 нМ до приблизительно 10 нМ. В более предпочтительных вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть связывается с  $K_D$  от приблизительно 30 нМ до приблизительно 20 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления значение  $K_D$  измеряют способом SPR, описанным в примере 11.

#### *Тканевая перекрестная реактивность mAb против hCCR8*

Т.к. терапевтическое mAb против CCR8 будут использовать для истощения клеток-мишеней, экспрессирующих CCR8, важно, чтобы mAb специфически связывалось с предполагаемыми клетками-мишенями, т.е. инфильтрирующими опухоль  $T_{reg}$ -клетками, а не другими важными типами клеток в организме, истощение которых будет индуцировать токсические или нежелательные побочные эффекты. Таким образом, mAb-кандидаты тестировали на связывание с широким спектром типов нормальных тканей человека (пример 14). Показано, что mAb против hCCR8 18Y12 и 4A19 связываются с редкими и рассеянными иммунными клетками, главным образом, в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, в то время как не наблюдали связывания во множестве других исследуемых тканей. Наблюдали, что другое mAb, 16B13, неспецифически связывается с PBMC и

различными тканями человека, включая иммунные клетки в лимфоидных органах и богатых лимфоидными клетками тканях, и со многими тканями, в которых присутствуют иммунные клетки. Окрашивание проявляло цитоплазматический паттерн. Ab, такие как 16B13, неспецифически связывающиеся с иными мишенями, чем CCR8, на поверхности клетки, не подходят для терапевтического использования в таргетинге CCR8-экспрессирующих клеток для истощения, несмотря на другие желаемые функциональные свойства, которые они могут демонстрировать.

Соответственно, настоящее изобретение относится к mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, специфически связывающемуся с CCR8-экспрессирующими клетками, такими как опухолевые T<sub>reg</sub>-клетки и редкие и рассеянные иммунные клетки в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, но не связывается с широким спектром тканей включая ткань головного мозга, мозжечка, сердца, печени, легких, почки, миндалины, селезенки, тимуса, толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, надпочечника, гипофиза, кожи, периферического нерва, яичка или матки или PBMC человека. Например, mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть может специфически связываться с инфильтрирующими опухоль T<sub>reg</sub>-клетками, но не связываются с PBMC, например, не демонстрируют цитоплазматическое окрашивание в фиксированных PBMC. Можно определять отсутствие связывания Ab с указанным выше списком клеток и тканей, например, посредством осуществления стандартного окрашивания с соответствующими Ab, например, способами, описанными в примере 14, например, на фиксированных образцах ткани.

#### *Ингибирование передачи сигнала CCR8/лиганда mAb против CCR8*

В примерах 15 и 16 блокада связывания hCCL1 и mCCL1 с hCCR8 и mCCR8, соответственно, и блокаду передачи сигнала CCR8/CCL1 с помощью mAb против CCR8 тестировали посредством осуществления анализов тока кальция (Ca) на CCR8-экспрессирующих линиях клеток CHO, т.к. вовлечение CCL1 CCR8 на клетках CHO индуцирует Ca. CCL1 является единственным лигандом, о котором известно, что он связывается с CCR8. Исследования показали, что связывание CCL1 м CCR8 может повышать супрессию T<sub>reg</sub> в анализах *in vitro*, а также супрессировать аутоиммунные воспалительные ответы в моделях на мышах (Barsheshet et al., 2017). Блокирование Ab против CCR8 в модели фибросаркомы SA1N также показана частичная противоопухолевая эффективность (фигура 28A). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Ab против CCR8 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению ингибирует связывание CCL1 с CCR8, например, hCCR8 или mCCR8, и ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование тока Ca измеряют, как описано в примерах 15 и 16 для hCCR8 и mCCR8, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления mAb против hCCR8 ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с IC<sub>50</sub> приблизительно 10 нМ или менее; приблизительно 5 нМ или менее; предпочтительно - приблизительно 1 нМ или менее; более предпочтительно -

приблизительно 0,5 нМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 0,1 нМ или менее; даже более предпочтительно - приблизительно 0,01 нМ или менее. В некоторых предпочтительном варианте осуществления mAb против hCCR8 ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с  $IC_{50}$  приблизительно 0,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления против hCCR8 Ab ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1с  $IC_{50}$  от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 10 нМ. В некоторых других вариантах осуществления Ab против hCCR8 ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1с  $IC_{50}$  от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 5 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления против hCCR8 Ab ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1с  $IC_{50}$  от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 1 нМ. В более предпочтительных вариантах осуществления против hCCR8 Ab ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1с  $IC_{50}$  от приблизительно 0,2 нМ до приблизительно 0,5 нМ. Эти  $IC_{50}$  значения основаны на анализе, описанном в примере 15.

*ADCC-опосредованное уничтожение CCR8-экспрессирующих клеток с помощью mAb против CCR8s*

Способность mAb против hCCR8 и против mCCR8 индуцировать ADCC-опосредованное уничтожение CCR8-экспрессирующих клеток напрямую оценивали посредством измерения их способности индуцировать перекрестную сшивку репортерных клеток человека или мыши, экспрессирующие Fc-рецепторы. В некоторых вариантах осуществления mAb или его антигенсвязывающая часть по изобретению опосредует истощение CCR8-экспрессирующей клетки с  $EC_{50}$ , что измеряли посредством анализа перекрестной сшивки CD16. В предпочтительных вариантах осуществления потенциал ADCC измеряют посредством анализов перекрестной сшивки, описанных в примерах 17 и 18 для hCCR8 и mCCR8, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающей части опосредует истощение CCR8-экспрессирующей клетки с  $EC_{50}$ , что измеряли посредством анализа перекрестной сшивки CD16, приблизительно 100 пМ или менее; предпочтительно - приблизительно 30 пМ или менее; предпочтительно - приблизительно 10 пМ или менее; предпочтительно - приблизительно 3 пМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 1 пМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 0,5 пМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 0,1 пМ или менее; или даже более предпочтительно - приблизительно 0,05 пМ или менее. В некоторых предпочтительном варианте осуществления mAb против hCCR8 опосредует истощение CCR8-экспрессирующей клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 0,7 пМ. В некоторых вариантах осуществления Ab против hCCR8 опосредует истощение CCR8-экспрессирующей клетки с  $EC_{50}$  от приблизительно 0,05 пМ до приблизительно 50 пМ, предпочтительно - от приблизительно 0,1 пМ до приблизительно 10 нМ; более предпочтительно - от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 7 нМ; и даже более предпочтительно - от приблизительно 0,6 нМ до приблизительно 3 нМ. Эти значения  $EC_{50}$  основаны по анализу перекрестной сшивки CD16, описанном в примере 17.

Прямое уничтожение активированных  $T_{reg}$ -клеток и опухолевых  $T_{reg}$ -клеток пациента показано в примерах 19 и 20. В некоторых вариантах осуществления mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть опосредует истощение активированных  $T_{reg}$ -клеток с  $EC_{50}$ , что измеряли посредством анализа апоптоза, приблизительно 500 пМ или менее; предпочтительно - приблизительно 100 пМ или менее; предпочтительно - приблизительно 30 пМ или менее; более предпочтительно - приблизительно 15 пМ или менее; даже более предпочтительно - приблизительно 5 пМ или менее; или даже более предпочтительно - приблизительно 1 пМ или менее. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb против hCCR8 опосредует истощение CCR8-экспрессирующей клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 13 пМ. В некоторых вариантах осуществления mAb против hCCR8 опосредует истощение CCR8-экспрессирующей клетки с  $EC_{50}$  от приблизительно 1 пМ до приблизительно 500 пМ, предпочтительно - от приблизительно 5 пМ до приблизительно 100 пМ; и более предпочтительно - от приблизительно 10 пМ до приблизительно 50 пМ. Эти  $EC_{50}$  значения основаны на анализе апоптоза, описанном в примере 19.

#### *Отсутствие интернализации CCR8 под действием mAb против CCR8s*

Ab, специфические для некоторых рецепторов поверхности клетки, индуцируют интернализацию рецептора через рецептор-опосредованный эндоцитоз, что может быть необходимым для направленной доставки некоторых лекарственных средств, токсинов или ферментов для терапевтического использования. Как показано на фигуре 19, mAb против индуцибельного Т-клеточного костимулятора (ICOS) не вызывает интернализацию рецептора ICOS в отсутствие перекрестно сшивающего Ab, но в присутствии перекрестно сшивающего Ab вызывает значительную интернализацию ICOS. В отличие от этого, mAb против CCR8 вызывает отсутствие интернализации CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно сшивающего Ab. Интернализация CCR8 под действием Ab против CCR8 будет снижать его способность опосредовать истощение  $T_{reg}$  из-за удаления рецептора с поверхности  $T_{reg}$ -клеток. Таким образом, отсутствие интернализации CCR8 под действием Ab против CCR8 позволяет дополнительно валидировать терапевтический потенциал этих Ab. Интернализация CCR8 можно измерять стандартными способами, используемыми в этой области, например, с помощью методики эксперимента в примере 21.

Таким образом, настоящее изобретение относится к mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, которое при связывании с CCR8 на поверхности клетки не вызывает интернализацию CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно сшивающего Ab. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CCR8 на своей поверхности, является  $T_{reg}$ .

*Истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток человека in vitro и в Образцы опухоли пациента ex vivo*

Способность mAb против hCCR8 опосредовать истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток оценивали с системе in vitro, в которой расщепленные опухоли пациентов сокультивировали с аллогенными NK-клетками (пример 22). Показано, что mAb против

hCCR8, 4A19, индуцирует истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток без снижения популяции  $T_{eff}$ . mAb 4A19 являлось более эффективным в истощении  $T_{reg}$ , чем mAb против CCR4-nf в этой системе анализа *in vitro* (фигура 20A), и не индуцировало истощение эффекторных  $CD4^+$  Т-клеток, в то время как Ab против CCR4-nf измеримо вызывало истощение этих клеток (фигура 20B). Ни антитело против CCR8, ни антитело против CCR4 не вызывало истощения эффекторных  $CD8^+$  Т-клеток (фигура 20C).

Способность mAb против hCCR8 индуцировать истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клетки также оценивали в системе анализа *ex vivo* с использованием срезов опухолей пациента (пример 20). Показано, что mAb 16B13-IgG1-nfwas опосредует истощение  $T_{reg}$  без добавления аллогенных НК-клеток (фигуры 18H и 18I).

В некоторых вариантах осуществления mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть по изобретению индуцирует истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток *in vitro* без уменьшения популяции эффекторных  $CD4^+$  или  $CD8^+$  Т-клеток. В предпочтительных вариантах осуществления истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток *in vitro* измеряют с использованием анализа, описанного в примере 22.

В некоторых других вариантах осуществления mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть по изобретению индуцирует истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток в образцы опухолевой ткани пациента *ex vivo*. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток в образцах опухолевой ткани *ex vivo* пациента измеряют с использованием анализа, описанного в примере 20.

*Опосредованное антителами против mCCR8 специфическое истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток, а не CCR8 Т-клеток в образцах нормальных тканей*

В дополнение к опухолевым  $T_{reg}$ -клетки, CCR8 также экспрессируется на небольшой субпопуляции тимусных Т-клеток, а также резидентных Т-клетках кожи, являющихся редкой популяцией, обнаруживаемой в коже. В сингенной модели опухолей СТ26 на мышах, демонстрирующих профиль экспрессии CCR8, очень схожий с людьми, истощающее mAb против mCCR8, mIgG2a против CCR8, селективно истощало  $CCR8^+$   $T_{reg}$ -клетки в опухоли, но не истощало  $CCR8^+$  Т-клетки в коже, тимусе, селезенке или крови (пример 24). Высокоспецифическая истощающая активность mIgG2a против CCR8 в опухоли, но не в других CCR8-экспрессирующих органах, может являться результатом относительно низкой частоты  $Fc\gamma RIV$ -экспрессирующих клеток вблизи Ab-связанных клеток-мишеней или более низкой плотности CCR8 на поверхность  $CCR8^+$  Т-клеток в коже, тимусе, селезенке и крови. Это убедительно подтверждает точку зрения о том, что Ab против CCR8, имеющее оптимизированную аффинность к активирующим  $Fc\gamma R$ , таким как человеческое или гуманизированное IgG1-nf mAb против CCR8, подобное 4A19 или 14S15, будет делать возможным мощное истощение опухолевых  $T_{reg}$  у пациентов-людей без непреднамеренного истощения  $CCR8^+$  Т-клеток в коже, где экспрессия CD16 является низкой.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть специфически индуцирует истощение

опухолевых  $T_{reg}$ -клеток без истощения  $CCR8^+$  Т-клеток в коже, тимусе, селезенке и крови. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток измеряют *in vivo* с использованием анализа, описанного в примере 24.

*mAb против CCR8 связывающиеся с тем же эпитопом CCR8, что и референсное Ab*

Настоящее изобретение также относится к выделенному Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, связывающемуся с тем же эпитопом hCCR8, что и референсное Ab, где референсное Ab содержит:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 5, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 17;

(d)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18;

(e)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 7, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 19;

(f)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 8, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 20;

(g)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 9, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 21;

(h)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 22;

(i)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 11, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 23;

(j)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 12, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 24;

(k)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 13, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 25;

(l)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, связывающемуся с тем же эпитопом hCCR8, что и референсное Ab, где референсное Ab содержит:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 1144, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116; или

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, связывающемуся с тем же эпитопом hCCR8, что и референсное Ab, где референсное Ab содержит  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты,



имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и V<sub>L</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

*mAb против CCR8, перекрестно конкурирующие с референсным Ab за связывание с CCR8*

В объем настоящего изобретения также включено выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и перекрестно конкурирующее с референсным Ab или его референсной антигенсвязывающей частью за связывание с hCCR8. Способность пары Ab "перекрестно конкурировать" за связывание с антигеном, например, CCR8, свидетельствует о том, что первое Ab связывается с, по существу, той же областью эпитопа антигена и стерически затрудняет связывание второго Ab с этой конкретной областью эпитопа, и, наоборот, второе Ab связывается с, по существу, той же областью эпитопа антигена и стерически затрудняет связывание первого Ab с этой областью эпитопа. Таким образом, способность тестируемого Ab конкурентно ингибировать связывание, например, mAb 14S15 или 4A19 с hCCR8, свидетельствует о том, что тестовое Ab связывается с, по существу, той же областью эпитопа hCCR8, что и mAb 14S15 или 4A19.

Считают, что первое Ab связывается с "по существу, тем же эпитопом", что и второе Ab, если первое Ab снижает связывание второго Ab с антигеном по меньшей мере на приблизительно 40%. Предпочтительно, первое Ab снижает связывание второго Ab с антигеном на более чем приблизительно 50% (например, по меньшей мере приблизительно 60% или по меньшей мере приблизительно 70%). В более предпочтительных вариантах осуществления первое Ab снижает связывание второго Ab с антигеном на более чем приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или приблизительно 100%). Порядок первого и второго Ab может быть обратным, т.е. "второе" Ab может первым связываться с поверхностью, а "первое" затем контактирует с поверхностью в присутствии "второго" Ab. Ab считают "перекрестно конкурирующими", если наблюдают конкурентное снижение связывания с антигеном, независимо от порядка, в котором Ab добавляют к иммобилизованному антигену.

Ожидают, что перекрестно конкурирующие Ab будут иметь функциональные свойства, очень схожие со свойствами референсных Ab в силу их связывания, по существу, с той же областью эпитопа антигена, такого рецептор как CCR8. Чем выше степень перекрестной конкуренции, тем более схожими будут функциональные свойства. Например, ожидают, что два перекрестно конкурирующих Ab будут иметь, по существу, те же функциональные свойства, если каждое из них ингибирует связывание другого с эпитопом по меньшей мере на приблизительно 80%. Ожидают, что это сходство функции будет даже более близким, если перекрестно конкурирующие Ab демонстрируют схожие аффинности связывания с эпитопом, что измеряли по константе диссоциации (K<sub>D</sub>).

Перекрестно конкурирующие Ab против антиген легко можно идентифицировать по их способности детектируемо конкурировать в стандартных анализах связывания антигена, включая анализ BIACORE®, анализы ELISA или проточную цитометрию, с использованием рекомбинантных молекул антигена или экспрессирующихся на поверхности клетки молекул антигена. В качестве примера, простой конкурентный анализ для идентификации того, конкурирует ли тестовое Ab с mAb 4A19 за связывание с hCCR8, может включать: (1) измерение связывания 4A19, используемое при насыщающей концентрации, с чипом BIACORE® (или другой подходящей средой для анализа SPR), на котором иммобилизуют hCCR8, и (2) измерение связывания 4A19 с покрытым hCCR8 чипом BIACORE® (или другой подходящей средой), с которым ранее связывалось тестовое Ab. Сравнивают связывание 4A19 с покрытой hCCR8-1 поверхностью в присутствии и отсутствием тестового Ab. Значительное (например, более приблизительно 40%) снижение связывания 4A19 в присутствии тестового Ab свидетельствует о том, что оба Ab распознают, по существу, тот же эпитопом таким образом, что они конкурируют за связывание с мишенью hCCR8. Процент, на который второе Ab ингибирует связывание первого Ab с антигеном, можно вычислять следующим образом:  $[1 - (\text{детектируемое связывание первого Ab в присутствии второго Ab}) / (\text{детектируемое связывание первого Ab в отсутствии второго Ab})] \times 100$ . Для определения того, конкурируют ли Ab конкурентно, повторяют анализ конкурентного связывания, за исключением того, что измеряют связывание тестового Ab с покрытым hCCR8 чипом в присутствии 4A19.

Любые из Ab против CCR8, представленные в настоящем описании, могут служить в качестве референсного Ab в анализах перекрестной конкуренции. В некоторых вариантах осуществления референсное Ab содержит:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 5, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 17;

(d)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18;



связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 1144, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116; или

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления референсное Ab содержит  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

#### *Структурно определенные mAb против CCR8*

Настоящее изобретение также относится к выделенному Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части, специфически связывающемуся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержащему домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из:

(a)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;

(b)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(c)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 5, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 17;

(d)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18;

(e)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 7, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 19;

(f)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 8, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 20;

(g)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 9, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 21;

(h)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 22;

(i)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 11, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 23;

(j)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 12, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 24;

(k)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 13, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 25;

(l)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

Предпочтительным является выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержащее домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из:

(a)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(b)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 1144, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116; или

(c)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

Предпочтительным является выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержащее домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

Разработаны различные способы для определения границ доменов CDR в Ab. Подход Kabat и соавт. (Wu and Kabat, 1970; Kabat et al., 1983) основан на предположении, что CDR включают наиболее вариабельные положения в Ab, и, таким образом, их можно идентифицировать посредством выравнивания довольно ограниченного количества последовательностей Ab, доступных в то время. Учитывая это выравнивание, Kabat et al. внедрили схему нумерации для остатков в гипервариабельных областях и определяли, какие положения отмечают начало и конец каждой CDR (<http://bioinf.org.uk/abs/simkab.html>).

В дополнение к широко используемому определению по Kabat, используют другие, включая определения по Chothia (Chothia et al., 1987; 1989; Al-Lazikani et al., 1997; <http://bioinf.org.uk/abs/chothia.html>), системе AbNum (Abhinandan and Martin, 2008; см. *AbNum*; доступную по адресу <http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>), системе AbM (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>; Martin et al., 1989), системе Contact (<http://bioinf.org.uk/abs/>; MacCallum et al., 1996) и системе IMGT (Lefranc et al., 2003; <http://www.imgt.org>), которые направлены на устранение недостатков определения по Kabat. Определение Kabat представляет собой наиболее общеупотребительный способ прогнозирования доменов CDR, несмотря то, что он был разработан, когда структурная информация о Ab не была доступной.

Если не указано конкретно, и если контекст не указывает на иное, CDR, представленные в настоящем описании, идентифицированы с использованием определения по Kabat. Аминокислотные последовательности 6 доменов CDR, определенных способом Kabat, а также аминокислотные последовательности  $V_H$ ,  $V_L$ , тяжелой цепи и легкой цепи mAb 16B13, 14S15, 14S15h, 18Y12, 4A19, 2M18, 15C17, 13T20, 10R3, 8D55, 1V11, 11K16 и 12F27 приведены в таблице 10.

Настоящее изобретение относится к выделенным Ab, предпочтительно - mAb, содержащим следующие домены CDR, определенные способом Kabat:













вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 47; CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 48; CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 49; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 50.

Настоящее изобретение также включает выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающую часть, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, где выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 5, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 17;

(d)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18;

(e)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 7, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 19;

(f)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 8, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 20;

(g)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 9, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 21;

(h)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 22;

(i)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 11, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 23;

(j)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 12, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 24;

(k)а  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 13, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 25;

(l)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

Предпочтительное выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержит:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116; или

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18;

Предпочтительное выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, и содержит  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18.

Ab против CCR8, содержащие области  $V_H$  и  $V_L$ , имеющие аминокислотные последовательности, очень схожие или гомологичные аминокислотным последовательностям любых из указанных выше Ab против CCR8 и сохраняющих функциональные свойства этих Ab, также подходят для использования в способах по настоящему изобретению. Например, подходящие Ab включают mAb, содержащие область  $V_H$  и/или  $V_L$ , каждая из которых содержит последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6 и/или 18, соответственно. В дополнительных вариантах осуществления, например, аминокислотные последовательности  $V_H$  и/или  $V_L$  демонстрируют по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичности в отношении последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 6 и/или 18, соответственно. В рамках изобретения процент идентичности последовательности между двумя аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, относительно длины сравниваемых последовательностей (т.е.  $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество сравниваемых положений}} \times 100$ ) с учетом количества каких-либо пропусков и длины каждого такого пропуска, встроенного для максимизации степени идентичности последовательности между двумя последовательностями. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с использованием математических алгоритмов, хорошо известных специалистам в этой области.

Если описаны Ab против CCR8, содержащие области  $V_H$  и  $V_L$ , имеющие аминокислотные последовательности, очень схожие или гомологичные аминокислотным последовательностям любым из указанных выше Ab против CCR8 и сохраняющие функциональные свойства этих Ab, они могут иметь 100% идентичности в по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или всех 6 CDR и по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичности в отношении родственной полной последовательности  $V_H$  и/или  $V_L$ .

Например, выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, может содержать:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной последовательности, приведенной как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся

по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной последовательности, приведенной как SEQ ID NO: 16, необязательно, где  $V_H$  содержит по меньшей мере 1, 2 или все 3 из CDR, как определено для SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 33-35), и  $V_H$  содержит по меньшей мере 1, 2, или все 3 из CDR, как определено для SEQ ID NO: 16 (SEQ ID NO: 36-38);

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной последовательности, приведенной как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной последовательности, приведенной как SEQ ID NO: 116, необязательно, где  $V_H$  содержит по меньшей мере 1, 2 или все 3 CDR, как определено для SEQ ID NO: 115 (SEQ ID NO: 103-105), и  $V_L$  содержит по меньшей мере 1, 2 или все 3 из CDR, как определено для SEQ ID NO: 116 (SEQ ID NO: 106-108); или

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной последовательности, приведенной как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной последовательности, приведенной как SEQ ID NO: 18, необязательно, где  $V_H$  содержит по меньшей мере 1, 2 или все 3 из CDR, как определено для SEQ ID NO: 6 (SEQ ID NO: 45-47), и  $V_L$  содержит по меньшей мере 1, 2 или все 3 из CDR, как определено для SEQ ID NO: 18 (SEQ ID NO: 48-50).

Аналогично, в случае любого из других выделенных Ab, упомянутых в настоящем описании, Ab может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной референсной последовательности  $V_H$ , и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, являющуюся по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% идентичной референсной последовательности  $V_H$ , необязательно, где  $V_H$  содержит по меньшей мере 1, 2 или все 3 из CDR, как определено для референсной последовательности  $V_H$ , и  $V_L$  содержит по меньшей мере 1, 2, или все 3 из CDR, как определено для референсной последовательности  $V_L$ .

Настоящее изобретение дополнительно включает выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающую часть, необязательно специфически связывающуюся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, где выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 99, и легкую цепь,

содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 111;

(b) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 112;

(c) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 113;

(d) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114;

(e) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 117, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 118; или

(f) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 110, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 119.

Предпочтительным является выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, необязательно, специфически связывающееся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, где выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 112;

(b) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 117, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 118; или

(c) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114.

Предпочтительным является выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, необязательно, специфически связывающееся с hCCR8,



экспрессирующимся на поверхности клетки, где выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть содержит:

(а) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab против CCR8 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению является Ab человека или его фрагментом. В других вариантах осуществления оно является гуманизированным Ab или его фрагментом. В дополнительных вариантах осуществления оно является химерным Ab или его фрагментом. В других вариантах осуществления выделенное Ab против CCR8 или его антигенсвязывающая часть является Ab мыши или его фрагментом. В случае введения людям Ab, предпочтительно, являются химерными Ab или, более предпочтительно, гуманизированными или человеческими Ab. Такие химерные, гуманизированные, человеческие или мышинные mAb можно получать и выделять способами, хорошо известными в этой области.

Ab против CCR8, представленные в настоящем описании, также включают антигенсвязывающие фрагменты, способные опосредовать ADCC, в дополнение к полноразмерным Ab.

#### *Иммуноконъюгаты против CCR8*

В другом аспекте настоящее изобретение относится к любому из выделенных Ab против hCCR8, представленным в настоящем описании, или его антигенсвязывающей части, связанному с цитолитическим средством, таким как цитотоксин или радиоактивный изотоп. Такие конъюгаты обозначают в настоящем описании как "иммуноконъюгаты". Цитотоксины можно конъюгировать с Ab по изобретению с использованием линкерной технологии, доступной в этой области. Способы получения радиоиммуноконъюгатов также известны в этой области.

#### *Биспецифические молекулы*

В другом аспекте настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, содержащим любое из выделенных mAb против hCCR8, представленных в настоящем описании, или его антигенсвязывающую часть, связанное со связывающим доменом, имеющим иную специфичность связывания, чем mAb против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть. Связывающий домен может являться функциональной молекулой, например, другим Ab, антигенсвязывающей частью Ab или лигандом для рецептора), таким образом, что полученная биспецифическая молекула связывается по меньшей мере с двумя разными участками связывания или молекулами-мишенями.

*Нуклеиновые кислоты, кодирующие mAb против hCCR8, и их использование для экспрессии Ab*

Другой аспект настоящего изобретения относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любые из выделенных Ab против hCCR8 по изобретению. Настоящее

изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей любые из mAb против CCR8 или их антигенсвязывающих частей, представленных в настоящем описании.

Термин "выделенная" нуклеиновая кислота относится к составу нуклеиновой кислоты, значительно отличающемуся, т.е. имеющему иную химическую идентичность, природу и пригодность, чем нуклеиновые кислоты в том виде, в котором они существуют в природе. Например, выделенная ДНК, в отличие от нативной ДНК, является отдельной частью нативной ДНК, а не неотъемлемой частью более крупного структурного комплекса, хромосомы, обнаруживаемого в природе. Кроме того, выделенная ДНК, в отличие от нативной ДНК, можно использовать в качестве праймера для ПЦР или зонда для гибридизации, в частности, для измерения экспрессии генов и детекции биомаркерных генов или мутаций для диагностики заболеваний или прогнозирования эффективности терапевтического средства. Выделенную нуклеиновую кислоту также можно очищать таким образом, что она, по существу, не содержит другие клеточные компоненты или другие загрязнения, например, другие клеточные нуклеиновые кислоты или белки, стандартными способами, хорошо известными в этой области.

Нуклеиновые кислоты по изобретению можно получать стандартными способами молекулярной биологии. В случае Ab, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными из трансгенных мышей, несущими гены Ig человека как описано в примере 8), кДНК, кодирующую легкие и тяжелые цепи или переменные области Ab, полученные посредством гибридомы, можно получать стандартными способами ПЦР-амплификации. После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, эти фрагменты ДНК можно подвергать дополнительным манипуляциям стандартными способами рекомбинантной ДНК, например, для превращения ДНК переменной области в полноразмерные гены цепей Ab, в гены Fab-фрагмент или гены scFv. В случае Ab, полученных из библиотеки генов Ig (например, с использованием способов фагового дисплея), нуклеиновые кислоты, кодирующие Ab, можно выделять из библиотеки.

Нуклеиновая кислота по изобретению может являться, например, РНК или ДНК, такой как кДНК или геномная ДНК. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновая кислота является кДНК.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующему вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую mAb против CCR8 или его антигенсвязывающую часть. Настоящее изобретение дополнительно относится к клетке-хозяину, содержащему указанный экспрессирующий вектор. Эукариотические клетки, и наиболее предпочтительно - клетки-хозяева млекопитающих, являются предпочтительными в качестве клеток-хозяев для экспрессии Ab, т.к. такие эукариотические клетки, и в частности, клетки млекопитающих, вероятнее, чем прокариотические клетки, будут собирать и секретировать правильно свернутые и иммунологически активные Ab. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для

экспрессии рекомбинантных Ab по изобретению включают клетки китайского хомяка (CHO) (Kaufman and Sharp, 1982), миеломные клетки NSO, клетки COS и клетки SP2.

Клетку-хозяина можно использовать в способе получения mAb против CCR8 или его антигенсвязывающей части, где способ включает экспрессию mAb или его антигенсвязывающей части в клетке-хозяине и выделение mAb или его антигенсвязывающей части из клетки-хозяина. Клетку-хозяина можно использовать *ex vivo* или *in vivo*. ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи Ab, можно встраивать в отдельные экспрессирующие векторы или, более типично, в один и тот же вектор. Сегменты  $V_H$  и  $V_L$  Ab можно использовать для получения полноразмерных Ab любого изотипа посредством встраивания ДНК, кодирующей эти переменные области, в экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и легкой цепи желаемого изотипа таким образом, что сегмент  $V_H$  функционально связан с сегментами  $C_H$  в векторе, и сегмент  $V_L$  функционально связан с сегментом  $C_L$  в векторе. Линии клеток, в которых отсутствует фермент  $\alpha$ -(1,6)-фукозилтрансфераза (FUT8), можно использовать для продуцирования mAb, в которых отсутствует фукоза в их углеводах (см., например, патентную публикацию США № 2004/0110704; Yamane-Ohnuki et al., 2004; EP 1176195).

Другой аспект настоящего изобретения относится к трансгенной мышь, содержащей трансгены тяжелой и легкой цепи Ig человека, где мышь экспрессирует любые из HuMAb против CCR8, представленных в настоящем описании. Изобретение также относится к гибридоме, полученной из указанной мышь, где гибридома продуцирует HuMAb.

#### *Способы с использованием терапевтических антител против CCR8*

Т.к. Ab против hCCR8, полученные в настоящем исследовании, не связываются с mCCR8, mAb мышь против mCCR8 использовали в качестве суррогата для человеческих или гуманизированных nf mAb IgG1 против hCCR8 для тестирования эффективности Ab против CCR8 в качестве противоопухолевого лекарственного средства в моделях опухолей на мышах. Выбор подходящего изотипа Ab можно использовать для повышения CCR8-опосредованного истощения опухолевых  $T_{reg}$  посредством ADCC/ADCP у мышей, которое, как показано, регулируется, главным образом, взаимодействием Ab с  $Fc\gamma RIV^+$  клетками (Nimmerjahn et al., 2010), в избытке находящимися в опухолях мышей (Simpson et al., 2013). mAb против mCCR8, имеющее изотип IgG2a мышь, обозначенное как mIgG2a против CCR8, использовали в качестве суррогата для гуманизированных или человеческих mAb против hCCR8, которые, вероятно, будут использовать в качестве терапевтических средств для людей. mIgG2a против CCR8 получают из коммерческого mAb крысы против mCCR8, поставляемого BioLegend как клон SA214G2, модифицированного для изменения изотипа IgG2b крысы в изотип IgG2a мышь. Подобно mAb человека против hCCR8, A419 и 14S15, mIgG2a против CCR8 является N-концевым связывающим средством, и его остов mIgG2a обеспечивает максимальное связывание  $Fc\gamma R$  для регуляции ответа ADCC аналогично nf-формату человека.

Показано, что mIgG2a против CCR8 имеет высокий потенциал ADCC (пример 18), аналогично высокому потенциалу ADCC нескольких тестовых mAb против hCCR (пример 17), и к блокированию связывания mCCL1 с mCCR8-экспрессирующими клетками (пример 16), хоть и с более низкой активностью, чем несколько тестовых mAb против hCCR8, блокирующих связывание hCCL1 с hCCR8-экспрессирующими клетками (пример 15). mAb против hCCR8 также демонстрируют мощную активность ADCC (примеры 19 и 20). mIgG2a против CCR8 также связывается с mCCR8-экспрессирующими клетками с более низкой аффинностью, чем некоторые из описанных mAb против hCCR8 (пример 13). Это позволяет предполагать, что mIgG2a против CCR8 является подходящим суррогатом для mAb против hCCR8 в прямых исследованиях ингибирования роста опухоли в моделях на мышах, хотя Ab против hCCR8 могут являться даже более мощными в ингибировании роста опухоли у людей, учитывая их высокоаффинное связывание с их когнатной мишенью hCCR8, более высокую активность в блокировании связывания лиганда CCL1 с CCR8 и более высокий потенциал ADCC.

Различные сингенные модели опухолей на мышах использовали для определения противоопухолевой активности суррогатных mAb мыши mIgG2a против CCR8 в отдельности и в комбинации с антителом против PD-1. Опосредованное mAb mIgG2a против CCR8 истощение  $T_{reg}$  и последующие провоспалительные ответы (повышения CD8, CD4, интерферона- $\gamma$ , гранзима B и Ki67) индуцировали устойчивое ингибирование роста опухоли с высокой процентной долей полного клиренса опухоли в качестве отдельного средства в иммуногенных моделях опухолей на мышах, включая модели аденокарциномы толстого кишечника CT26 и MC38 и модель фибросаркомы SA1N (см. примеры 23-26 и 29), и в комбинации с антителом против PD-1 в резистентных к иммунотерапии моделях, MB49 и 4T1. В отличие от этого, лечение с помощью CCR8-mIgG1-D265A, вариантом Ab, содержащим Fc-инертную тяжелую цепь mIgG1-D265A (Baudino et al., 2008), имело минимальные эффекты в отношении регрессирования опухоли (примеры 29 и 30). Для определения того, имеет ли место дозозависимая взаимосвязь между истощением  $T_{reg}$  и противоопухолевой эффективностью после лечения Ab против CCR8, осуществляли исследование монотерапией однократной дозой в модели MC38 и наблюдали дозозависимую взаимосвязь фармакокинетики/фармакодинамики/эффективности (пример 26). Кроме того, наблюдали повышенные и титруемые изменения лиганда CCL1 в опухолевых супернатантах после истощения (данные не представлены), что может служить в качестве суррогатного биомаркера.

В карциноме мочевого пузыря мыши MB49 mIgG2a против CCR8 демонстрировало лишь частичную противоопухолевую активность, хотя она была выше, чем активность mAb против PD-1 (пример 27). Аналогично, в модели рака молочной железы мыши 4T1 mIgG2a против CCR8 также демонстрировало лишь частичную противоопухолевую активность, но эта опухоль являлась полностью резистентной к лечению mAb против PD-1 (пример 28). В обеих моделях опухолей, mIgG2a против CCR8 потенцирует иммунный

ответ, индуцируемый антителом против PD-1, что приводит к поразительному повышению мощности противоопухолевого ответа. Комбинация двух Ab является синергической в отношении выраженного ингибирования роста опухоли в этих модулях резистентных опухолей. В настоящем описании Ab считают взаимодействующими синергически, если противоопухолевая эффективность комбинации этих Ab больше суммы противоопухолевой эффективности, демонстрируемой каждым Ab в отдельности.

Также показано специфическое в отношении опухолевых T<sub>reg</sub> истощение в моделях эксплантатов опухолей человека после лечения с помощью mAb 14S15, 16B13 и 4A19 (пример 20).

*Лечение злокачественных новообразований с помощью mAb против CCR8 в виде монотерапии*

Данные, представленные в настоящем описании, свидетельствуют о получении mAb против hCCR8, связывающихся с hCCR8 на поверхности активированных T<sub>reg</sub>-клеток с высокой аффинностью (EC<sub>50</sub>=приблизительно 0,1-2 нМ; пример 11), индуцирующих мощное уничтожение T<sub>reg</sub>-клеток посредством в системе ADCC in vitro, в которой первичные активированные T<sub>reg</sub>-клетки человека сокультивируют с аллогенными активированными NK-клетками (EC<sub>50</sub>=приблизительно 10-60 пМ; пример 19), и специфически опосредующих истощение CCR8<sup>+</sup> инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клеток в эксплантате опухоли человека и моделях мыши (примеры 20, 22 и 24). Эти mAb демонстрируют устойчивое ингибирование роста опухоли в разных иммуногенных и резистентных к иммунотерапии моделях опухолей на мышах (примеры 23, 25, 27-29), и данные убедительно подтверждают клиническую оценку истощения CCR8 в виде монотерапии или в комбинации с блокадой иммунных контрольных точек в качестве новой иммунотерапии злокачественных новообразований.

Таким образом, как подтверждается данными, приведенными в примерах, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества любого из T<sub>reg</sub>-истощающих Ab против CCR8, например, mAb, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, представленных в настоящем описании, или фармацевтической композиции, содержащей любое из указанных Ab, например, mAb против CCR8, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, таким образом, что индивидуума подвергают лечению.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества любого из T<sub>reg</sub>-истощающих Ab против CCR8, например, mAb, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, представленных в настоящем описании, или фармацевтической композиции, содержащей любое из указанных Ab против CCR8, например, mAb, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, таким образом, что ингибируют рост опухолевых клеток у индивидуума.

*Лечение злокачественного новообразования с помощью Аб против CCR8 в комбинации с другим противоопухолевым средством*

Настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества: (а) любого из  $T_{reg}$ -истощающих Аб против CCR8, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, представленных в настоящем описании, или фармацевтической композиции, содержащей любое из указанных Аб против CCR8, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул; и (b) дополнительное терапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования, необязательно, где дополнительное терапевтическое средство является соединением, снижающим ингибирование или повышающим стимуляцию иммунной системы, таким образом, что индивидуума подвергают лечению.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества: (а) любого из  $T_{reg}$ -истощающих Аб против CCR8, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, представленных в настоящем описании, или фармацевтической композиции, содержащей любое из указанных Аб против CCR8, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул; и (b) дополнительного терапевтического средства для лечения злокачественного новообразования. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является соединением, снижающим ингибирование или повышающим стимуляцию иммунной системы, таким образом, что ингибируют рост опухолевых клеток у индивидуума.

В других предпочтительных вариантах осуществления любого из способов по настоящему изобретению индивидуум является пациентом-человеком.

$T_{reg}$ -опосредованная иммуносупрессия потенциально является серьезным препятствием для оптимальных противоопухолевых иммунных ответов в иммуноонкологии. Многие из молекул, нацеленных с помощью противоопухолевой иммунотерапии, такие как PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 и TIGIT, подвергаются положительной регуляции на  $T_{reg}$ -клетках (Kumar et al., 2018). Таким образом, эти основанные на Т-клетках способы иммунотерапии также обладают потенциалом к повышению ответов  $T_{reg}$ . Например, блокада PD-1 может повышать супрессию  $T_{reg}$  и повышать пролиферацию  $T_{reg}$  (Kamada et al., 2019), и существуют доказательства экспансии  $T_{reg}$  после терапии против CTLA-4 в клинических условиях (Kavanagh et al., 2008). Таким образом,  $T_{reg}$ -истощающее средство не только улучшает противоопухолевые ответы в виде монотерапии, но также повышает активности других способов иммунотерапии, как представлено в настоящем описании (см. примеры 27 и 28). Таким образом, настоящее изобретение относится к способу потенцирования противоопухолевого иммунного ответа, вызванного терапевтическим средством у индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, где терапевтическое

средство является иммунотерапевтическим средством, таким как противоопухолевые иммунотерапевтические средства, такие как антитело, специфически связывающиеся с PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 или TIGIT.

В моделях опухолей на мышах мощную комбинированную противоопухолевую активность наблюдали у мышей, которым вводили mIgG2a против CCR8 и антитело против PD-1 (примеры 27 и 28). Несмотря на схожие повышения доли CD8<sup>+</sup> Т-клеток при монотерапии антителом против CCR8 и при комбинированном лечении, антитело против PD-1 может потребоваться для усиления эффекторной функциональности. Кроме того, показано, что лечение против CCR8 приводит к долговременной, антиген-специфической CD8<sup>+</sup> Т-клеточной памяти (пример 31). Эти результаты имеют важное клиническое значение для лечения злокачественных новообразований на поздней стадии, у которых зачастую развивается резистентность к способам терапии против PD1/PD-L1 (Jenkins et al., 2018), и которые демонстрируют высокие коэффициенты рецидивирования (Mahvi et al., 2018). В целом, эти исследования подчеркивают специфичность и поражаемость CCR8 на опухолевых T<sub>reg</sub> и подтверждают оценку истощающих Ab против CCR8 при лечении солидных опухолей на поздних стадиях в виде монотерапии или в комбинации с другой иммунотерапией, такой как антитела против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению дополнительное терапевтическое средство является соединением, снижающим ингибирование иммунной системы. Например, дополнительное терапевтическое средство может являться низкомолекулярным соединением, макроциклическим пептидом, слитым белком или Ab, например, mAb. В дополнительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является антагонистическим средством, таким как антагонистическое mAb, специфически связывающееся с белком программируемой гибели клетки-1 (PD-1), лигандом белка программируемой гибели клетки-1 (PD-L1), антигеном цитотоксических Т-лимфоцитов-4 (CTLA-4), белком гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3), В- и Т-лимфоцитарным аттенюатором (BTLA), белком 3, содержащим домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), иммуноглобулин-подобным рецептором естественных киллеров (KIR), лектин-подобным рецептором G1 естественных киллеров (KLRG-1), рецептором аденозина A2a (A2aR), Т-клеточным иммунорецептором с доменами Ig и ITIM (TIGIT), V-доменным иммуноглобулиновым супрессором активации Т-клеток (VISTA), протоонкогеном тирозин-протеинкиназой MER (MerTK), рецептором естественных киллеров 2B4 (CD244) или CD160.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является антагонистическим Ab или его антигенсвязывающей частью, специфически связывающимся с PD-1. В дополнительных вариантах осуществления Ab, специфически связывающееся с PD-1, выбрано из ниволумаба, пембролизумаба, цемиплимаба, спартализумаба, камрелизумаба, синтилимаба, тислелизумаба, торипалимаба, достарлимаба, ретифанлимаба и пимивалимаба, например,

выбрано из ниволумаба, пембролизумаба, цемиплимаба, спартализумаба, камрелизумаба, синтилимаба, тислелизумаба и, например, торипалимаба, например, выбрано из ниволумаба и пембролизумаба.

В других предпочтительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является антагонистическим Ab или его антигенсвязывающей частью, специфически связывающимся с PD-L1. В дополнительных вариантах осуществления Ab, специфически связывающееся с PD-L1, выбрано из атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, энвафолимаба, BMS-936559, CK-301, CS-1001, SHR-1316, CBT-502, BGB-A333 и KN035, например выбрано из атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, энвафолимаба, BMS-936559, CK-301, CS-1001, SHR-1316, CBT-502, BGB-A333, например, выбрано из атезолизумаба, дурвалумаба и авелумаба.

В других предпочтительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является антагонистическим Ab или его антигенсвязывающей частью, специфически связывающимся с CTLA-4. В дополнительных вариантах осуществления Ab, специфически связывающееся с CTLA-4, является ипилимумабом или тремелимумабом, например, выбрано из ипилимумаба.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу потенцирования противоопухолевого иммунного ответа, вызванного терапевтическим средством у индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества любого из  $T_{reg}$ -источающих Ab против CCR8, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, представленных в настоящем описании, или фармацевтической композиции, содержащей любое из указанных Ab против CCR8, иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, таким образом, что индивидуум имеет более сильный иммунный ответ против злокачественного новообразования по сравнению с иммунным ответом, вызванным терапевтическим средством в отдельности. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления этого способа терапевтическое средство является ингибитором контрольных точек, например, mAb против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления этого способа терапевтическое средство является Ab против PD-1 ниволумабом. В других предпочтительных вариантах осуществления терапевтическое средство является Ab против PD-1 пембролизумабом. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления терапевтическое средство является Ab против PD-L1 атезолизумабом. В других предпочтительных вариантах осуществления терапевтическое средство является Ab против PD-L1 дурвалумабом. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления терапевтическое средство является Ab против PD-L1 авелумабом. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления этого способа терапевтическое средство является Ab против CTLA-4 ипилимумабом. В некоторых других вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой лучевую терапию.



*Злокачественные новообразования, которые можно лечить способами по изобретению*

Иммуноонкология, основанная на использовании практически бесконечной гибкости иммунной системы для атаки и разрушения злокачественных клеток, подходит для лечения очень широкого диапазона злокачественных новообразований (см., например, Yao et al., 2013; Callahan et al., 2016; Pianko et al., 2017; Farkona et al., 2016; Kamta et al., 2017). Например, показано, что Ab против PD-1, ниволумаб эффективен при лечении многих разных типов злокачественных новообразований (см., например, Brahmer et al., 2015; Guo et al., 2017; Pianko et al., 2017; WO 2013/173223) и в настоящее время проходит клинические испытания на многих солидных злокачественных новообразованиях и гемобластозах. Таким образом, способы по изобретению, в которых используют CCR8-опосредованное истощение инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клеток в виде монотерапии или в комбинации с другой иммунотерапией, такой как ингибирование иммунных контрольных точек, можно использовать для лечения широкого спектра солидных опухолей и гемобластозов.

*Широкий спектр злокачественных новообразований, поддающихся лечению*

Т.к. Ab, используемые в способах лечения злокачественных новообразований, представленных в настоящем описании, не нацелены на злокачественные клетки напрямую, но, вместо этого, нацеливают и усиливают иммунную систему посредством истощения иммуносупрессорных  $T_{reg}$ -клеток, необязательно в комбинации с ингибированием иммунных контрольных точек, что помогает иммунной системе атаковать и разрушать злокачественные клетки, эти Ab можно использовать для лечения широкого диапазона злокачественных новообразований. Эффективность ниволумаба в лечении разнообразных злокачественных новообразований уже показана, о чем свидетельствует одобрение этого лекарственного средства для лечения меланомы на поздней стадии, немелкоклеточного рака легких на поздней стадии, метастатической почечноклеточной карциномы, классической лимфомы Ходжкина, плоскоклеточной карциномы головы и шеи на поздней стадии, метастатической уротелиальной карциномы, метастатического колоректального рака с MSI-H или dMMR, печеночноклеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких и плоскоклеточной карциномы пищевода (Drugs.com - Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>), при этом продолжаются клинические испытания на многих других злокачественных новообразованиях. Аналогично, лекарственные средства против PD-L1, такие как атезолизумаб (TECENTRIQ®), дурвалумаб (IMFINZI®) и авелумаб (BAVENCIO®), получили одобрение для разных показаний. Таким образом, широкий спектр разных злокачественных новообразований можно лечить с использованием Ab против CCR8 и, необязательно, комбинации Ab против CCR8 и против PD-1/PD-L1. Высокая эффективность, показанная для этой комбинации терапевтических средств, позволяет сфокусироваться на злокачественных новообразованиях, представляющих собой значительную неудовлетворенную потребность в области медицины.

В некоторых вариантах осуществления способы терапии злокачественных новообразований по изобретению можно широко использовать для лечения злокачественного новообразования, представляющего собой солидную опухоль. Например, в некоторых вариантах осуществления солидная опухоль является злокачественным новообразованием, выбранным из плоскоклеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких (SCLC), немелкоклеточного рака легких (NSCLC), плоскоклеточного NSCLC, неплоскоклеточного NSCLC, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, рака тонкого кишечника, рака печени, печеночноклеточной карциномы (HCC), рака поджелудочной железы (PAC), рака почки, почечноклеточной карциномы (RCC), рака мочевого пузыря, рака мочеиспускательного канала, рака мочеточника, колоректального рака (CRC), рака толстого кишечника, карциномы толстого кишечника, рака анального канала, рака эндометрия, рака предстательной железы, фибросаркомы, нейробластомы, глиомы, глиобластомы, герминомы, саркомы детского возраста, синоназальной лимфомы с фенотипом естественного киллера, меланомы, рака кожи, злокачественного новообразования костной ткани, рака шейки матки, рака матки, карциномы эндометрия, карциномы фаллопиевых труб, рака яичников, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, рака яичка, злокачественного новообразования эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака парашитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака полового члена, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли спинного мозга, злокачественного новообразования головного мозга, глиомы ствола мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, солидных опухолей детского возраста, злокачественных новообразований, вызванных факторами окружающей среды, связанных с вирусами злокачественных новообразований, злокачественных новообразований вирусного происхождения, злокачественного новообразования на поздней стадии, нерезектабельного злокачественного новообразования, метастатического злокачественного новообразования, рефрактерного злокачественного новообразования, рецидивирующего злокачественного новообразования и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является злокачественным новообразованием на поздней стадии, нерезектабельным, метастатическим, рефрактерным злокачественным новообразованием и/или рецидивирующим злокачественным новообразованием.

Учитывая продемонстрированное эффективное лечение различных злокачественных новообразований с использованием антител против CCR8 в модели на мышцах (примеры 23-29), ожидают, что некоторые типы опухолей будут особенно восприимчивы к лечению с помощью Ab против CCR8. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления солидная опухоль является злокачественным новообразованием, выбранным из аденокарциномы толстого кишечника, карциномы

мочевого пузыря, карциномы молочной железы и фибросаркомы. Данные о том, что антитело против CCR8 является эффективным в уменьшении размеров опухолей в моделях на мышах, в которых антитело против PD-1 демонстрирует небольшую эффективность, таких как модель рака молочного пузыря MB49 (пример 27) и модель рака молочной железы 4T1 (пример 28) позволяет предполагать, что антитело против CCR8 может обладать очень широкой пригодностью и иметь более широкую эффективность, чем антитело против PD-1, при лечении злокачественных новообразований, и комбинация антитела против CCR8 с блокадой контрольных точек, например, антителом против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4 может обладать даже более широкой пригодностью для лечения разнообразных злокачественных новообразований.

Анализ секвенирования РНК отдельных клеток осуществляли на опухолях человека для анализа дифференциальной экспрессии генов CCR8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клеток (пример 32). Относительно высокая экспрессия CCR8 и CD8A и их высокое соотношение CCR8/CD8A позволяют идентифицировать плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSC), аденокарциному легких (LUAD), аденокарциному желудка (STAD), плоскоклеточную карциному легких (LUSC), аденокарциному поджелудочной железы (PAAD), аденокарциному прямой кишки (READ), карциному пищевода (ESCA), инвазивную карциному молочной железы (BRCA), аденокарциному толстого кишечника (COAD) и плоскоклеточную карциному шейки матки и эндоцервикальную аденокарциному (CESC) в качестве типов опухолей, которые, как ожидают, будут особенно восприимчивыми к лечению с помощью Ab против CCR8. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления солидная опухоль является злокачественным новообразованием, выбранным из HNSC, LUAD, STAD, LUSC, PAAD, READ, ESCA, BRCA, COAD, CESC, фолликулярной лимфомой, острого лимфоцитарного лейкоза и лимфомы в качестве типов опухолей, которые, как ожидают, будут особенно восприимчивыми к лечению с помощью Ab против CCR8.

Обнаружено, что экспрессия CCR8, анализируемая на 17 типах или подтипах опухолей посредством ИHC на фиксированных формалином, погруженных в парафин (FFPE) образцах ткани, встречается в избытке на плоскоклеточной карциноме головы и шеи (HNSCC; также обозначаемой в настоящем описании как плоскоклеточная карцинома головы и шеи [SCCHN]) и менее распространена при мультиформной глиобластоме (GBM; пример 33). Учитывая, что опухоли экспрессирующие высокие уровни CCR8, более вероятно ответят на лечение с помощью Ab против CCR8, эти данные профилирования опухоли подтверждают приоритизацию HNSCC, рака шейки матки, CRC, немелкоклеточного рака-плоскоклеточной карциномы легких (NSCLC-SCC), NSCLC-аденокарциномы (NSCLC-ADC), рака поджелудочной железы, рака желудка, рака мочевого пузыря и рака молочной железы для терапии против CCR8. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления солидная опухоль является злокачественным новообразованием, выбранным из HNSCC, рака шейки матки, CRC, NSCLC-SCC, NSCLC-

ADC, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака мочевого пузыря и рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления способы терапии по изобретению можно использовать для лечения злокачественного новообразования, являющегося гемобластом. Гемобласты включают опухоли жидких тканей, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, т.е. миелоидной линии клеток (продуцирующей гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидной линии клеток (продуцирующей В-, Т-, NK-клетки и плазматические клетки), включая все типы лейкозов, лимфом и миелом. Гемобласты, которые можно лечить способами терапии по изобретению, включают, например, злокачественные новообразования, выбранные из острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина (HL), неходжкинских лимфом (NHL), множественной миеломы, вялотекущей миеломы, моноклональной гаммапатии неясного генеза (MGUS), гемобластов на поздней стадии, метастатических, рефрактерных и/или рецидивирующих гемобластов и любых комбинаций указанных гемобластов.

Анализ TARGET (Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments, <https://ocg.cancer.gov/programs/target>) также показал, что среди исследуемых гемобластов, фолликулярная лимфома, острый лимфоцитарный лейкоз и лимфома, как обнаружено, имеют наибольшую относительную экспрессию CCR8, и их следует приоритизировать для лечения с помощью mAb против CCR8 (пример 32). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления терапевтических способов по изобретению гемобласт представляет собой фолликулярную лимфому или острый лимфоцитарный лейкоз и лимфому.

В некоторых других вариантах осуществления гемобласт является злокачественным новообразованием, выбранным из острых, хронических, лимфоцитарных (лимфобластных) и/или миелогенных лейкозов, таких как ALL, AML, CLL и CML; лимфом, таких как HL, NHL, из которых приблизительно 85% являются В-клеточными лимфомами, включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому (FL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому клеток мантийной зоны, В-клеточные лимфомы клеток краевой зоны (лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), узловую В-клеточную лимфому краевой зоны и В-клеточную лимфому краевой зоны селезенки), лимфому Беркитта, лимфоплазмацитоидную лимфому (LPL; также известную как макроглобулинемию Вальденстрема (WM)), волосатоклеточную лимфому и первичную лимфому центральной нервной системы (ЦНС), NHL, являющиеся Т-клеточными лимфомами, включая Т-лимфобластную лимфому/лейкоз из клеток-предшественников, Т-лимфобластную лимфому/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферические Т-клеточные лимфомы, такие как кожная Т-клеточная лимфома (CTLC, т.е. фунгоидный микоз, синдром Сезари и др.), Т-

клеточную лимфому/лейкоз взрослых, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, внеузловую NK-/Т-клеточную лимфому назального типа, кишечную Т-клеточную лимфому, ассоциированную с энтеропатией (EATL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL) и периферическую Т-клеточную лимфому неясного генеза, острую миелоидную лимфому, лимфоплазматическую лимфому, моноцитическую В-клеточную лимфому, ангиоцентрическую лимфому, кишечную Т-клеточную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение, острую гистиоцитарную лимфому, первичную эффузионную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), иммунобластную крупноклеточную лимфому и В-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников; миелом, таких как множественная миелома, вялотекущая миелома (также называемая "тлеющей" миеломой), моноклональная гаммапатия неясного генеза (MGUS), солитарная плазматическая, IgG-миелома, миелома легких цепей, несекреторная миелома и амилоидоз; и любые комбинации указанных гемобластозов.

В дополнительных вариантах осуществления гемобластоз выбран из острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), Т-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина (HL), неходжкинских лимфом (NHL), множественной миеломы, вялотекущей миеломы, моноклональной гаммапатии неясного генеза (MGUS), гемобластозов на поздней стадии, метастатических, рефрактерных и/или рецидивирующих гемобластозов и любых комбинаций указанных гемобластозов.

Способы по настоящему изобретению также можно использовать для лечения гемобластозов на поздней стадии, метастатических, рефрактерных и/или рецидивирующих гемобластозов.

Для клинического испытания антитела против CCR8 в лечении злокачественного новообразования (пример 34) некоторые солидные опухоли выбирали на основе результатов разных доклинических исследований, упомянутых выше: показанная эффективность антитела против CCR8 в моделях опухолей на мышах (примеры 23-29); экспрессия РНК CCR8 и CD8A в 33 типах опухолей, представленных в Атласе ракового генома (National Cancer Institute, 2021), позволяющие идентифицировать типы опухолей, имеющие относительно высокую экспрессию CCR8 и обогащение экспрессии CD8A (пример 32); и уровни экспрессии CCR8 в 17 типах или подтипах опухолей, что измеряли посредством ИHC (пример 33). Выбранными типами опухолей являются NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, аденокарцинома желудка гастроэзофагеального перехода (GE) и рак шейки матки (плоскоклеточная карцинома [SCC] или аденокарцинома). Хотя для опухолей на поздней стадии доступны ограниченные данные, этот выбор подтверждается высокими уровнями экспрессии CCR8 или наличием T<sub>reg</sub>-клеток, коррелирующими с плохим прогнозом при NSCLC, CRC, раке желудка и раке шейки матки (Shah et al., 2011; Yi et al., 2018; Zhao et al., 2016; Tao et al., 2012; Xu et al., 2020). Сообщения о прогнозе при SCCHN являются мешанными, вероятно, частично из-за разных способов и молекулярных

маркеров, используемых для детекции наличия  $T_{reg}$ -клеток (Saleh et al., 2020). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способов лечения злокачественного новообразования по изобретению солидная опухоль является злокачественным новообразованием, выбранным из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального перехода и рака шейки матки. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления солидная опухоль является NSCLC. В других предпочтительных вариантах осуществления солидная опухоль является SCCHN. В других предпочтительных вариантах осуществления солидная опухоль является MSS-CRC. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления солидная опухоль является раком желудка/гастроэзофагеального перехода. В других предпочтительных вариантах осуществления солидная опухоль является раком шейки матки.

*Медицинское применение Ab против CCR8 и против PD-1/против PD-L1*

Настоящее изобретение также относится к выделенному Ab против CCR8, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части для применения в способе лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием. Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному Ab против CCR8, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей части и ингибитору контрольных точек, такому как выделенное Ab против PD-1/против PD-L1, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть, для применения в комбинации в способе лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающем двойное истощение  $T_{reg}$  и блокаду пути контрольных точек, например, пути передачи сигнала PD-1/PD-L1. Ab против CCR8 можно использовать в качестве монотерапии или в комбинации с ингибитором контрольных точек, таким как Ab против PD-1/против PD-L1, для лечения полного диапазона злокачественных новообразований, представленных в настоящем описании.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к применению выделенного Ab против CCR8 или его антигенсвязывающей части по изобретению для получения лекарственного средства для лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием. Ab против CCR8 можно использовать в отдельности или в комбинации с ингибитором контрольных точек, таким как выделенное Ab против PD-1/против PD-L1 или его антигенсвязывающая часть, для получения лекарственного средства для лечения пациента со злокачественным новообразованием. Применение любых таких Ab против CCR8 и Ab против PD-1/против PD-L1 для получения лекарственных средств можно широко использовать для полного диапазона злокачественных новообразований, представленных в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к Ab против CCR8 или его антигенсвязывающей части в комбинации с ингибитором контрольных точек, таким как выделенное Ab против PD-1/против PD-L1 или его антигенсвязывающая часть, для применения в способах лечения злокачественных новообразований, соответствующих

всем вариантам осуществления способов лечения с использованием этой комбинации терапевтических средств, представленных в настоящем описании.

*Аb против CCR8, подходящие для использования в терапевтических способах по изобретению*

Аb против CCR8, подходящее для использования в способах по изобретению, является выделенным Аb, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающей частью, специфически связывающимся с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с высокой специфичностью и аффинностью и опосредующим истощение CCR8-экспрессирующей клетки посредством ADCC. Такое Аb демонстрирует одно или более свойств, важных для терапевтической эффективности. В частности, выделенное Аb или его антигенсвязывающая часть демонстрирует по меньшей мере одно из следующих свойств:

(а) специфически связывается с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с  $EC_{50}$  приблизительно 20 нМ или менее, предпочтительно - приблизительно 2 нМ или менее, предпочтительно - приблизительно 1 нМ или менее;

(b) специфически связывается с редкими и рассеянными иммунными клетками в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, но, например, не связывается с тканью головного мозга, мозжечка, сердца, печени, легких, почки, миндалина, селезенки, тимуса, толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, надпочечника, гипофиза, кожи, периферического нерва, яичка или матки или PBMC человека. Например, mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть могут специфически связываться с инфильтрирующими опухоль  $T_{reg}$ -клетками, но не связываются с PBMC, например, не демонстрируют цитоплазматического окрашивания в фиксированных PBMC. Отсутствие связывания Аb с указанным выше списком клеток и тканей можно определять, например, посредством осуществления стандартного окрашивания с помощью подходящих Аb, например, способами, описанными в примере 14, например, на фиксированных образцах ткани;

(c) ингибирует связывание CCL1 с CCR8 и ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с  $IC_{50}$  приблизительно 5 нМ или менее;

(d) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 100 пМ или менее, предпочтительно - приблизительно 60 пМ или менее, предпочтительно - приблизительно 40 пМ или менее, более предпочтительно - приблизительно 13 пМ или менее, более предпочтительно - 10 пМ или менее;

(e) при связывании с CCR8 на поверхности клетки не вызывает интернализацию CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно сшивающего Аb;

(f) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в виде монотерапии; и

(g) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования, необязательно, где дополнительное терапевтическое

средство является ингибитором иммунных контрольных точек, необязательно, где ингибитор контрольных точек является Ab против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть демонстрирует по меньшей мере 2 или 3, предпочтительно - 4, 5 или 6 из указанных выше свойств. В более предпочтительных вариантах осуществления выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть демонстрирует все из указанных выше свойств. Например, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть:

(a) специфически связывается с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с  $EC_{50}$  приблизительно 20 нМ или менее, предпочтительно - приблизительно 2 нМ или менее, предпочтительно - приблизительно 1 нМ или менее;

(b) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 100 пМ или менее, приблизительно - 60 пМ или менее, предпочтительно - приблизительно 40 пМ или менее, более предпочтительно - приблизительно 13 пМ или менее, более предпочтительно - 10 пМ или менее;

(c) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в виде монотерапии; и

(d) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования, необязательно, где дополнительное терапевтическое средство является ингибитором контрольных точек.

В других предпочтительных вариантах осуществления выделенное Ab или его антигенсвязывающая часть:

(a) специфически связывается с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с  $EC_{50}$  приблизительно 2 нМ или менее;

(b) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 40 пМ или менее; и

(c) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования, необязательно, где дополнительное терапевтическое средство является Ab против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab, например, mAb, или его антигенсвязывающая часть, демонстрирующие одно или более, вплоть до всех, из указанных выше функциональных свойств, дополнительно связывается с эпитопом, локализованным в N-концевом домене hCCR8 с  $K_D$  приблизительно 10 нМ или менее, где эпитоп содержит пептид, имеющий последовательность  $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$  (SEQ ID NO: 2) и сульфатированные остатки tyr-15 и/или tyr-17. В некоторых других вариантах осуществления выделенное Ab, например, mAb, или его антигенсвязывающая часть, демонстрирующее одно или более, вплоть до всех, из указанных выше функциональных



свойств, дополнительно связывается с эпитопом, локализованным в N-концевом домене CCR8 человека с  $K_D$  приблизительно 10 нМ или менее, где эпитоп содержит пептид, имеющий последовательность  $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$  (SEQ ID NO: 109) и сульфатированные остатки tyr-15 и tyr-17.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть может иметь указанные выше свойства и/или содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16. Например, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать следующие CDR, определенные способом Kabat: CDR1 вариательной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 33; CDR2 вариательной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 34; CDR3 вариательной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 35; CDR1 вариательной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 36; CDR2 вариательной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 37; и CDR3 вариательной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 38. В качестве другого примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16. В качестве дополнительного примера, такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 112. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть может иметь указанные выше свойства и/или содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116. Например, такое Ab или его

антигенсвязывающая часть может содержать следующие CDR, определенные способом Kabat: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 103; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 104; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 105; CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 106; CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 107; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 108. В качестве другого примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116. В качестве дополнительного примера, такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 117, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 118. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть может иметь указанные выше свойства и/или содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18. Например, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 45; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 46; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 47; CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 48; CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную

как SEQ ID NO: 49; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 50. В другом примере такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18. В дополнительном примере такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

#### *Комбинированное лечение*

CCR8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетки человека также коэкспрессируют PD-1 на высоких уровнях (данные не представлены). Лечение с помощью mAb против PD-1 может активировать PD-1<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетки, что потенциально объясняет гиперпрогрессирование или первичную резистентность у пациентов с раком желудка, подвергнутых лечению ниволумабом (Kamada et al., 2019). Таким образом, истощение T<sub>reg</sub>, вероятно, улучшает общие частоты ответов на терапию против PD-1. Эта комбинация также напрямую поддержана доклиническими исследованиями на мышах, где синергические эффекты антитела против CCR8 с антителом против PD-1 наблюдали в моделях опухолей MB49 и 4T-1 (примеры 27 и 28).

Хотя эффективность комбинированного лечения с помощью Ab против CCR8 и ингибитора контрольных точек показана в настоящем описании с использованием Ab против PD-1, определено несколько других костимуляторных и ингибиторных рецепторов и лигандов, регулирующих Т-клеточные ответы. Примеры стимуляторных рецепторов включают индуцибельный Т-клеточный костимулятор (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD27, глюкокортикоид-индуцируемый TNFR-родственный белок (GITR) и медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), в то время как примеры ингибиторных рецепторов, в дополнение к PD-1/PD-L1, включают белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), В- и Т-лимфоцитарный аттенюатор (BTLA), белок 3, содержащий домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), белок гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3), иммуноглобулин-подобный рецептор естественных киллеров (KIR), рецептор аденозина A2a (A2aR), лектин-подобный рецептор G1 естественных киллеров (KLRG-1), рецептор естественных киллеров 2B4 (CD244), CD160, Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT) и рецептор для V-доменного иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток (VISTA) (Mellman et al., 2011; Pardoll, 2012; Baitsch et al., 2012). Эти рецепторы и их лиганды представляют собой мишени для терапевтических средств, созданных для стимуляции,

или предотвращения супрессии, иммунного ответа таким образом, чтобы атаковать опухолевые клетки (Weber, 2010; Mellman et al., 2011; Pardoll, 2012). На стимуляторные рецепторы или лиганды рецепторов нацелены агонистические средства, в то время как на ингибиторные рецепторы или лиганды рецепторов нацелены блокирующие средства. Т.к. многие из иммунных контрольных точек иницируются лиганд-рецепторными взаимодействиями, их легко можно блокировать с помощью Ab или модулировать с помощью рекомбинантных форм лигандов или рецепторов. Один или более из костимуляторных и ингибиторных рецепторов и лигандов, регулирующих Т-клеточные ответы, иные, чем PD-1/PD-L1, могут представлять собой мишени для синергического эффекта с Ab против CCR8, представленными в настоящем описании, для ингибирования роста опухоли. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab против CCR8 комбинируют с Ab против CTLA-4. В других вариантах осуществления Ab против CCR8 комбинируют с Ab против LAG-3.

Лучевая терапия приводит к повышению инфильтрации  $T_{reg}$  после лечения в моделях на мышах (Muroyama et al., 2017) и на людях (неопубликованные данные). Повышенная инфильтрация  $T_{reg}$  может приводить к нежелательной супрессии противоопухолевого иммунитета, и CCR8-опосредованное истощение может потенцировать эффективность лучевой терапии.

Настоящее изобретение относится к mAb против CCR8, эффективным в потенцировании иммунного ответа посредством повышения противоопухолевой эффективности лечения, такого как ингибирование иммунных контрольных точек или лучевая терапия, и демонстрирующим по меньшей мере одну, несколько или все из следующих желаемых характеристик: (a) специфическое связывание с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с  $EC_{50}$  приблизительно 1 нМ или менее; (b) специфическое связывание с редкими и рассеянными иммунными клетками в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, но, например, отсутствие связывания с тканью головного мозга, мозжечка, сердца, печени, легких, почки, миндалин, селезенки, тимуса, толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, надпочечника, гипофиза, кожи, периферического нерва, яичка или матки или PBMC человека. Например, mAb против CCR8 или его антигенсвязывающая часть может специфически связываться с инфильтрирующими опухоль  $T_{reg}$ -клетками но не связывающимися с PBMC, например, недемонстрирующими цитоплазматическое окрашивание на фиксированных PBMC. Отсутствие связывания Ab с перечисленными выше клетками и тканями можно определять, например, посредством осуществления стандартного окрашивания с помощью подходящих Ab, например, способами, описанными в примере 14, например, на фиксированных образцах тканей; (c) ингибирование связывания CCL1 с CCR8 и ингибирование передачи сигнала CCR8/CCL1 с  $IC_{50}$  приблизительно 5 нМ или менее; (d) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредование истощения клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 50 пМ или менее; (e) при связывании с CCR8 на поверхности клетки отсутствие вызывания интернализации CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно

сшивающего Ab; (f) ингибирование роста опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в виде монотерапии; и (g) ингибирование роста опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования, необязательно, где дополнительное терапевтическое средство является Ab против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

Некоторые mAb против CCR8, которые можно использовать в терапевтических способах, композициях или наборах, представленных в настоящем описании, включают mAb, специфически связывающиеся с hCCR8 на поверхности клетки с высокой аффинностью, опосредуют истощение клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 10 пМ или менее и демонстрируют по меньшей мере два других, и предпочтительно все, из предшествующих свойств. В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть может иметь по меньшей мере одно из указанных выше свойств и/или содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16. Например, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать следующие CDR, определенные способом Kabat: CDR1  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 33; CDR2  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 34; CDR3  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 35; CDR1  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 36; CDR2  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 37; и CDR3  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 38. В другом примере такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16. В дополнительном примере такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 112. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть может иметь по меньшей мере одно из указанных

выше свойств и/или содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116. Например, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать следующие CDR, определенные способом Kabat: CDR1  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 103; CDR2  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 104; CDR3  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 105; CDR1  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 106; CDR2  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 107; и CDR3  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 108. В качестве другого примера, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116. В качестве дополнительного примера, такое Ab может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 117, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 118. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab, предпочтительно - mAb, или его антигенсвязывающая часть может иметь по меньшей мере одно из указанных выше свойств и/или содержать домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18. Например, такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать следующие CDR, определенные способом Kabat: CDR1  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 45; CDR2  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 46; CDR3  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 47; CDR1  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 48; CDR2  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 49; и CDR3  $V_L$ , содержащую

последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 50. В другом примере такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18. В дополнительном примере такое Ab или его антигенсвязывающая часть может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114. Необязательно, Ab имеет сниженное фукозилирование своей тяжелой цепи или гипофукозилированную или нефукозилированную константную область тяжелой цепи, как представлено где-либо в настоящем описании.

*Ab против PD-1/против PD-L1, подходящие для использования в терапевтических способах по изобретению*

Ab против PD-1, подходящие для использования в способах лечения злокачественных опухолей, композициях или наборах, представленных в настоящем описании, включают выделенные Ab, предпочтительно - mAb, или их антигенсвязывающие части, связывающиеся с PD-1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокирующие связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1 и ингибирующие иммуносупрессорный эффект пути передачи сигнала PD-1. Аналогично, Ab против PD-L1, подходящие для использования в этих способах, представляют собой выделенные Ab, предпочтительно - mAb, или их антигенсвязывающие части, связывающиеся с PD-L1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокирующие связывание PD-L1 с PD-1 и CD80 (B7-1) и ингибирующие иммуносупрессорный эффект пути передачи сигнала PD-1. В любом из терапевтических способов, представленных в настоящем описании, Ab против PD-1 или против PD-L1 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, связывающийся с рецептором PD-1 или лигандом PD-L1, соответственно, и демонстрирующий функциональные свойства, схожие с таковыми у целых Ab в ингибировании связывания рецептор-лиганд и реверсирования ингибирования активности Т-клеток, таким образом, положительно регулируя иммунный ответ.

*mAb против PD-1*

mAb, специфически связывающиеся с PD-1 с высокой аффинностью, описаны в патенте США № 8008449. Другие mAb против PD-1 описаны, например, в патентах США №№ 7488802, 8168757, 8354509 и 9205148. Показано, что mAb против PD-1, описанное в патенте США № 8008449, демонстрирует несколько или все из следующих характеристик: (a) связывание с PD-1 человека с  $K_D$  приблизительно 50 нМ или менее, что определяют с помощью системы биосенсоров для SPR (BIAcore®); (b) по существу, отсутствие связывания с CD28, CTLA-4 или ICOS человека; (c) повышение Т-пролиферации клеток, продукции интерферона- $\gamma$  и секреции ИЛ-2 в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (d) связывание с PD-1 человека и PD-1 яванского макака; (e)

ингибирование связывания PD-L1 и PD-L2 с PD-1; (f) разрешение ингибирования, накладываемого T<sub>reg</sub>-клетками на пролиферацию и продукцию интерферона- $\gamma$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клетками; (g) стимуляцию антиген-специфических анамнестических ответов; (h) стимуляцию Ab-ответов; и (i) ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo*. АВ против PD-1, которые можно использовать в способах лечения, композициях или наборах по изобретению, включают mAb, специфически связывающиеся с PD-1 человека с высокой аффинностью и демонстрирующие по меньшей мере пять, и предпочтительно все, из предшествующих характеристик. Например, Ab против PD-1, подходящее для использования в терапевтических способах, представленных в настоящем описании, (a) связывается с PD-1 человека с K<sub>D</sub> приблизительно от 10 нМ до 0,1 нМ, что определяют посредством SPR (BIAcore®); (b) повышает пролиферацию Т-клеток, продукцию интерферона- $\gamma$  и секрецию ИЛ-2 в анализе MLR; (c) ингибирует связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1; (d) реверсирует ингибирование, накладываемое T<sub>reg</sub>-клетками на пролиферацию и продукцию интерферона- $\gamma$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клетками; (e) стимулирует антиген-специфические анамнестические ответы; и (f) ингибирует рост опухолевых клеток *in vivo*.

Другие mAb против PD-1 описаны, например, в патентах США №№ 6808710, 7488802, 8168757 и 8354509, патентной публикации США № 2016/0272708 и публикациях РСТ №№ WO 2008/156712, WO 2012/145493, WO 2014/179664, WO 2014/194302, WO 2014/206107, WO 2015/035606, WO 2015/085847, WO 2015/112800, WO 2015/112900, WO 2016/106159, WO 2016/197367, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2017/024465, WO 2017/024515, WO 2017/025016, WO 2017/025051, WO 2017/040790, WO 2017/106061, WO 2017/123557, WO 2017/132827, WO 2017/133540, описание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления mAb против PD-1 выбран из группы, состоящей из ниволумаба (OPDIVO®; ранее обозначаемого как 5C4, BMS-936558, MDX-1106, или ONO-4538), пембролизумаба (KEYTRUDA®; ранее обозначаемого как ламбролизумаб и MK-3475; см. WO 2008/156712A1), PDR001 (см. WO 2015/112900), MEDI-0680 (ранее обозначаемого как AMP-514; см. WO 2012/145493), REGN-2810 (см. WO 2015/112800), JS001 (см. Liu and Wu, 2017), BGB-A317 (см. WO 2015/035606 и US 2015/0079109), INCSHR1210 (SHR-1210; см. WO 2015/085847; Liu and Wu, 2017), TSR-042 (ANB011; см. WO 2014/179664), GLS-010 (WBP3055; см. Liu and Wu, 2017), AM-0001 (см. WO 2017/123557), STI-1110 (см. WO 2014/194302), AGEN2034 (см. WO 2017/040790) и MGD013 (см. WO 2017/106061).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления любых из терапевтических способов, представленных в настоящем описании, включающих введение Ab против PD-1, Ab против PD-1 является ниволумабом (OPDIVO®), уже одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения множества различных злокачественных новообразований. Ниволумаб является полностью человеческим IgG4 (S228P) Ab-



ингибитором иммунных контрольных точек PD-1, селективно предотвращающим взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и PD-L2), таким образом, блокирующим отрицательную регуляцию функций противоопухолевых Т-клеток (описанным как mAb C5 в патенте США № 8008449; Wang et al., 2014). В других предпочтительных вариантах осуществления Ab против PD-1 является пембролизумабом (KEYTRUDA®; гуманизированным моноклональным Ab IgG4 против PD-1, описанным как h409A11 в патенте США № 8354509), также одобренным для множества различных злокачественных новообразований.

Ab против PD-1, которые можно использовать в способах, композициях или наборах по изобретению, также включают выделенные Ab, предпочтительно - mAb, специфически связывающиеся с PD-1 человека (hPD-1) и перекрестно конкурирующие за связывание с PD-1 человека с любым из Ab против PD-1, представленных в настоящем описании, например: ниволумабом (5C4; см., например, патент США № 8008449; WO 2013/173223) и пембролизумабом. Ab, перекрестно конкурирующие с референсным Ab, например, ниволумабом или пембролизумабом, за связывание с антигеном, в этом случае - PD-1 человека, легко можно идентифицировать в стандартных анализах связывания PD-1, таких как анализ BIACORE®, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223). В некоторых вариантах осуществления Ab против PD-1 связывается с тем же эпитопом, что и любое из Ab против PD-1, представленных в настоящем описании, например, ниволумаб или пембролизумаб.

Ab против PD-1, которое можно использовать в способах по изобретению, также включает антигенсвязывающую часть, включая Fab-, F(ab')<sub>2</sub>-, Fd- или Fv-фрагмент, sdAb, scFv, di-scFv или би-scFv, диатело, минитело или выделенную CDR (см. Hollinger and Hudson, 2005; Olafsen and Wu, 2010, более подробно).

В некоторых вариантах осуществления выделенное Ab против PD-1 или его антигенсвязывающая часть содержит константную область тяжелой цепи, принадлежащую изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Ab против PD-1 или его антигенсвязывающая часть содержит константную область тяжелой цепи, принадлежащую изотипу IgG4 человека. В других вариантах осуществления против Ab PD-1 или его антигенсвязывающая часть принадлежит изотипу IgG1 человека. В некоторых других вариантах осуществления константная область тяжелой цепи IgG4 Ab против PD-1 или его антигенсвязывающая часть содержит мутацию S228P (пронумерованную с использованием системы Kabat; Kabat et al., 1983), где остаток серина в шарнирной области замен остатком пролина, в норме обнаруживаемом в соответствующем положении в Ab изотипа IgG1. Эта мутация, присутствующая в ниволумабе, предотвращает обмен плеч Fab с эндогенными Ab IgG4 при сохранении низкой аффинности к активирующим рецепторам Fc, ассоциированной с Ab IgG4 дикого типа (Wang et al., 2014). В других вариантах осуществления Ab содержит константную область легкой цепи, являющуюся константной областью каппа или лямбда человека.

В других вариантах осуществления способов по изобретению Ab против PD-1 или его антигенсвязывающая часть представляет собой mAb или его антигенсвязывающую часть. В случае введения людям Ab против PD-1, предпочтительно, является химерным Ab или, более предпочтительно - гуманизированным или человеческим Ab. Такие химерные, гуманизированные или человеческие mAb можно получать и выделять способами, хорошо известными в этой области, например, как описано в патенте США № 8008449.

#### *mAb против PD-L1*

Т.к. антитела против PD-1 и против PD-L1 нацелены на один и тот же путь передачи сигнала и, как показано в клинических испытаниях, демонстрируют сравнимые уровни эффективности при различных злокачественных новообразованиях (см., например, Brahmer et al., 2012; WO 2013/173223), Ab против PD-L1 можно заменять Ab против PD-1 в способах комбинированного лечения, представленных в настоящем описании.

Ab против PD-L1, подходящие для использования в способах, композициях или наборах по изобретению, представляют собой выделенные Ab, связывающиеся с PD-L1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокирующие связывание PD-L1 с PD-1 и CD80 и ингибирующие иммуносупрессорный эффект пути передачи сигнала PD-1. mAb, специфически связывающиеся с PD-L1 с высокой аффинностью, описаны в патенте США № 7943743. Другие mAb против PD-L1 описаны, например, в патентах США №№ 8217149, 8779108, 9175082 и 9624298 и публикации PCT № WO 2012/145493. Показано, что HuMAb против PD-1, описанные в патенте США № 7943743, демонстрируют одну или более из следующих характеристик: (a) связывание с PD-1 человека с  $K_D$  приблизительно 50 мМ или менее, что определяют посредством SPR (BIAcore®); (b) повышение пролиферации Т-клеток, продукции интерферона- $\gamma$  и секреции ИЛ-2 в анализе MLR; (c) стимуляцию Ab-ответов; (d) ингибирование связывания PD-L1 с PD-1; и (e) реверсирование супрессорного эффекта  $T_{reg}$ -клеток в отношении эффекторных Т-клеток и/или дендритных клеток. Ab против PD-L1 для использования в терапевтических способах, представленных в настоящем описании, включают выделенные Ab, предпочтительно - mAb, специфически связывающиеся с PD-L1 человека с высокой аффинностью и демонстрируют по меньшей мере одно, в некоторых вариантах осуществления - по меньшей мере три, и предпочтительно все, из предыдущих характеристик. Например, Ab против PD-L1, подходящее для использования в этих способах (a) связывается с PD-1 человека с  $K_D$  приблизительно от 50 мМ до 0,1 мМ, что определяют посредством поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®); (b) повышает пролиферацию Т-клеток, продукцию интерферона- $\gamma$  и секрецию ИЛ-2 в анализе MLR; (c) ингибирует связывание PD-L1 с PD-1 и CD80; и (d) реверсирует супрессорный эффект  $T_{reg}$ -клеток в отношении эффекторных Т-клеток и/или дендритных клеток.

Подходящее Ab против PD-L1 для использования в способах по изобретению представляет собой BMS-936559 (ранее известное как MDX-1105; обозначенное как 12A4 в патенте США № 7943743). Другие подходящие Ab против PD-L1 включают

атезолизумаб (TECENTRIQ®; ранее известный как RG7446 и MPDL3280A; обозначенный как YW243.55S70 в патенте США № 8217149; см., также, Herbst et al., 2014), дурвалумаб (IMFINZI®; ранее известный как MEDI-4736; обозначенный как 2.14H9OPT в патенте США № 8779108), авелумаб (BAVENCIO®; ранее известный как MSB-0010718C; обозначенный как A09-246-2 в патенте США № 9624298), STI-A1014 (обозначенный как H6 в патенте США № 9175082), CX-072 (см. WO 2016/149201), KN035 (см. Zhang et al., 2017), LY3300054 (см., например, WO 2017/034916) и СК-301 (см. Gorelik et al., 2017).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления любых из терапевтических способов, представленных в настоящем описании, включающих введение Ab против PD-L1, Ab против PD-L1 представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ®). В других предпочтительных вариантах осуществления Ab против PD-L1 представляет собой дурвалумаб (IMFINZI®). В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления Ab против PD-L1 представляет собой авелумаб (BAVENCIO®).

Ab против PD-L1, подходящие для использования в способах, композициях или наборах по изобретению, также включают выделенные Ab, специфически связывающиеся с PD-L1 человека и перекрестно конкурирующие за связывание с PD-L1 человека с референсным Ab, которое может являться одним из Ab против PD-L1, представленных в настоящем описании, например, BMS-936559 (12A4; см., например, патент США № 7943743; WO 2013/173223), атезолизумабом, дурвалумабом, авелумабом или STI-A1014. Способность Ab перекрестно конкурировать с референсным Ab за связывание с PD-L1 человека свидетельствует о том, что такое Ab связывается с той же областью эпитопа PD-L1, что и референсное Ab, и ожидают, что оно будет иметь функциональные свойства, очень схожие с референсным Ab в силу своего связывания с, по существу, той же областью эпитопа PD-L1. В некоторых вариантах осуществления Ab против PD-L1 связывается тем же эпитопом, что и любые из Ab против PD-L1, представленных в настоящем описании, например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб или STI-A1014. Перекрестно конкурирующие Ab легко можно идентифицировать по их способности перекрестно конкурировать с референсным Ab, таким как атезолизумаб или авелумаб, в стандартных анализах связывания PD-L1, таких как анализ BIACORE®, анализы ELISA или проточная цитометрия, хорошо известные специалистам в этой области (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления выделенные Ab против PD-L1 для использования в способах по изобретению являются mAb. В других вариантах осуществления, особенно в случае введения людям, эти Ab, предпочтительно, представляют собой химерные Ab, или более предпочтительно - гуманизированные или человеческие Ab. Химерные, гуманизированные и человеческие Ab можно получать и выделять способами, хорошо известными в этой области, например, как описано в патенте США № 7943743.

В некоторых вариантах осуществления Ab против PD-L1 или его антигенсвязывающая часть содержит константную область тяжелой цепи,

принадлежащую изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых других вариантах осуществления против Ab PD-L1 или его антигенсвязывающая часть принадлежит изотипу IgG1 или IgG4 человека. В дополнительных вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи IgG4 Ab против PD-L1 или его антигенсвязывающей части содержит мутацию S228P. В других вариантах осуществления Ab содержит константную область легкой цепи, являющуюся константной областью каппа или лямбда человека.

Ab против PD-L1 по изобретению также включают антигенсвязывающие части указанных выше Ab, включая Fab-, F(ab')<sub>2</sub>-, Fd-, Fv- и scFv-, ди-scFv- или би-scFv- и scFv-Fc-фрагменты, нанотела, диатела, триатела, тетратела и выделенные CDR, связывающиеся с PD-L1 и демонстрирующие функциональные свойства, схожие с целыми Ab в ингибировании связывания рецептора и положительной регуляции иммунной системы.

#### *Фармацевтические композиции и режимы дозирования*

mAb, представленные в настоящем описании и используемые в любых из описанных терапевтических способов, можно составлять в композиции, например, фармацевтической композиции, содержащей Ab и фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим любые из описанных иммуноконъюгатов или биспецифическую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель. В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т.п., являющиеся физиологически совместимыми. Предпочтительно, носитель для композиции, содержащей Ab, подходит для внутривенного (IV), внутримышечного, подкожного (SC), парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии).

Возможность SC инъекции основана на технологии доставки лекарственных средств ENHANZE® от Halozyme Therapeutics, включающей совместное составление Ab, например, mAb, с рекомбинантным ферментом гиалуронидазой человека (rHuPH20), устраняющие общепринятые ограничения в отношении объема биологических средств и лекарственных средств, которые можно вводить подкожно благодаря внеклеточного матриксу (патент США № 7767429). Можно совместно составлять два Ab, используемых в комбинированном лечении, в одной композиции для введения SC.

Фармацевтическая композиция по изобретению может включать одну или более фармацевтически приемлемых солей, антиоксидантов, водных и неводных носителей и/или вспомогательных средств, таких как консерванты, увлажнители, эмульгаторы и диспергирующие средства.

Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа, например, максимального терапевтического ответа и/или минимальных нежелательных явлений. В случае введения Ab против CCR8, против PD-1 или против PD-L1 или его антигенсвязывающей части, включая комбинированное использование, доза

может находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг, предпочтительно - от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела индивидуума. Например, дозы могут составлять приблизительно 0,1, 0,3, 1, 2, 3, 5 или 10 мг/кг массы тела, и более предпочтительно - приблизительно 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг массы тела. Альтернативно, можно вводить фиксированную или базовую дозу, например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 2000 мг, предпочтительно - от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мг, такую как приблизительно 0,3, 1, 3, 5, 10, 30, 60, 100, 150, 200, 240, 300, 400, 500, 600, 800 или 1000 мг Ab или его антигенсвязывающей части вместо дозы в расчете на массу тела. Базовая (без расчета по массе тела) доза является привлекательной из-за простоты подготовки, сниженного риска лекарственных ошибок и наблюдения того, что для большинства биологических средств подходы с двумя дозами действуют аналогично (Wang et al., 2009).

Режим введения, как правило, планируют для достижения воздействия, приводящего к устойчивой занятости рецепторов (RO) с учетом типичных фармакокинетических свойств Ab. Пример схемы лечения включает введение один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в месяц, один раз в 3-6 месяцев или более. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Ab против CCR8, против PD-1 или против PD-L1 или его антигенсвязывающую часть вводят индивидууму один раз в 2 недели. В других предпочтительных вариантах осуществления Ab или его антигенсвязывающую часть вводят один раз в 3 недели или один раз в 4 недели. Дозу и режим можно изменять во время курса лечения. Начальную базовую дозу, впервые используемую на человеке (FII), 0,3 мг (4 мкг/кг) IV Q2W для 4A19, получали с использованием совокупности данных из смешения фармакологических и токсикологических подходов с целью обеспечения адекватной безопасности при минимизации воздействия на участников потенциально субэффективных доз и риска высвобождения цитокинов.

В клиническом испытании, описанном в примере 34, совокупность данных, полученных при смешении фармакологических и токсикологических подходов, использовали для определения дозы, используемой в клиническом исследовании впервые на человеке (FII). В фазе повышения дозы в группе монотерапии антителом против CCR8 базовую дозу 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 или 800 мг 4A19 вводят индивидууму внутривенно (IV) один раз в 2 недели (Q2W). В группе комбинированного лечения те же дозы 4A19 вводят в фазу повышения дозы в комбинации с ниволумабом, вводимым IV в одобренной FDA базовой дозе 480 мг один раз в 4 недели (Q4W). Для расширения выборки получающих дозу несравнимые и рандомизированные когорты открывают для включения разных типов опухолей и уровней доз из фазы повышения дозы, при этом лечение в виде монотерапии или комбинированного лечения продолжают до прогрессирования, неприемлемой токсичности, отзыва согласия, завершения 26 циклов исследуемой терапии (104 недели) или окончания исследования, в зависимости от того, что произойдет первым.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления описанных способов терапии Ab против CCR8 вводят индивидууму в виде монотерапии или в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек, например, Ab против PD-1 или против PD-L1, в базовой дозе от приблизительно 0,3 до приблизительно 800 мг Q2W. Более конкретно, в некоторых вариантах осуществления Ab против CCR8 вводят в дозе 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 или 800 мг Q2W. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Ab против CCR8 является mAb 4A19. В других предпочтительных вариантах осуществления Ab против CCR8 является mAb 14S5 или 14S15h. В некоторых вариантах осуществления Ab против CCR8 вводят индивидууму в базовой дозе 3 мг Q2W. В некоторых других вариантах осуществления Ab против CCR8 вводят в дозе 10 мг Q2W. В других вариантах осуществления Ab против CCR8 вводят в базовой дозе 30 мг Q2W. В других вариантах осуществления Ab против CR8 вводят индивидууму в базовой дозе 100 мг Q2W.

В случае комбинированного лечения в некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является Ab против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Ab против PD-1 является ниволумабом. В предпочтительных вариантах осуществления ниволумаб вводят индивидууму в базовой дозе 480 мг Q4W.

При использовании в комбинациях можно использовать субтерапевтическую дозу одного или обоих Ab, например, дозу Ab против CCR8, против PD-1 и/или против PD-L1 или их антигенсвязывающей части. В рамках изобретения термин "субтерапевтическая" доза или дозировка терапевтического средства, такого как терапевтическое Ab, относится к дозе ниже типичной или одобренной дозы для монотерапии. Например, дозу ниволумаба ниже исходно одобренной FDA 3 мг/кг каждые 2 недели, например, 1,0 мг/кг или менее каждые 2, 3 или 4 недели, считают субтерапевтической дозой. Затем ниволумаб был одобрен FDA в дозе 240 мг каждые две недели или 480 мг каждые 4 недели. Таким образом, например, дозу ниволумаба ниже одобренных 480 мг каждые 4 недели, например, 120 мг или менее каждые 2, 3 или 4 недели, считают субтерапевтической дозой. Данные RO от 15 индивидуумов, которым вводили дозу от 0,3 мг/кг до 10 мг/кг с ниволумабом, свидетельствуют о том, что занятость PD-1, по-видимому, является дозозависимой в этом диапазоне доз. Среди всех доз, средний коэффициент занятости составлял 85% (диапазон от 70% до 97%) со средним плато занятости 72% (диапазон от 59% до 81%) (Brahmer et al., 2010). Таким образом, доза 0,3 мг/кг может сделать возможным воздействие, достаточное, чтобы привести к значительной биологической активности.

В отличие от этого, в рамках изобретения "субэффективная" доза или дозировка терапевтического средства, такого как терапевтическое Ab, относится к дозе ниже дозы, необходимой для значительной биологической активности, и, таким образом, не вызывающей какого-либо значимого терапевтического эффекта при введении в виде монотерапии или комбинированного лечения.

Синергическое взаимодействие, наблюдаемое в моделях опухолей на мышах между Ab против CCR8 и Ab против PD-1/против PD-L1 или их антигенсвязывающими частями, может делать возможным введение одного или обоих этих терапевтических средств пациенту в субтерапевтических дозах. В некоторых вариантах осуществления описанных способов комбинированного лечения Ab против CCR8 или его антигенсвязывающую часть вводят пациенту со злокачественным новообразованием в субтерапевтической дозе. В других вариантах осуществления Ab против PD-1/против PD-L1 или его антигенсвязывающую часть вводят пациенту в субтерапевтической дозе. В дополнительных вариантах осуществления Ab против PD-1/против PD-L1 и каждое из Ab против CCR8 или их антигенсвязывающих частей вводят пациенту в субтерапевтической дозе.

Введение такой субтерапевтической дозы одного или обоих Ab может снижать нежелательные явления по сравнению с использованием более высоких доз отдельных Ab при монотерапии. Таким образом, успех описанных способов комбинированного лечения можно измерять не только в улучшенной эффективности комбинации Ab относительно монотерапии этими Ab, но также в повышенной безопасности, т.е. сниженной частоте нежелательных явлений, благодаря использованию более низких доз лекарственных средств в комбинации относительно доз при монотерапии.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов, представленных в настоящем описании, Ab против CCR8, против PD-1 и/или против PD-L1 составляют для внутривенного (IV) введения или подкожной (SC) инъекции. В некоторых вариантах осуществления Ab против CCR8 или его антигенсвязывающую часть и Ab против PD-1/против PD-L1 или его антигенсвязывающую часть вводят индивидууму последовательно. Термин "последовательное" введение означает, что одно из Ab против CCR8 и против PD-1/против PD-L1 вводят перед другим. Любое Ab можно вводить первым; т.е. в некоторых вариантах осуществления Ab против PD-1/против PD-L1 вводят перед Ab против CCR8, в то время как в других вариантах осуществления Ab против CCR8 вводят перед Ab против PD-1/против PD-L1. В некоторых вариантах осуществления каждое Ab вводят посредством IV инфузии, например, инфузии за период приблизительно 60 минут. В других вариантах осуществления по меньшей мере одно Ab вводят посредством SC инъекции.

В некоторых вариантах осуществления последовательного введения IV для удобства пациента, Ab против CCR8 и против PD-1/против PD-L1 или их части вводят в пределах 30 минут относительно друг друга. Как правило, если и Ab против CCR8, и Ab против PD-1/против PD-L1 необходимо вводить посредством IV введения в один день, используют отдельные инфузионные мешки и фильтры для каждой инфузии. После инфузии первого Ab незамедлительно осуществляют промывку физиологическим раствором для прочистки системы Ab перед началом инфузии второго Ab. В других вариантах осуществления два Ab вводят в пределах 1, 2, 4, 8, 24 или 48 ч. относительно друг друга.

Введение по меньшей мере одного Ab посредством SC введения снижает время медицинского работника, необходимое для введения, и уменьшает время для введения лекарственного средства. Например, использование SC инъекции может сократить время, необходимое для IV введения, как правило, приблизительно 30-60 мин, до приблизительно 5 мин. В некоторых вариантах осуществления последовательного SC введения, Ab против CCR8 и против PD-1/против PD-L1 или их части вводят в пределах 10 мин относительно друг друга.

Т.к. показано, что Ab-ингибиторы контрольных точек приводят к очень длительным ответам, частично благодаря компоненту памяти иммунной системы (см., например, WO 2013/173223; Lipson et al., 2013; Wolchok et al., 2013), активность вводимого Ab против PD-1/против PD-L1 может продолжаться в течение нескольких недель, нескольких месяцев или даже нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления способы комбинированного лечения по изобретению, включающие последовательное введение, включают введение Ab против CCR8 пациенту, которого ранее лечили с помощью Ab против PD-1/против PD-L1. В дополнительных вариантах осуществления Ab против CCR8 вводят пациенту, которого ранее лечили с помощью Ab против PD-1/против PD-L1 и который прогрессировал при этом. В других вариантах осуществления способы комбинированного лечения по изобретению, включающие последовательное введение, включают введение Ab против PD-1/против PD-L1 пациенту, которого ранее лечили с помощью Ab против CCR8, необязательно, пациенту, злокачественное новообразование которого прогрессировало после лечения Ab против CCR8.

В некоторых других вариантах осуществления mAb против PD-1/против PD-L1 и против CCR8 вводят одновременно, смешивая в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом составе для одновременного введения или одновременно в виде отдельных композиций, при этом каждое Ab составляют в фармацевтически приемлемой композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления mAb против PD-1/против PD-L1 и mAb против CCR8 вводят одновременно в виде отдельных композиций, при этом каждое Ab составляют в фармацевтически приемлемой композиции. В других вариантах осуществления mAb против PD-1/против PD-L1 и mAb против CCR8 вводят одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом составе.

Настоящее изобретение относится к гипофукозилированному или нефукозилированному выделенному Ab, предпочтительно - mAb, специфически связывающемуся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, где выделенное Ab содержит тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114, для использования в способе лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, где злокачественное новообразование



выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к гипофукозилированному или нефукозилированному выделенному Ab, предпочтительно - mAb, специфически связывающемуся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, где выделенное Ab содержит тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114, для использования в способ лечения в комбинации с другим терапевтическим средством индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки, и где другое терапевтическое средство является Ab против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

В некоторых других вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к гипофукозилированному или нефукозилированному выделенному Ab, предпочтительно - mAb, специфически связывающемуся с hCCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, где выделенное Ab содержит тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114, для использования в способе лечения в комбинации с другим терапевтическим средством индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки, где другое терапевтическое средство является ниволумабом, и где Ab против CCR8 вводят индивидууму в дозе 1-30 мг один раз в 2 недели и ниволумаб вводят индивидууму в дозе 240 мг один раз в 2 недели или 480 мг один раз в 4 недели.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества гипофукозилированного или нефукозилированного mAb против CCR8, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114, таким образом, что индивидуума подвергают лечению, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способу лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием,

включающему введение индивидууму терапевтически эффективных количеств: (a) гипофукозилированного или нефукозилированного mAb против CCR8, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114; и (b) другого терапевтического средства, таким образом, что индивидуума подвергают лечению, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки, и где другое терапевтическое средство является Ab против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

В некоторых других вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающему введение индивидууму терапевтически эффективных количеств: (a) гипофукозилированного или нефукозилированного mAb против CCR8, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114; и (b) другого терапевтического средства, таким образом, что индивидуума подвергают лечению, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки, где другое терапевтическое средство является ниволумабом, и где Ab против CCR8 вводят индивидууму в дозе 1-30 мг один раз в 2 недели и ниволумаб вводят индивидууму в дозе 240 мг один раз в 2 недели или 480 мг один раз в 4 недели.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества гипофукозилированного или нефукозилированного mAb против CCR8, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114, таким образом, что ингибируют рост опухолевых клеток у индивидуума, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективных количеств: (a) гипофукозилированного или нефукозилированного mAb против CCR8, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные

аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114; и (b) другого терапевтического средства, таким образом, что ингибируют рост опухолевых клеток у индивидуума, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки, и где другое терапевтическое средство является Ab против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

В некоторых других вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективных количеств: (a) гипофукозилированного или нефукозилированного mAb против CCR8, содержащего тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114; и (b) другого терапевтического средства, таким образом, что ингибируют рост опухолевых клеток у индивидуума, где злокачественное новообразование выбрано из NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, рака желудка/гастроэзофагеального (GE) перехода и рака шейки матки, где другое терапевтическое средство является ниволумабом, и где Ab против CCR8 вводят индивидууму в дозе 1-30 мг один раз в 2 недели и ниволумаб вводят индивидууму в дозе 240 мг один раз в 2 недели или 480 мг один раз в 4 недели.

#### *Наборы*

В объем настоящего изобретения также входят наборы, содержащие Ab против CCR8. Как правило, наборы включают ярлык, на котором указано предполагаемое использование содержимого набора и инструкции по использованию. Термин "ярлык" включает любой письменный или записанный материал, поставляемый на наборе или с набором или иным образом сопутствующий набору. Таким образом, настоящее изобретение относится к набору для лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, содержащему: (a) одну или более доз в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, например, приблизительно 0,1 или 1 мг/кг, или фиксированную дозу от приблизительно 0,1 до приблизительно 2000 мг, например, приблизительно 3, 10, 30 или 100 мг, Ab, например, mAb или его антигенсвязывающей части, специфически связывающегося с CCR8 и опосредующего истощение CCR8-экспрессирующей клетки посредством ADCC; (b) необязательно, одну или более доз в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, например, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мг/кг, или фиксированную дозу от приблизительно 200 до приблизительно 1600 мг, например, приблизительно 240 или 480 мг, Ab, например, mAb или его антигенсвязывающей части, специфически связывающегося с PD-1, PD-L1 или CTLA-4; и (c) инструкции по использованию Ab или его части, специфически связывающегося с CCR8, и, необязательно, Ab или его части,

специфически связывающегося с PD-1, PD-L1 или CTLA-4, в любом из терапевтических способов, представленных в настоящем описании.

Настоящее изобретение дополнительно относится к набору для лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, содержащему: (a) одну или более доз в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, например, приблизительно 0,1 или 1 мг/кг, или фиксированную дозу от приблизительно 0,1 до приблизительно 2000 мг, например, приблизительно 3, 10, 30 или 100 мг, Ab, например, mAb или его антигенсвязывающей части, специфически связывающегося с CCR8 и опосредующего истощение CCR8-экспрессирующей клетки посредством ADCC; (b) одну или более доз от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, например, приблизительно 2 или 3 мг/кг, или фиксированную дозу от 200 до приблизительно 1600 мг, например, приблизительно 240 или 480 мг, mAb против PD-1/против PD-L1 или его антигенсвязывающей части; и (c) инструкции по использованию mAb против CCR8 и mAb против PD-1/против PD-L1 в любых из способов комбинированного лечения, представленных в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит одну или более фиксированных доз Ab против CCR8 в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 2000 мг, предпочтительно - от приблизительно 0,3 до приблизительно 1000 мг, таких как приблизительно 0,3, 1, 3, 5, 10, 30, 60, 100, 150, 200, 240, 300, 400, 500, 600, 800 или 1000 мг, Ab или его антигенсвязывающей части вместо дозы в пересчете на массу тела. В некоторых вариантах осуществления набор содержит 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 и 800 мг Ab против CCR8 для введения один раз в 2 недели. В некоторых других вариантах осуществления набор содержит от приблизительно 100 до приблизительно 600 мг Ab против PD-1/PD-L1, например, 240 мг ниволумаба для введения один раз в 2 недели или 480 мг ниволумаба для введения один раз в 4 недели. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Ab против CCR8 является mAb 4A19. В других предпочтительных вариантах осуществления Ab против CCR8 является mAb 14S15 или 14S15h. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Ab против PD-1 является ниволумабом. В других предпочтительных вариантах осуществления Ab против PD-1 является пембролизумабом.

В некоторых вариантах осуществления Ab можно совместно упаковывать в стандартную лекарственную форму. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, в случае лечения пациентов-людей, набор содержит Ab против человек PD-1, представленное в настоящем описании, например, ниволумаб или пембролизумаб.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует истолковывать как ограничивающие. Содержание всех ссылок, процитированных на всем протяжении настоящей заявки, конкретно включено в настоящее описание в качестве ссылки.

#### ПРИМЕР 1

## КОРРЕЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ CCR8 С ЭКСПРЕССИЕЙ FOXP3 В ОПУХОЛЕВЫХ T<sub>reg</sub>-КЛЕТКАХ

### *CCR8 является T<sub>reg</sub>-селективным маркером*

Образцы TCGA (Goldman et al., 2019; Wang and Liu, 2019; скорректированные по партии значения FPKM из репозитория UCSC Xena PanCan Repository) из опухолей негематологического происхождения разделяли на категории опухолей (обозначения TCGA, только опухоль) и данные секвенирования РНК для каждого транскрипта преобразовывали в стандартное распределение (среднее=0, стандартное отклонение=1) в пределах типа опухоли, после чего объединяли все данные о РНК опухолей. Измерения расстояния для взаимных рангов (Siemers et al., 2017; Huttenhower et al., 2007) осуществляли с помощью матрицы корреляции Пирсона для логарифмически преобразованных транскриптов.

С помощью основанной на взаимном ранге сети ген-генной корреляции среди данных секвенирования РНК всех негематологических опухолей TCGA, показанной на фигуре 1А, идентифицировали CCR8 в качестве T<sub>reg</sub>-селективного маркера, т.к. относительное количество транскрипта для CCR8 демонстрировало сильную и селективную корреляцию с FOXP3 при сравнении с другими генами-"соседями" в большинстве типов злокачественных новообразований из TCGA. Примечательно, что костимуляторные/коингибиторные молекулы (CTLA4, ICOS, TIGIT) занимают часть сети в промежутке между FOXP3 и каноническими Т-клеточными маркерами (например, CD3E, IL2RB, SLAMF1). Вес линий и расстояния свидетельствуют о силе ассоциаций взаимных рангов.

*CCR8 селективно экспрессируется на FOXP3<sup>high</sup> лимфоцитах в печеночноклеточной карциноме*

График данных строили, логарифмически как log<sub>2</sub> (счет+1) по Zheng et al. (2017), NCBI Gene Expression Omnibus: GSE98638, и получали графики с помощью пакета программ Fauxflow R/Shiny (<https://github.com/NathanSiemers/FauxFlow>). В каждую точку добавляли небольшое количество гауссового шума для облегчения визуализации.

Как показано на фигуре 1В, CCR8 селективно экспрессируется на FOXP3<sup>high</sup> лимфоцитах в образцах печеночноклеточной карциномы, и наблюдали отсутствие экспрессии CCR8 в популяциях FOXP3<sup>mid</sup> CD8 и CD4 клеток.

### *Ассоциация экспрессии CCR8 с экспрессией других генов*

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовали для FOXP3<sup>+</sup> (экспрессия ≥1) Т-лимфоцитов (экспрессия ≥1) между экспрессией CCR8 ≥1 и экспрессией CCR8 <1, и строили график нескорректированных значений Р по Спирмену против соотношения средней экспрессии генов ассоциированных маркеров.

На фигуре 1С показано, что транскрипты ассоциированы с положительностью и отрицательностью по CCR8, в FOXP3<sup>+</sup> клетках в Zheng et al. (2017). Экспрессия CCR8 ассоциирована с более высокими уровнями экспрессии FOXP3 и канонических маркеров

T<sub>reg</sub>-клеток (IL2RA, IKZF2, BATF), в то время как более низкая экспрессия CCR8 ассоциирована с маркерами цитотоксических Т-клеток (GZMA, CD8A).

## ПРИМЕР 2

### ОБРАБОТКА ТКАНИ

#### *Диссоциация опухолей человека*

Образцы опухоли измельчали с помощью лабораторных ножниц и дополнительно подвергали механической диссоциации с помощью гомогенизатора Даунса или ферментативно расщепляли с использованием набора для диссоциации опухолей человека (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) в комбинации с диссоциатором gentleMACS (Miltenyi Biotec) по инструкциям производителя. Суспензии клеток фильтровали через клеточное сито 70 мкм.

#### *Выделение и стимуляция T<sub>reg</sub> человека*

PBMC выделяли из лейкопака (AllCells) с использованием градиента плотности фикола (GE Healthcare). CD25<sup>+</sup> клетки магнитно обогащали с использованием MicroBeads II против CD25 (Miltenyi Biotec). Обогащенные клетки окрашивали на CD25 (4E3, Miltenyi Biotec), CD127 (A019D5, BioLegend), CD45RA (HI100, BioLegend) и CD4 (SK3, BD Biosciences). CD4<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup> CD45RA<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетки сортировали с помощью BD FACSAria II. Выделенные наивные T<sub>reg</sub>-клетки подвергали экспансии с использованием Dynabeads с T-активаторными CD3/CD28 человека (Thermo Fisher Scientific) (3 бусин на 1 T<sub>reg</sub>) в среде для культивирования клеток Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Corning, Corning, NY) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS; (GE Healthcare, Chicago, IL). Через 3 дня ИЛ-2 (PeproTech) добавляли в количестве 300 ед./мл. T<sub>reg</sub>-клетки подвергали экспансии и криоконсервации. Размороженные T<sub>reg</sub>-клетки рестимулировали с использованием Dynabeads CD3/CD28 (1 бусина на 1 T<sub>reg</sub>) в среде RPMI с 10% FBS и 100 ед./мл ИЛ-2.

#### *Обработка кожи человека*

Биоптаты кожи нормальной кожи из области живота женщины возрастом 43 лет расщепляли в течение ночи в пробирке MACS C (Miltenyi Biotec) с использованием набора для диссоциации целой кожи (Miltenyi Biotec) без фермента Р. Суспензии клеток промывали, фильтровали и окрашивали.

#### *Обработка ткани мышцы*

Опухоли измельчали, а затем ферментативно расщепляли в течение 30 мин при 37°C с использованием 250 ед./мл коллагеназы IV (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) и ДНКазы I (MilliporeSigma, Burlington, MA). Соскобленную кожу измельчали, а затем ферментативно расщепляли в течение 60 мин при 37°C с помощью 500 мкг/мл коллагеназы XI (MilliporeSigma), 500 мкг/мл гиалуронидазы (MilliporeSigma) и 100 мкг/мл ДНКазы I. Селезенку и тимус подвергали механической диссоциации с использованием диссоциатора gentleMACS (Miltenyi Biotec). Эритроциты (RBC) в подвергнутой диссоциации селезенке и образцах крови лизировали раствором аммония-хлорида-калия (Thermo Fisher Scientific) в течение 5 мин.

### *Одобрение исследования*

Образцы опухоли, кожи, селезенки, крови пациента и лейкопак крови здорового человека собирали с помощью коммерческих поставщиков (BioIVT, Westbury, NY; MT Group, Avaden, BioOptions, Discovery Life Sciences, Los Osos, CA; AllCells, Alameda, CA) или Cooperative Human Tissue Network (CHTN). Все образцы собирали от доноров, дававших письменное согласие в одобренных IRB исследовательских центрах в США.

Кровь здоровых доноров получали по программе донорства крови, проводимой Департаментом охраны труда Bristol Myers Squibb (BMS) в соответствии со всеми соответствующими этическими нормами. Все эксперименты на животных соответствовали институциональным руководствам и были одобрены IACUC в BMS по протоколу 1612-01.

### **ПРИМЕР 3**

#### **CCR8 ЯВЛЯЕТСЯ МАРКЕРОМ СУПРЕССОРНЫХ FOXP3<sup>+</sup> КЛЕТОК С НИЗКИМ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ В ОПУХОЛЯХ ЧЕЛОВЕКА**

Профили экспрессии нескольких T<sub>reg</sub>-ассоциированных молекул сравнивали посредством проточной цитометрии.

### *Проточная цитометрия*

Для проточной цитометрии, в основном, суспензии клеток окрашивали аминореактивными красителями для оценки жизнеспособности. Затем клетки человека блокировали сывороткой A/B крысы, мыши и человека (GEMCELL™; GeminiBio, West Sacramento, CA), HUMAN TRUSTAIN FcX™ (BioLegend), и TRUE-STAIN MONOCYTE BLOCKER™ (BioLegend). Клетки мыши блокировали FcR-блокирующим реагентом (Miltenyi Biotec). Клетки поверхностно окрашивали, а внутриклеточное окрашивание осуществляли с использованием набора буферов для окрашивания по фактору транскрипции FOXP3 (Thermo Fisher Scientific) по рекомендациям производителя. Для связывания неконъюгированных mAb использовали соответствующее вторичное Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Образцы анализировали с использованием BD LSRFortessa X-20 и FlowJo (BD Biosciences). Полный список Ab для проточной цитометрии приведен в таблице 2.

Таблица 2: Ab, используемые для проточно-цитометрических анализов

| Мишень | Биологический вид | Клон   | Флуорофор        | Производитель |
|--------|-------------------|--------|------------------|---------------|
| CD45   | Человек           | HI10   | AF488            | Biolegend     |
| CCR4   | Человек           | L291H4 | PE               | Biolegend     |
| CCR4   | Человек           | L291H4 | BV510            | Biolegend     |
| CD16   | Человек           | 3G8    | AF647            | Biolegend     |
| CD8a   | Человек           | SK1    | PerCP-eFluor 710 | Thermo Fisher |
| CD56   | Человек           | CMSSB  | PE-eFluor 610    | Thermo Fisher |

|              |         |           |               |                |
|--------------|---------|-----------|---------------|----------------|
| FOXP3        | Человек | 236A/E7   | PE-Cy7        | Thermo Fisher  |
| CCR8         | Человек | 433H      | BV421         | BD Biosciences |
| CD15         | Человек | W6D3      | BV510         | BD Biosciences |
| CD4          | Человек | SK3       | BV650         | BD Biosciences |
| CD4          | Человек | SK3       | BV605         | BD Biosciences |
| CTLA4        | Человек | BNI3      | BV421         | BD Biosciences |
| HLA-DR       | Человек | G46-6     | BUV395        | BD Biosciences |
| PD-1         | Человек | EH12,1    | BUV737        | BD Biosciences |
| CD3          | Человек | UCHT1     | BUV805        | BD Biosciences |
| CD3          | Человек | UCHT1     | APC           | BD Biosciences |
| CD39         | Человек | A1        | BV786         | Biolegend      |
| Гранзим В    | Человек | QA16A02   | PE            | Biolegend      |
| ИФН $\gamma$ | Человек | 4S.B3     | PE-eFluor 610 | Thermo Fisher  |
| ИЛ-1R2       | Человек | MA5-23626 | APC           | Thermo Fisher  |
| ИЛ-2         | Человек | MQ1-17H12 | BUV737        | BD Biosciences |
| CD19         | Человек | SJ25C1    | BV510         | BD Biosciences |
| CD25         | Человек | 2A3       | APC-R700      | BD Biosciences |
|              |         |           |               |                |
| CD3e         | Мышь    | 145-2C11  | BV421         | Biolegend      |
| CCR8         | Мышь    | SA214G2   | AF647         | Biolegend      |
| CCR8         | Мышь    | SA214G2   | PE            | Biolegend      |
| ИФН $\gamma$ | Мышь    | XMG1.2    | PE-Cy7        | Biolegend      |
| ФНО $\alpha$ | Мышь    | MP6-XT22  | APC           | Biolegend      |
| FOXP3        | Мышь    | FJK-16a   | PE-eFluor 610 | Thermo Fisher  |
| CD8a         | Мышь    | 53-6.7    | BUV805        | BD Biosciences |
| CD8b         | Мышь    | H35-17.2  | BV650         | BD Biosciences |
| CD4          | Мышь    | RM4-4     | BV786         | BD Biosciences |
| CD4          | Мышь    | RM4-5     | BV786         | BD Biosciences |
| CD45         | Мышь    | 30-F11    | BUV395        | BD Biosciences |
| CD90.1       | Мышь    | OX-7      | BB700         | BD Biosciences |
| CD90.2       | Мышь    | 30-H12    | BV421         | Biolegend      |
| CD45.2       | Мышь    | 104       | APC           | Biolegend      |
| CD45.1       | Мышь    | A20       | BUV395        | BD Biosciences |



|                                                        |    |    |    |                |
|--------------------------------------------------------|----|----|----|----------------|
| Фиксируемый краситель для оценки жизнеспособности 575V | NA | NA | NA | BD Biosciences |
|--------------------------------------------------------|----|----|----|----------------|

*CCR8 является маркером опухолеассоциированных  $T_{reg}$ -клеток*

CCR8 высоко экспрессировался на FOXP3<sup>+</sup>  $T_{reg}$ -клетках, выделенных из образцов, полученных при хирургической резекции солидной опухоли, но экспрессия была значительно ниже на  $T_{reg}$ -клетках из совпадающей по пациенту крови. В отличие от этого, CCR4, CTLA-4 и CD25 экспрессировались со схожей частотой  $T_{reg}$ -клетками из опухоли и крови (фигура 2A). Относительное количество CCR8 на клетку на FOXP3<sup>+</sup>  $T_{reg}$ -клетках было выше на опухолевых  $T_{reg}$ -клетках по сравнению с  $T_{reg}$ -клетками периферической крови (фигура 2B), в то время как экспрессия CCR4 была ниже в опухолевых  $T_{reg}$ -клетках по сравнению с  $T_{reg}$ -клетками периферической крови. На общепринятых CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>  $T$ -клетках (CD4<sup>+</sup>  $T_{conv}$ ) CCR8 экспрессировался реже CCR4 и CD25 и в опухоли, и в периферической крови (фигуры 2C и D). Кровь и инфильтрирующие опухоль CD8<sup>+</sup>  $T$ -клетки демонстрировали пограничную экспрессию всех четырех молекул, за исключением CD25 в крови (фигуры 2E и 2F). Эти данные позволяют предполагать, что CCR8 является высокоселективным маркером для таргетинга опухолевых  $T_{reg}$ -клеток с относительно низким риском нарушения популяций противоопухолевых  $T_{eff}$ -клеток.

#### ПРИМЕР 4

##### ЭКСПРЕССИЯ CCR8 НА РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Уровень экспрессии CCR8 разными субпопуляциями Т-лимфоцитов, ассоциированных с опухолями человека, анализировали посредством проточной цитометрии. Иссеченные опухоли человека (рак ампулярного отдела прямой кишки, колоректальный рак (CRC), рак двенадцатиперстной кишки, рак головы и шеи, меланому, NSCLC, рак яичников, рак паращитовидных желез, почечноклеточную карциному (RCC), рак желудка, рак щитовидной железы, рак языка) подвергали химической или ферментативной диссоциации. Для сравнения уровней экспрессии CCR8 в  $T_{reg}$ -клетках в периферической крови и инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клетках использовали резецированные опухоли от пациентов с CRC, RCC, меланомы и NSCLC. После диссоциации или расщепления клетки фильтровали и окрашивали на жизнеспособность перед мечением поверхностных маркеров, включая фикоэритрин (PE)-конъюгированные Ab, связывающиеся с CCR8 (Ab против hCCR8 клон L263G8; BioLegend), CD3, CD4 и CD8. После завершения окрашивания поверхности клетки промывали, затем фиксировали и пермеабелизовали для внутриклеточного окрашивания на FOXP3. После промывки образцы клеток обрабатывали с помощью проточного цитометра и анализировали данные с использованием программного обеспечения Flowjo (FlowJo, Ashland, OR) для вычисления средней интенсивности флуоресценции (MFI).  $T_{reg}$ -клетки определяют как

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-клетки, в то время как CD4 Т<sub>conv</sub>-клетки или общепринятые CD4<sup>+</sup> Т-клетки представляют собой CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> Т-клетки.

Как показано на фигуре 3А, CCR8 экспрессируется большой долей резидентных Т<sub>reg</sub>-клеток опухоли (медиана 82%), что определяли по FOXP3, известному Т<sub>reg</sub>-ассоциированному фактору транскрипции. В отличие от этого, значимо меньшая фракция общепринятых инфильтрирующих опухоль CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток экспрессирует CCR8 (медианы 12,65% и 4,55%, соответственно). Хотя небольшая доля CD4 Т<sub>conv</sub>-клеток экспрессирует CCR8, уровень экспрессии CCR8 в пересчете на клетку является значимо более высоким на Т<sub>reg</sub>-клетках, чем CD4 Т<sub>conv</sub>-клетках (медиана MFI 2106 против 132, P<0,0001), в то время как CD8<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют пренебрежимо малые уровни CCR8 (фигура 3В). Т<sub>reg</sub>-клетки в периферической крови также экспрессируют CCR8, но на гораздо более низких уровнях, чем инфильтрирующие опухоль Т<sub>reg</sub>-клетки (фигура 3С). Высокий уровень экспрессии CCR8 специфически на Т<sub>reg</sub>-клетках делает CCR8 подходящей мишенью для истощения популяции иммуносупрессорных клеток посредством ADCC с использованием Ab против CCR8.

#### ПРИМЕР 5

##### ЭКСПРЕССИЯ CCR8 НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ Т<sub>reg</sub>-КЛЕТОК

Для исследования уровня экспрессии CCR8 разными субпопуляциями периферических Т<sub>reg</sub>-клеток PBMC выделяли от 5 здоровых доноров с использованием градиента плотности и окрашивали на CCR8, CD3, CD4, CD8a, FOXP3 (внутриклеточные), CCR8 и CD45RO. Т-клетки подразделяли на субпопуляции CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-клеток (Т<sub>reg</sub>-клеток), CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> Т-клеток (CD4 Т<sub>conv</sub>) и CD8 Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD8a<sup>+</sup>). Эти субпопуляции дополнительно разделяли на наивные популяции (CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), популяции эффекторной памяти (ЕМ; CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) и популяции центральной памяти (СМ, CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) для исследования экспрессии CCR8. Клетки обрабатывали с помощью проточного цитометра и анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo. PBMC также выделяли из субпопуляции пациентов со злокачественными новообразованиями и окрашивали на экспрессию CCR8, как описано в примере 4 для инфильтрирующих опухоль лимфоцитов человека.

Результаты показаны на фигуре 4. На фигуре 4А показано, что CCR8 экспрессируется на небольшой фракции Т<sub>reg</sub>-клеток периферической крови здоровых индивидуумов (медиана 21%) по сравнению с экспрессией на высокой процентной доле инфильтрирующих опухоль Т<sub>reg</sub>-клеток (медиана 82%; ср. фигуру 3А). В популяции Т<sub>reg</sub> здоровых индивидуумов CCR8 экспрессируется больше в популяции эффекторной памяти (ЕМ) и в меньшей степени в клетках центральной памяти (СМ) (фигура 4В), в то время как очень низкую экспрессию CCR8 наблюдают на наивных Т<sub>reg</sub>-клетках (фигура 4В) или общепринятых CD4<sup>+</sup> Т-клетках (фигура 4С). В популяции CCR8<sup>+</sup> Т<sub>reg</sub> опухолеассоциированные CCR8<sup>+</sup> Т<sub>reg</sub>-клетки экспрессируют больше CCR8 в пересчете на клетку, чем периферические CCR8<sup>+</sup> Т<sub>reg</sub>-клетки, что измеряли по MFI связанного Ab против CCR8 (фигура 4D).

## ПРИМЕР 6

ЭКСПРЕССИЯ CCR8 НА НАИБОЛЕЕ СУПРЕССОРНЫХ FOXP3<sup>HIGH</sup> T<sub>reg</sub>-КЛЕТКАХ

Экспрессия CCR8 на FOXP3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-клетках и T<sub>reg</sub>-клетках, экспрессирующих FOXP3 на среднем и высоком уровнях, исследовали посредством проточной цитометрии. Иссеченные опухоли человека от 2 пациентов с меланомой и 1 пациента с RCC подвергали механической диссоциации с использованием ножниц и гомогенизатора Даунса. После диссоциации клетки фильтровали и окрашивали на жизнеспособность перед мечением поверхностных маркеров с помощью Ab, связывающихся с CCR8, CD3, CD4 и CD8, как описано в примере 4. После завершения поверхностного окрашивания клетки промывали, затем фиксировали и пермеабилizовали для внутриклеточного окрашивания на FOXP3. После промывки образцы обрабатывали с помощью проточного цитометра и анализировали данные с использованием программного обеспечения FlowJo. Для анализа клетки гейтировали по популяции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>.

Как показано на фигуре 5, CCR8, в основном, экспрессируется популяцией CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>high</sup>, представляющей собой наиболее активированные T<sub>reg</sub>-клетки. В образцах, в которых присутствует четкая популяция FOXP3<sup>mid</sup>, как в образцах 2 пациентов с меланомой, основную экспрессию CCR8 обнаружена в FOXP3<sup>high</sup> T-клетках. Уровень экспрессии CCR8 в популяциях FOXP3<sup>mid</sup> значимо ниже. В некоторых случаях большинство FOXP3<sup>+</sup> T-клеток пациента демонстрируют высокие уровни FOXP3 (фигура 5, RCC). В этих случаях экспрессия CCR8 перекрывается с экспрессией FOXP3. Показано, что FOXP3<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T-клетки являются истинными T<sub>reg</sub>-клетками, в отличие от FOXP3<sup>mid</sup> CD4<sup>+</sup> T-клеток, которые могут являться активированными общепринятыми T-клетками или покоеющимися T<sub>reg</sub>-клетками.

## ПРИМЕР 7

CCR8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-КЛЕТКИ ГИПЕРЭКСПРЕССИРУЮТ ИММУНОСУПРЕССОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И НЕДОЭКСПРЕССИРУЮТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ

Для исследования экспрессии иммуносупрессорных и провоспалительных белков опухоли ассоциированными CCR8- и CCR4-экспрессирующими T-клетками резецированные опухоли легких, полученные от клинициста посредством ночной доставки, ферментативно расщепляли с использованием набора (Miltenyi Biotec) на суспензии отдельных клеток. Суспензии диссоциировавших опухолевых клеток оставляли на ночь в среде RPMI (Corning), содержащей 10% FBS. На следующий день клетки культивировали в течение 4 ч. в присутствии (для стимуляции клеток) или отсутствия фобол-миристат-ацетата (PMA) и иономицина с добавлением брефелдина А (BFA) и монензина (ThermoFisher, Waltham, MA) для блокирования транспорта белков при 37°C. После культивирования в течение 4 ч. клетки окрашивали на поверхностные и внутриклеточные маркеры, ассоциированные с супрессией T<sub>reg</sub> и воспалением, и анализировали посредством проточной цитометрии.

На фигурах 6A-D показано, что CCR8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетки в опухолях пациентов обогащены иммуносупрессорными молекулами, в то время как не наблюдают сравнимого обогащения в CCR4<sup>+</sup> Т-клетках (фигуры 7A-D). Большинство (приблизительно 80%) CD25<sup>+</sup> клеток обнаруживают в CCR8<sup>+</sup> фракции, в то время как менее 20% CD25<sup>+</sup> клеток обнаруживают в CCR8<sup>-</sup> фракции (фигура 6A). Аналогично, почти все CD39<sup>+</sup> клетки обнаруживают в CCR8<sup>+</sup> фракции, в то время как менее 40% клеток, экспрессирующих этот маркер, являются CCR8<sup>-</sup> клетками (фигура 6B). Приблизительно треть клеток, экспрессирующих ИЛ-1R2, являются CCR8<sup>+</sup> клетками, но в CCR8<sup>-</sup> фракции не обнаруживают ИЛ-1R2-экспрессирующих клеток (фигура 6C), и несоответствие между экспрессией ИЛ-1R2 в CCR8<sup>+</sup> и CCR8<sup>-</sup> Т-клетках является даже более высоким при измерении в стимулированных Т-клетках (фигура 6D). Таким образом, в терминах иммуносупрессии CCR8<sup>+</sup> Т-клетки из образцов опухолей пациентов обогащены несколькими белками с супрессорными функциями, такими как CD25, CD39 и ИЛ-1R2. CD39 является эктонуклеотидазой, превращающей АТФ в АМФ, а затем в аденозин, являющийся супрессорным для Т-клеток (Sekic et al., 2011), в то время как CD25 (рецептор ИЛ-2, используемый Т<sub>reg</sub>-клетками для секвестрации ИЛ-2) и ИЛ-1R2 (рецептор-ловушка для ИЛ-1) потенциально действует как сток для провоспалительных цитокинов ИЛ-2 (Pandayan et al., 2012) и ИЛ-1D/E (Garlanda et al., 2013), соответственно.

В отличие от Т-клеток, являющихся CCR8<sup>+</sup> или CCR8<sup>-</sup>, наблюдают меньшие различия в уровнях экспрессии CD25 (фигура 7A), CD39 (фигура 7B) и ИЛ-1R2 (фигуры 7C и 7D) в CCR4<sup>+</sup> и CCR4<sup>-</sup> Т-клетках. Таким образом, направленное истощение CCR8<sup>+</sup> клеток будет приводить к удалению иммуносупрессорных Т<sub>reg</sub>-клеток, экспрессирующих CD25, CD39 и ИЛ-1R2, в то время как CCR4-направленное истощение не будет затрагивать Т<sub>reg</sub>-клетки, экспрессирующие эти молекулы.

При использовании HLA-DR в качестве маркера активации, экспрессия CCR8 также коррелирует с более высоким уровнем экспрессии HLA-DR (фигура 8A) и, таким образом, позволяет идентифицировать активированные Т<sub>reg</sub>-клетки, в то время как экспрессия CCR4 - нет (фигура 8B).

Стимуляция культур подвергнутых ферментативной диссоциации опухолей пациентов ex vivo с помощью РМА и иономицина показала, что CCR8<sup>-</sup> фракция CD4<sup>+</sup> Т-клеток содержала подавляющее большинство ИФН $\gamma$ - (фигура 9A), ИЛ-2- (фигура 9B) и гранзим В- (фигура 9C) продуцирующих клеток. В отличие от этого, CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клетки являются основными продуцентами ИФН $\gamma$  (фигура 10A) и ИЛ-2 (фигура 10B) в этом анализе, что позволяет предполагать, что направленное истощение CCR4-экспрессирующих, но не CCR8-экспрессирующих, клеток может приносить вред противоопухолевому иммунитету. CCR4<sup>+</sup> и CCR4<sup>-</sup> Т-клетки продуцировали сравнимые уровни гранзима В (фигура 10C).

#### ПРИМЕР 8

##### ПОЛУЧЕНИЕ mAb ПРОТИВ CCR8

*mAb против hCCR8*

Гуманизированные, химерные или человеческие mAb против CCR8 получали посредством иммунизации разных грызунов, включая обычных мышей C57Bl/6, разных линий трансгенных мышей, экспрессирующих репертуар Ig человека, и также специально полученной линии мышей, несущих нокаут CCR8, с помощью различных антигенов CCR8 человека (hCCR8). Затем выбранные Ab, полученные на нетрансгенных мышах, преобразовывали в гуманизированные или химерные Ab.

#### *Иммунизация антигенами CCR8*

Для получения Ab против hCCR8 когорты по 2-5 грызунов иммунизировали антигенами hCCR8, при этом каждую когорту подвергали стратегии иммунизации, включающей уникальную комбинацию антигена CCR8, дозы, пути инъекции, адъюванта, линии животного, возраста животного и времени иммунизации. Всего иммунизировали 222 животных в 58 когортах. Иммунизировали гомозиготных CCR8-нокаутных мышей (полученных из C57BL/6), 5 разных линий трансгенных по Ig человека мышей, мышей дикого типа (BALB/C, C57BL/6) и серых хомячков.

Иммунизации проводили с использованием широкого спектра антигенов, включающего один или более из 17 композиций антигенов, содержащих полные или частичные последовательности белка hCCR8. Как правило, мышей иммунизировали через подушечку стопы или основание хвоста до 12 раз с помощью  $2\text{--}5 \times 10^6$  CCR8-гиперэкспрессирующих клеток (трансфицированных или трансдуцированных стабильных линий НЕК 293F, BA/F3 или CHO), обогащенных плазматическими мембранами фракций, выделенных из этих клеток посредством дифференциального центрифугирования, солюбилизованных детергентом, липид-стабилизированных белков CCR8 (протеолипосомы, бицеллы, мицеллы), полученных из клеток 293, транзитивно гиперэкспрессирующих hCCR8, или линий клеток с трансмембранными мутациями CCR8 для повышенной стабильности (Abilita Bio, San Diego, CA). Схожие иммунизации клетками и фракциями плазматических мембран осуществляли посредством интраперитонеальных и подкожных инъекций.

Во многих случаях в качестве антигена использовали 3-10 мкг конъюгированного с гемоцианином морского блюда (KLH) пептида из 35 остатков с двумя остатками сульфотирозина, соответствующего N-концевой последовательности hCCR8. В некоторых случаях этот N-концевой пептид вводили в 3-ей, 5-ой и 7-ой дозах вместе с клетками 293F с hCCR8 в схеме с 10 иммунизациями с целью повышения и созревания Ab-ответа против N-конца CCR8, т.к. связывание Ab с этой пептидной последовательностью ассоциировано с эффективностью в последующих анализах. В других случаях этот N-концевой пептид вводили в комбинации с каждой иммунизацией клетками или фракцией плазматической мембраны или в отдельности без других антигенов.

В некоторых случаях мышей иммунизировали с помощью CCR8-кодирующих ДНК-плазмид посредством внутримышечных инъекций в переднюю большеберцовую мышцу и четырехглавую мышцу с последующими иммунизациями клетками или N-концевым пептидом, описанными выше. Также использовали затрудненные пептиды,

имитирующие вторую внеклеточную петлю CCR8, вирусоподобные частицы с CCR8 и другие рекомбинантно сконструированные материалы CCR8 (аполипопротеин и линии клеток с трансмембранными мутациями CCR8 для повышения стабильности). Некоторые антигены на основе клеток и плазматических мембран метили гаптенем с использованием пикрилсульфоновой кислоты (Sigma-Aldrich) для повышения иммуногенности. В некоторых случаях во время иммунизации вводили чередующиеся антигены hCCR8 и CCR8 яванского макака (cCCR8). Как правило, при иммунизациях вводили адъювант RIBI (Sigma-Aldrich), содержащий монофосфорил-липид А, смешанный 1:1 с антигенами, или вводили его в виде смежной инъекции таким образом, чтобы не нарушать липидные бислои и конформацию белка CCR8. Животных подвергали иммунизациям в течение различных периодов времени от 18 до 177 дней.

Для мониторинга иммунных ответов титруемую сыворотку из крови из ретроорбитальной или хвостовой вены подвергали скринингу посредством проточной цитометрии и ELISA, как описано ниже, как правило, через 4-6 недель после иммунизаций. Сыворотку подвергали скринингу на связывание Ab с множеством CCR8-гиперэкспрессирующих линий клеток, соответствующими линиями клеток отрицательного контроля, негиперэкспрессирующими CCR8, и сульфатированным N-концевым пептидом CCR8, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином (BSA). У каждого животного измеряли CCR8-специфические и CCR8-неспецифические Ab-ответы и животных с достаточными титрами Ig против CCR8 выбирали для конечных иммунизаций за 6 и 3 дня до умерщвления и сбора ткани для получения слитых гибридом. Лучший титр CCR8-специфических Ab наблюдали у CCR8-нокаутных мышей по сравнению с другими линиями мышей, и ограниченные попытки иммунизации крыс и хомяков также не привели к каким-либо Ab. Сульфатированный N-концевой пептид CCR8, конъюгированный с белком-носителем KLH, являлся одним из лучших иммуногенов и действовал в отдельности или лучшего всего в комбинации с фракциями плазматических мембран. И наоборот, не все из антигенов действовали; например, использование аполипопротеина и мутантных в отношении мембраны линий клеток в качестве иммуногенов не привело к каким-либо Ab.

#### *Получение гибридом, продуцирующих mAb против CCR8*

Лимфоидные органы, включая селезенку и лимфоузлы, выделяли из мышей, иммунизированных, как описано выше. Наиболее типично, собирали подколенные, паховые и подвздошные лимфоузлы из мышей, иммунизированных через подушечку стопы и основание хвоста с помощью иммуногенов CCR8. Гибридомы получали посредством слияния с иммортализованными миеломными клетками мыши, полученными из линии клеток P3X63AgU.1 (ATCC CRL-1597) посредством электрослияния с использованием электропоратора для слияния клеток (BTX, Holliston, MA). Полученные клетки высевали в плоскодонные планшеты для микротитрования в среду E (StemCell Technologies, Cambridge, MA), дополненную аминоптеринем (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) для селекции гибридом.

### *mAb против mCCR8*

Изотип коммерчески доступного mAb IgG2b крысы против mCCR8 (клон SA214G2; BioLegend) меняли на mIgG2a или mIgG1-D265A посредством клонирования ДНК, кодирующих вариабельные области, в два разных вектора рТТ5 (National Research Council of Canada) и экспрессировали с использованием системы экспрессии Expi293.

#### ПРИМЕР 9

#### СКРИНИНГ И СЕЛЕКЦИЯ mAb ПРОТИВ CCR8 ЧЕЛОВЕКА

##### *Скрининг на mAb, селективно связывающихся с CCR8 человека*

Для получения mAb, связывающихся с hCCR8, грызунов, включая трансгенных по Ig человека мышей, иммунизировали различными антигенами hCCR8 и получали гибридомы, как описано в примере 8. Через 10-13 дней культивирования и замены сред для выращивания, собирали супернатанты культур гибридом из отдельных лунок и подвергали их скринингу для идентификации лунок с секретируемыми CCR8-специфическими Ab. Все супернатанты исходно подвергали скринингу против по меньшей мере двух линий клеток - гиперэкспрессирующей hCCR8 и соответствующей контрольной линии клеток, негиперэкспрессирующей CCR8. Связывание Ab на клетках измеряли с помощью скрининга посредством основанной на изображении технологии флуориметрического анализа в микрообъеме (FMAT), высокопроизводительной 384-луночной проточной цитометрии с использованием устройства Intellicyt iQue Screener (Sartorius, Albuquerque, NM) или твердофазного иммуноферментного анализа на основе адгезивных клеток (ELISA). Анализы исходного связывания иногда осуществляли в параллели для максимизации идентификации Ab против CCR8. Супернатанты из приблизительно 157250 культуральных лунок в 66 слитых гибридомах подвергали скринингу на Ab против hCCR8.

Гибридомы из положительных лунок переносили в 24-луночные планшеты с новыми средами для культивирования, позволяя им расти в течение 2-3 дней, затем подвергали скринингу посредством проточной цитометрии для подтверждения связывания Ab с CCR8. В кратком изложении, 75-100 мкл супернатанта культуры гибридомы и CCR8-гиперэкспрессирующих клеток (таких как CHO или 293F) или контрольные клетки (такие как GFP-CHO или родительские 293F) совместно инкубировали в течение 30-60 мин, промывали и инкубировали с вторичным Ab против Fc IgG мыши или против Fc IgG человека, конъюгированным с AF647, APC или PE (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). После инкубации и промывки измеряли флуоресценцию посредством проточной цитометрии. Идентифицировали приблизительно 328 клонов гибридом, продуцирующих Ab против hCCR8, т.е. они представляли собой супернатанты FACS<sup>+</sup> гибридом, полученные через приблизительно 2 недели после слияния и включали низкоаффинные связывающие средства, демонстрировавшие связывание при исходном скрининге на связывание с CCR8-экспрессирующими линиями клеток, но не с контрольными линиями клеток. Наблюдали высокий коэффициент выбывания при разработке Ab по разным причинам, например, клоны были утрачены,

если продуцирующую антитело против CCR8 клетку нельзя выделить, некоторые клоны не функционировали хорошо в анализах перекрестной сшивки CD16 или истощения T<sub>reg</sub>, выходы Ab в некоторых клонах являлись неприемлемо низкими, и некоторые Ab содержали недостатки последовательности, которые нельзя преодолеть. Из 328 FAC<sup>+</sup> клонов приблизительно 90 не подвергали обширному скринингу, и из остальных приблизительно 55 доводили до стадии клонирования на остов человека для тщательного тестирования. Приблизительно 15% этих Ab, включая mAb 4A19, 14S15, 18Y12, 16B13, 10R3 и 8D55, считали хорошими кандидатами для терапевтического средства, исходя из их действия в различных функциональных анализах (см., например, примеры 11, 14, 15, 17, 19-23 и 25-29). Таким образом, Ab, представленные в настоящем описании как Ab, опосредующие истощение CCR8-экспрессирующих клеток, включают mAb 4A19, 14S15, 14S15h, 18Y12, 16B13, 10R3 и 8D55.

Для широкой классификации эпитопов подтвержденных специфических Ab против CCR8 супернатанты культур также подвергали скринингу посредством ELISA для измерения связывания с N-концевыми пептидами CCR8. В кратком изложении, BSA-конъюгированным пептидом (2 мкг/мл), представляющим собой сульфатированный N-конец hCCR8, покрывали 96-луночные планшеты с высоким связыванием (Corning) в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали BSA и промывали, затем добавляли 100 мкл супернатанта культуры на 30-60 мин и помещали планшет на шейкер. После промывки добавляли подходящее вторичное Ab против Fc, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP), проявляли планшеты с помощью субстрата ABTS или HRP (SurModics, Eden Prairie, MN) и измеряли поглощение при 405 или 650 нм с помощью спектрофотометра для чтения микропланшетов Sunrise (TECAN; Männedorf, Switzerland). Ab, полученные против hCCR8, преимущественно, но не исключительно, при ELISA связывались с BSA-конъюгированной последовательностью N-концевого пептида с двумя сульфатированными остатками тирозина. Среди этих Ab связывание при ELISA с альтернативными BSA-конъюгированными N-концевыми пептидами, содержащими только один сульфатированный тирозин, как правило, было значительно снижено, и связывание, как правило, утрачивалось, когда ни один из остатков тирозина не был сульфатирован.

Секретирующие Ab против CCR8 гибридомы субклонировали один или два раза для обеспечения моноклональности. В кратком изложении, приблизительно 700 жизнеспособных гибридомных клеток высевали в 5 мл полутвердой метилцеллюлозной среды (StemCell Technologies) с AF488-конъюгированным Ab против IgG человека или против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch), используемым для детекции секретируемых гибридомой IgG. Через 7 дней колонии гибридом, возникшие из отдельных клеток, с желаемыми свойствами (расстояние от других колоний, уровни секреции IgG, размер колоний и округлость колоний, измеряемые с помощью системы ClonePix2 (Molecular Devices, San Jose, CA)) переносили в культуры в 96-луночных планшетах и позволяли им расти в течение 2-4 дней. Супернатант культуры подвергали скринингу посредством



проточной цитометрии, как описано выше для подтверждения связывания Ab против CCR8. Стабильные субклоны гибридом культивировали *in vitro* для получения Ab для аффинной очистки и дальнейшей характеристики. Последовательности ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи Ab, получали стандартными способами секвенирования (секвенирование по Сэнгеру и секвенирование нового поколения). Массы, предсказанные из аминокислотных последовательностей Ab, сравнивали с известными массами очищенных Ab, полученными посредством масс-спектро스코пии, для обеспечения точности секвенирования.

В целом, при скрининге полученных Ab связывание с CCR8, как описано выше, и, что важнее, перекрестная сшивка CD16 (пример 17) являлись двумя основными анализами, используемыми на ранних стадиях скрининга для определения, какие Ab перспективны в качестве терапевтических Ab для дальнейшей характеристики. Титрование связывания по Ab против hCCR8-гиперэкспрессирующих клеток 293F (пример 11), как правило, позволяло различать сильные и слабые связывающие средства, и слабо связывающие средства, как правило, плохо действовали в функциональных анализах, и, таким образом, их, как правило, не переводили на следующую стадию скрининга, таким образом, их не включали в следующую стадию в последовательности анализов. Ab с хорошим или умеренным связыванием или активностью в этих анализах переводили на схожие анализы на первичных T<sub>reg</sub>-клетках, например, анализы связывания (пример 11), тока кальция (пример 15) и NK-опосредованной ADCC (пример 19), при этом последний считают одним из наиболее важных для сравнения эффективности Ab и выбора лидирующих кандидатов. Т.к. он ограничен первичными клетками, анализ перекрестной сшивки CD16 на линиях клеток использовали в качестве суррогатного анализа ADCC, который, как правило, хорошо коррелировал с результатами анализов ADCC/истощение T<sub>reg</sub> (примеры 19, 20 и 22).

В анализах ADCC первичных T<sub>reg</sub>, Y<sub>max</sub> (% аннекسينа V+клетки) считали таким же, если не более, важным, как значение EC<sub>50</sub> некоторых Ab. Ab с наиболее высоким Y<sub>max</sub> ADCC (при специфическом связывании) считали превосходящими Ab со сравнимой EC<sub>50</sub>, но более низким Y<sub>max</sub>.

#### ПРИМЕР 10

##### ГУМАНИЗАЦИЯ mAb МЫШИ ПРОТИВ CCR8

##### *Гуманизация mAb мыши против CCR8 в mAb 4A19*

mAb мыши против hCCR8 конструировали для гуманизации каркаса в наиболее близкие последовательности зародышевой линии человека, представлявшие собой hIgHV1-8\*01 и hIGJ4 для тяжелой цепи, а также IGKV2D-30 и hIGKJ2 для легкой цепи. Удаляли несколько потенциальных недостатков последовательности. Отдельный неспаренный цистеин в CDR1 тяжелой цепи подвергали мутации в серин (C35S). Потенциальный участок изомеризации в мотиве последовательности Asp-Gly удаляли посредством мутации аспартата в глутамин (D52Q). Осуществляли еще четыре другие мутации в этом участке (D52E, D52S, D52V, D52A) и выбирали лучший вариант, D52Q, по

способности связываться с высокой аффинностью с линией клеток Raji, экспрессирующей CCR8. Потенциальный участок гликозилирования в каркасе варибельного домена тяжелой цепи удаляли посредством замены аспарагина аспартатом (N72D). Эту мутацию выбирали с учетом аспартата, встречающегося в зародышевой линии с частотой 27%. Валин в CDR1 легкой цепи заменяли фенилаланином (V27F) и получали молекулу с повышенным связыванием. Полученное mAb, 4A19, демонстрировало связывание с клетками Raji, экспрессирующими CCR8, сравнимое с родительским Ab 9D7 (10 нМ против 3 нМ для 9D7 и 4A19, соответственно).

Таблица 3. Данные функциональной характеристики для соответствующих mAb против hCCR8

| mAb                | Тип mAb                                                                      | Иммуноген                                                                                                                                            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4A19               | Нефукозилированное гуманизированное IgG1 против hCCR8                        | Клетки 293F с hCCR8 (+ KLH-hCCR8-N-сульфо-пептид за 3 иммунизации)                                                                                   |
| 14S15 <sup>a</sup> | Нефукозилированное химерное антитело мыши-человека <sup>b</sup> против hCCR8 | hCCR8-кодирующая ДНК от In-Cell-Art (Nantes, France), не дающая детектируемого титра антител против CCR8 в сыворотке, затем KLH-hCCR8-N-сульфопептид |
| 18Y12              | Нефукозилированное химерное антитело мыши-человека <sup>b</sup> против hCCR8 | KLH-hCCR8-N-сульфопептид                                                                                                                             |
| 16B13              | Нефукозилированное IgG1 человека                                             | Плазматические мембраны BAF3 с hCCR8+KLH-hCCR8-N-сульфопептид                                                                                        |
| 2M18               | IgG1 человека против hCCR8                                                   | Плазматические мембраны BAF3 с hCCR8+KLH-hCCR8-N-сульфопептид                                                                                        |
| 15C17              | IgG1 человека против hCCR8                                                   | Плазматические мембраны 293 с CCR8+KLH/BSA N-sulf-hCCR8 Пептид                                                                                       |
| 13T20              | IgG1 человека против hCCR8                                                   | Плазматические мембраны 293 с CCR8+KLH/BSA N-sulf-hCCR8 Пептид                                                                                       |
| 10R3               | IgG1 человека IgG1 против hCCR8                                              | Плазматические мембраны BAF3 с hCCR8+KLH-hCCR8-N-сульфопептид                                                                                        |
| 8D55               | IgG1 человека против hCCR8                                                   | Плазматические мембраны BAF3 с hCCR8+KLH-hCCR8-N-сульфопептид                                                                                        |
| 1V11               | IgG1 человека против hCCR8                                                   | Плазматические мембраны BAF3 с hCCR8+KLH-hCCR8-N-сульфопептид                                                                                        |

|       |                                                     |                                                               |
|-------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 11K16 | IgG1 человека против hCCR8                          | Плазматические мембраны BAF3 с hCCR8+KLH-hCCR8-N-сульфопептид |
| 12F27 | Нефукозилированное химерное <sup>c</sup> (mFc/hFab) | Плазматические мембраны 293 с hCCR8+KLH-hCCR8-N-сульфопептид  |

<sup>a</sup> mAb, обозначенное в настоящем описании как 14S15, относится к химерному производному mAb мыши против hCCR8, в котором Fc-область мыши заменяют nf Fc IgG1 человека. Гуманизированную, аффинно зрелую и оптимизированную по недостаткам последовательности версию этого mAb получали, как описано ниже в этом примере, и обозначали как 14S15h.

<sup>b</sup> Эти mAb являлись химерными Ab, содержащими Fab мыши, пересаженный на Fc человека.

<sup>c</sup> Это mAb является химерным Ab в противоположном смысле, т.к. его получали в трансгенной мыши так, чтобы оно содержало Fc мыши и полностью человеческий Fab. Этих мышей конструировали так, чтобы они продуцировали Ab, содержащие Fc мыши, чтобы способствовать созреванию аффинности.

Типичный ряд полученных mAb против CCR8 приведен в таблице 3, где указан тип mAb и иммуноген, используемый для их получения. Ab человека против hCCR8 получали рекомбинантно в виде изотипов hIgG1 с использованием системы экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific). Nf (hIgG1-nf) Ab экспрессировали в клетках Expi293 Fut8<sup>-/-</sup>.

Несколько из Ab в таблице 3, а именно mAb 2M18, 15C17, 13T20, 1V11, 11K16 и 12F27, являются Ab, демонстрировавшими плохое функционирование в скрининговых анализах, например, анализах перекрестной сшивки CD16 и ADCC T<sub>reg</sub> (сравнительно высокие значения EC<sub>50</sub> и сравнительно низкие значения Y<sub>max</sub>), и, таким образом, их считали бесперспективными кандидатами в терапевтические средства. Однако, они включены в таблицу 3, чтобы подчеркнуть тот факт, что подавляющее большинство полученных CCR8-связывающих Ab не считали сильными кандидатами в терапевтические средства.

#### *Гуманизация mAb мыши против CCR8 в mAb 14S15h*

Другое mAb мыши против CCR8 конструировали для гуманизации каркаса в ближайшие последовательности зародышевой линии человека, представляющие собой hIgHV3-15 для тяжелой цепи и IGKV2-18 для легкой цепи. Гуманизация каркаса приводила к снижению связывания Fab человека, что измеряли посредством SPR (K<sub>D</sub> 4,2 нМ по сравнению с 1,4 нМ для исходного Ab мыши, 9G10). Созревание аффинности вариабельного домена тяжелой цепи осуществляли с использованием 3 разных библиотек NNK и 4 циклов пэннинга с использованием 200 нМ, 50 нМ, 10 нМ и 1 нМ биотинилированного N-концевого пептида CCR8 от Anaspec (Freemont, CA) и повышали строгость промывок. Одна замена N30G в области CDR1 тяжелой цепи приводила к созреванию аффинности. Кроме того, потенциальный участок дезамидирования в мотиве последовательности Asn-Gly удаляли посредством мутации asn в gln (N28Q, нумерация по

Kabat). Полученное гуманизированное, аффинно зрелое и подвергнутое устранению недостатков последовательности антитело 14S15h имело полностью восстановленную и даже повышенную аффинность к N-концевому пептиду CCR8 ( $K_D$  0,64 нМ для Fab-фрагмента 14S15h). Анализы, представленные в настоящем описании, включающие mAb 14S15, включают химерную версию этого mAb, как указано в таблице 3.

#### ПРИМЕР 11

#### mAb ПРОТИВ CCR8, С ВЫСОКОЙ АФФИННОСТЬЮ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С hCCR8-ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ

*Значения  $EC_{50}$  для связывания mAb против hCCR8 с  $T_{reg}$ -клетками*

mAb против hCCR8 инкубировали с активированными  $T_{reg}$ -клетками человека или экспрессирующими CCR8 человека линиями клеток (293F, CHO, Raji). Активированные  $T_{reg}$ -клетки, полученные из ранее выделенных и подвергнутых экспансии  $T_{reg}$ -клеток, стимулировали в течение 2 дней с использованием активирующих бус против CD3/CD28 (ThermoFisher) в присутствии 100 ед./мл рекомбинантного ИЛ-2 человека. Ab подвергали серийным разведениям от начальной концентрации 30 мкг/мл. Использовали подходящее PE-конъюгированное вторичное Ab (Jackson ImmunoResearch) против первичного Ab против CCR8, инкубировали в течение 15 мин при 4°C, а затем вымывали. Образцы обрабатывали с помощью проточного цитометра, данные анализировали с использованием FlowJo и представляли на фигуре 11. Значения  $EC_{50}$  для связывания выбранных mAb против CCR8 с активированными  $T_{reg}$ -клетками вычисляли с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Как показано на фигуре 11, типичный образец полученных mAb против CCR8 демонстрирует связывание с различными hCCR8-трансфицированными линиями клеток и активированными  $T_{reg}$ -клетками с диапазоном аффинностей. Как правило, Ab исходно подвергали скринингу с учетом их аффинностей связывания с CCR8-экспрессирующими линиями клеток (CHO, 293F, Raji), и обнаруживали, что большинство подвергнутых скринингу Ab демонстрировали полумаксимальные эффективные концентрации ( $EC_{50}$ ) менее 1 нМ (фигура 11A). Однако если эти подвергнутые предварительному скринингу Ab тестировали на связывание с активированными  $T_{reg}$ -клетками, наблюдали более широкий диапазон аффинностей связывания, при этом менее половины Ab демонстрировали связывание с  $EC_{50}$  ниже 1 нМ (фигура 11A). Выбранная субпопуляция Ab, имеющих значения  $EC_{50}$  в диапазоне от пикомоль до наномоль, представлена на фигуре 11B, и соответствующие значения  $EC_{50}$  приведены в таблице 4.

Таблица 4. Аффинность ( $EC_{50}$ ) mAb против CCR8, связывающихся с активированными  $T_{reg}$ -клетками

| mAb против CCR8 | Медиана $EC_{50}$ (нМ) |
|-----------------|------------------------|
| 8D55            | 0,284                  |
| 10R3            | 14,1                   |
| 14S15           | 0,252                  |

|       |       |
|-------|-------|
| 16B13 | 0,149 |
| 4A19  | 1,65  |
| 18Y12 | 0,120 |

Т.к. показано, что mAb против hCCR8, включая 18D55, 10R3, 14S15, 16B13, 4A19 и 18Y12, имеют высокий потенциал к индуцированию ADCC (пример 17) или напрямую вызывают эффективное истощение (примеры 19, 20 и 22) инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клетки, очевидно, что Ab, связывающиеся с CCR8 на активированных T<sub>reg</sub>-клетках с аффинностью (EC<sub>50</sub>) в наномолярном диапазоне (например, приблизительно 20 нМ или менее, но предел может быть выше, например, более 100 нМ), могут эффективно опосредовать истощение T<sub>reg</sub>. Однако, для использования в качестве терапевтического средства, специфически нацеленного на инфильтрирующие опухоль T<sub>reg</sub>-клетки, связывание с CCR8 должно быть высокоспецифическим (ср. mAb 16B13, связывающееся с высокой аффинностью с CCR8, но также сильно связывающееся с мишенью, неявляющейся CCR8 (пример 14)).

*Значения K<sub>D</sub> для связывания mAb против CCR8, 4A19, с N-концевым пептидом CCR8*

Константу диссоциации (K<sub>D</sub>) для связывания mAb 4A19 с N-концевым пептидом CCR8 человека измеряли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Измерения SPR осуществляли с помощью Biacore T200 при 37°C в буфере HBST (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05% с 1 г/л BSA). Чип CM4 с иммобилизованным pAb захвата против каппа-цепи человека (Biotech, Birmingham, AL), блокированным EDA (этилендиамином). Ab против CCR8 (Fab и mAb) захватывали и N10-концевые пептиды CCR8 (200 нМ, 40 нМ, 8 нМ или 1,6 нМ) инъецировали в качестве аналитов в течение 2 мин со скоростью потока 100 мкл/мин. Все данные имели двойной референс, и их аппроксимировали по модели связывания Ленгмюра 1:1 с массовым переносом с использованием аналитического программного обеспечения Biacore T200 3.1. Пептиды CCR8 остатков 1-35 являлись несультатированными (CCR8-несульфо), сультатированными только по Tyr15 (CCR8-сульфо-Y15), только по Tyr17 (CCR8-сульфо-Y17) или по обоим положениям Tyr15 и Tyr17 (CCR8-2-сульфо) и были произведены Anaspec (Fremont, CA).

Таблица 5. Аффинность (K<sub>D</sub>) mAb против CCR8, 4A19, Fab-фрагмента, связывающегося с N-концом CCR8

| mAb  | Лиганд          | k <sub>a</sub> (1/Мс)   | K <sub>d</sub> (1/с) | K <sub>D</sub> (М)    |
|------|-----------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| 4A19 | CCR8-2-сульфо   | 2,5×10 <sup>7</sup>     | 4,1×10 <sup>-2</sup> | 1,6×10 <sup>-9</sup>  |
| 4A19 | CCR8-сульфо-Y17 | 4,3×10 <sup>6</sup>     | 8,4×10 <sup>-2</sup> | 2,0×10 <sup>-8</sup>  |
| 4A19 | CCR8-сульфо-Y15 | Приблизительная оценка: |                      | ~1,3×10 <sup>-6</sup> |
| 4A19 | CCR8-несульфо   | Отсутствие связывания   |                      |                       |

Результаты, приведенные в таблице 5, свидетельствуют о том, что Fab-фрагмент 4A19 связывается с N-концом CCR8 с  $K_D$  1,6 нМ. Сульфатированный тирозин необходим для связывания, т.к. несulfатированный пептид не демонстрирует какого-либо связывания с Fab-фрагментом 4A19. Отсутствие сульфатирования на Y15 приводит (CCR8-сульфо-Y17) к приблизительно 10-кратному снижению аффинности по сравнению с дважды сульфатированным пептидом, в то время как отсутствие сульфатирования по Y17 (CCR8-сульфо-Y15) приводит к снижению связывания 4A19 в приблизительно 1000 раз (таблица 5).

#### ПРИМЕР 12

#### КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА 4A19, СВЯЗАННОГО С N-КОНЦЕВЫМ ПЕПТИДОМ CCR8

##### *Связывание Fab 4A19 с однократно сульфатированным пептиду*

Область Fab (домены VH и CH1) тяжелой цепи 4A19 подвергали слиянию с меткой 8His и клонировали в вектор pTT5A. Fab-фрагмент 4A19, содержащий эту модифицированную тяжелую цепь 4A19 и легкую цепь 4A19, экспрессировали в клетках НЕК. Супернатант очищали на аффинной колонке с никелем и элюат подвергали замене буфера на фосфатно-солевой буфер (PBS) и пропускали через эксклюзионную колонку (GE Superdex-200) с подвижным буфером, содержащим 10 мМ Трис, pH 7,4, 150 мМ NaCl. Соответствующий главный пик объединяли и концентрировали до 7-10 мг/мл. Остатки 1-35 человек CCR8 только с сульфатированным Y17 химически синтезировали в Bio-Synthesis (Lewisville, TX). Лиофилизированный пептид растворяли в 10 мМ Трис, pH 7,4, 150 мМ NaCl и смешивали в молярном соотношении 5:1 с Fab-фрагментом 4A19. Кристаллизацию осуществляли посредством смешивания раствора белка с равными частями 25% PEG3350 и подвергали криоконсервации с использованием Al's oil. Кристаллы дифрагировали до разрешения 2,03 Å в группе симметрии C2. Собранные данные индексировали с использованием XDS, масштабировали и усекали с использованием sscr4i и уточняли с использованием refmac5.

На фигуре 12A показана кристаллическая структура Fab-фрагмента 4A19 (показана в поверхностном представлении), связанного с N-концевым пептидом CCR8 (показан в каркасном представлении) с разрешением 2,03 Å, где показано, что эпитоп, связанный 4A19, содержит остатки 15-21 CCR8 с сульфатированным тирозином-17 в своем центре.

##### *Связывание Fab 4A19 с дважды сульфатированным пептидом*

Fab-фрагмент 4A19 получали, как описано в предыдущем разделе. Пептид, состоящий из остатков 1-35 hCCR8 с обоими сульфатированными Y15 и Y17, химически синтезировали в Anaspec. Fab-фрагмент подвергали замене буфера на 50 мМ NaCl, 10 мМ Трис pH 8,0, и дважды сульфатированный пептид добавляли к Fab-фрагменту в 2-кратном молярном избытке. Кристаллы выращивали посредством диффузии паров в сидячей капле при 20°C посредством смешивания 200 нл концентрированного образца белков с концентрацией 12,8 мг/мл с 200 нл маточного раствора (0,2 М ацетата аммоний, 20% PEG 3350, pH 7,2). Кристаллы появлялись в пределах 7 дней и получали данные рентгеновской

дифракции с разрешением 1,80 Å в пучке синхронного излучения 17-ID (IMCA-CAT) в Advanced Photon Source. Данные обрабатывали по группе симметрии P21 с использованием XDS и определяли структуру посредством молекулярного замещения с помощью фазера и уточняли с помощью Phenix.

На фигуре 12В показана кристаллическая структура Fab-фрагмента 4A19 (показана в поверхностном представлении), связанного с N-концевым пептидом CCR8 (показан в каркасном представлении). Ab 4A19 распознает оба остатка сульфат-групп в положениях Y15 и Y17. Молекулярные взаимодействия для эпитопа CCR8 вычисляли с использованием программного обеспечения PISA. Остатки CCR8 V12, D14, Y(SO3)15, Y16, Y(SO3)17, P18, I20, F21 и S22 демонстрируют изменения площади доступной поверхности  $>3\text{Å}^2$  в комплексе с Fab-фрагментом 4A19.

### ПРИМЕР 13

#### СВЯЗЫВАНИЕ mAb ПРОТИВ mCCR8 С mCCR8-ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ

##### *Связывание mAb mIgG2a против CCR8 с mCCR8-экспрессирующими клетками CHO*

mIgG2a против CCR8 (изотип IgG2a мыши коммерческого mAb крысы против mCCR8 [BioLegend, клон SA214G2], используемое в настоящем описании в качестве суррогата для вызывания ADCC терапевтических Ab против hCCR8, представленных в настоящем описании) подвергали серийным разведениям от начальной концентрации 30 мкг/мл и инкубировали с  $5 \times 10^5$  mCCR8-экспрессирующие клетки CHO. После инкубации клетки промывали, а затем окрашивали с помощью PE-конъюгированного вторичного Ab против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) на льду в течение 30 мин. Клетки промывали и анализировали с помощью проточного цитометра. Среднюю интенсивность флуоресценции вычисляли с использованием Flowjo.  $EC_{50}$ , вычисленную с использованием GraphPad Prism, определяли как 6,44 нМ. Это значимо выше  $EC_{50}$  многих из Ab против hCCR8, анализируемых выше, составляющей приблизительно 0,05 нМ для связывания с hCCR8-экспрессирующими клетками CHO.

##### *Связывание mAb против CCR8 с тимоцитами мыши и первичными активированными $T_{reg}$ -клетками селезенки мыши*

Связывание mIgG2a против CCR8 с тимоцитами мыши и первичными активированными  $T_{reg}$ -клетками из спленоцитов мыши анализировали посредством проточной цитометрии. Тимусные Т-клетки экспрессируют CCR8 конститутивно, в то время как экспрессия CCR8 индуцирована на  $T_{reg}$ -клетках селезенки. Для индуцирования экспрессии CCR8 на спленоцитах мыши  $CD4^+$ Т-клетки выделяли и активировали с помощью бус против CD3/CD28 в соотношении 3:1 и 2000 ед./мл рекомбинантного ИЛ-2 мыши (гИЛ-2). Тимусные  $CD4^+$  Т-клетки, выделенный в тот же день, или  $CD4^+$  Т-клетки селезенки, активированные в течение 48 ч., смешивали с титрами mIgG2a против CCR8 или контрольного Ab mIgG2a против KLH. Связывание Ab с CCR8 поверхности клетки определяли с помощью флуоресцентно меченого Ab против IgG мыши. Относительное

связывание клеток измеряли как долю всех CD4 клеток, положительных по флуоресцентно конъюгированному вторичному Ab.

Показано, что Ab против mCCR8 связывается с CCR8 на поверхности тимусных CD4<sup>+</sup> клеток ( $EC_{50}=4$  нМ) и активированных CD4<sup>+</sup> клеток селезенки мыши ( $EC_{50}=6,16$  нМ).

#### ПРИМЕР 14

##### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ТКАНЕВАЯ РЕАКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ mAb ПРОТИВ hCCR8

mAb против hCCR8, 18Y12, 16B13 и 4A19, тестировали в концентрации 1 и 3 мкг/мл на связывание с CCR8-экспрессирующими линиями клеток, PBMC и разными типами тканей (n=1-2/каждую).

##### *Трансфектанты CCR8*

Все 3 Ab сильно связывались с hCCR8-трансфицированными линиями клеток CHO и 293F (данные не представлены). Эти трансфицированные линии клеток использовали в качестве положительных контролей в последующих экспериментах по окрашиванию тканей.

##### *Нормальные PBMC человека*

Как показано на фигуре 13A, mAb 18Y12 и 4A19 не связывались с PBMC. Однако, 16B13 демонстрировало сильное связывание с мишенью, не являющейся CCR8. Хотя 16B13 демонстрирует привлекательные свойства, например, связывание с активированными T<sub>reg</sub>-клетками с высокой аффинностью (пример 11), эффективное ингибирование тока кальция CCR8-экспрессирующими клетками (пример 15) и демонстрацию высокого потенциала или активности ADCC (примеры 17 и 19), неспецифическое связывание с PBMC, наблюдаемого в случае этого mAb, свидетельствует о том, что его использование в терапии будет вызывать проблемы с нецелевым истощением иных клеток, чем инфильтрирующие опухоль T<sub>reg</sub>-клетки, неэкспрессирующие CCR8.

##### *Различные типы тканей человека*

mAb 18Y12 и 4A19 тестировали против панели 18 нормальных типов тканей человека, включая головной мозг, мозжечок, сердце, печень, легкие, почку, миндалину, селезенку, тимус, толстый кишечник, желудок, поджелудочную железу, надпочечник, гипофиз, кожу, периферический нерв, яичко, матку и мазок PBMC (n=1-2/каждый), при этом hCCR8-экспрессирующие клетки CHO и 293F использовали в качестве положительных контролей.

Положительное окрашивание наблюдали в редких и рассеянных иммунных клетках, главным образом, в мозговом веществе тимуса (фигура 13B; 18Y12-левые панели и 4A19-правые панели) и дерме кожи (данные не представлены), в то время как не наблюдали положительного окрашивания в других исследуемых тканях (данные не представлены). Схожий профиль экспрессии наблюдали в моделях опухолей на мышах (данные не представлены).



mAb 16B13 тестировали против панели 21 нормального типа тканей человека, включая головной мозг, мозжечок, сердце, печень, легкие, почку, миндалину, селезенку, тимус, толстый кишечник, желудок, поджелудочную железу, надпочечник, щитовидную железу, гипофиз, кожу, периферический нерв, предстательную железу, яичко, матку и мазок РВМС (n=1-2/каждого), при этом hCCR8-трансфицированные клетки СНО использовали в качестве положительного контроля.

Наиболее выраженное окрашивание наблюдали в иммунных клетках, главным образом, в лимфоидных органах (тимус [фигура 13В; средние панели], миндалина, селезенка) и лимфоидно-богатых тканях (толстый кишечник и тонкий кишечник; данные не представлены). Окрашивание являлось сильным и диффузным в подавляющем большинстве иммунных клеток, в частности, в богатых лимфоцитами областях (например, гораздо более сильное окрашивание в белой пульпе селезенки, чем в красной) с преобладающими цитоплазматическими и/или перинуклеарными паттернами. Это окрашивание наблюдали во многих тканях, где присутствуют иммунные клетки, включая купферовские клетки в печени, альвеолярные макрофаги в легких и подобные мезангиальные клетки в клубочках почек.

В мазках РВМС не наблюдали окрашивания или наблюдали минимальное окрашивание в нефиксированных наблюдали (но высушенных на воздухе) мазках, в то время как перинуклеарное и цитоплазматическое окрашивание наблюдали в фиксированных ацетоном (т.е. пермеабилizованных) препаратах, что дополнительно подтверждает наблюдение о том, что положительное мечение является внутриклеточным.

Сильное и диффузное окрашивание (главным образом, при концентрации выше 3 мкг/мл) также наблюдали в гладкомышечных клетках мускулатуры кишечника (тонкий кишечник, толстый кишечник, желудок), мышцы, поднимающей волос, в коже, и строме предстательной железы, а также сосудистом русле в большинстве тканей. Окрашивание демонстрирует цитоплазматический паттерн.

Сильное и диффузное перинуклеарное /или цитоплазматическое окрашивание наблюдали в нейронах и глиальных клетках в головном мозге и мозжечке, а также субпопуляции клеток в нейрогипофизе и веретенообразных интерстициальных клетках в периферических нервах.

Сильное и диффузное цитоплазматическое окрашивание также наблюдали в субпопуляции эпителиальных клеток, включая мезотелий в сердце, субпопуляции эпителия дистальных или собирающих канальцев в почке, эндокринных клетках в гипофизе, эпителии дыхательных путей в легких, протоковом эпителии в поджелудочной железе, базальном слое эпителия семенных канальцев в яичке и железистом эпителии эндометрии матки. Окрашивание имело тенденцию к большей выраженности при высокой концентрации (3 мкг/мл) в большинстве случаев.

#### ПРИМЕР 15

mAb ПРОТИВ hCCR8 БЛОКИРУЮТ СВЯЗЫВАНИЕ hCCL1 С hCCR8-ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ

Блокаду связывания hCCL1 с hCCR8 под действием mAb против hCCR8 тестировали, осуществляя анализы тока кальция (Ca) с использованием hCCR8-экспрессирующих клеток CHO (hCCR8-CHO), т.к. вовлечение CCR8 на клетках CHO под действием CCL1 индуцирует ток кальция. hCCR8-CHO высевали и инкубировали в течение 2 ч. при 37°C в присутствии красителя FLIPR Calcium 6 (Molecular Devices) и пробенецида (Thermo Fisher Scientific). После инкубации к клеткам добавляли разные mAb против CCR8 и оставляли при комнатной температуре в течение 15 мин перед добавлением 10 нМ рекомбинантного CCL1 человека (R&D Systems, Minneapolis, MN). Флуоресцентный сигнал тока Ca измеряли по максимуму-минимуму с использованием системы FLIPR Tetra (Molecular Devices). Полумаксимальную ингибиторную концентрацию (IC<sub>50</sub>) вычисляли с использованием GraphPad Prism.

Таблица 6. Блокада тока кальция на CCR8-экспрессирующих клетках посредством mAb против CCR8s

| mAb против CCR8          | IC <sub>50</sub> (нМ) |
|--------------------------|-----------------------|
| 4A19                     | 0,4645                |
| 16B13                    | 0,2600                |
| 18Y12                    | 0,2314                |
| 14S15                    | 1,331                 |
| KLH-g1fnf                | N/A                   |
| Ритуксимаб (против CD20) | N/A                   |

Возможность блокирования связывания CCL1 с CCR8 может иметь анти-супрессорный эффект в отношении T<sub>reg</sub>-клеток, и эту функцию использовали в качестве критерия выбора для кандидатов в терапевтические Ab против CCR8. Приблизительно 52% (50 из 96) тестируемых mAb против hCCR8 блокировали связывание CCL1 на клетках hCCR8-CHO (фигура 14A). Выбранная субпопуляция этих Ab блокировала CCL1-индуцированный ток Ca клеток CCR8-CHO на 51%-94% (фигура 14B). Кривые IC<sub>50</sub> для блокады тока Ca на hCCR8-CHO показаны на 4 выбранных mAb против CCR8 на фигуре 14C (диапазон IC<sub>50</sub> от 0,23 нМ до 1,331 нМ), и значения IC<sub>50</sub> для этих mAb приведены в таблице 6.

#### ПРИМЕР 16

#### mAb ПРОТИВ mCCR8 БЛОКИРУЮТ СВЯЗЫВАНИЕ mCCL1 С mCCR8-ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ

Блокада связывания mCCL1 с mCCR8 под действием mIgG2a против CCR8 тестировали с помощью анализов тока Ca на mCCR8-экспрессирующих клетках CHO (mCCR8-CHO), как описано в примере 15, за исключением того, что использовали mCCR8-CHO вместо hCCR8-CHO. IC<sub>50</sub>, вычисленную с использованием GraphPad Prism, определяли как 19,34 нМ.

Чтобы mIgG2a против CCR8 служило в качестве подходящего суррогатного Ab мыши для тестирования терапевтической эффективности Ab против CCR8, созданных для

использования на людях, важно, что это Ab мыши демонстрируют функциональные характеристики, схожие с соответствующими Ab против hCCR8. Аналогично mAb против hCCR8, ингибирующим hCCL1-индуцированный ток Ca (фигура 14, таблица 6), обнаружено, что mIgG2a против CCR8 ингибируют mCCL1-индуцированный ток Ca в клетках mCCR8-CHO, хоть и менее эффективно - со значением  $IC_{50}$  19,34 нМ по сравнению с значениями  $IC_{50}$  приблизительно от 0,2 нМ до 1,3 нМ, наблюдаемыми для Ab против hCCR8, тестируемыми в примере 15.

#### ПРИМЕР 17

#### ПОТЕНЦИАЛ К ADCC mAb ПРОТИВ hCCR8, ИЗМЕРЕННЫЙ ПО СПОСОБНОСТИ К ПЕРЕКРЕСТНОЙ СШИВКЕ CD16

Потенциал к ADCC mAb против hCCR8 измеряли по способности этих Ab опосредовать перекрестную сшивку CD16-экспрессирующих репортерных клеток. Активированные  $T_{reg}$ -клетки человека или hCCR8-экспрессирующие клетки Raji сокультивировали в соотношении 1:5 с CD16-экспрессирующими, NFAT-люцифераза-репортерными клетками Jurkat при 37°C в течение 4 ч. в присутствии Ab против CCR8 или контрольного Ab. К клеткам добавляли BIO-GLO™ (Promega, Madison, WI) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, в затем считывали люминесценцию для измерения активности люциферазы. Полумаксимальную эффективную концентрацию ( $EC_{50}$ ) вычисляли с использованием GraphPad Prism.

NK-клетки опосредуют ADCC через вовлечение или перекрестную сшивку рецептора Fcγ 3A (CD16). Способность mAb против hCCR8 опосредовать ADCC клеток-мишеней (hCCR8-экспрессирующих клеток Raji или активированных  $T_{reg}$ -клеток человек) измеряли с помощью CD16-экспрессирующей линии клеток, как описано выше. Шестнадцать процентов тестируемых mAb против hCCR8 с остовом IgG1 человека (hIgG1) демонстрировали 80-100% максимального вовлечения CD16 с использованием CCR8-экспрессирующих клеток Raji в качестве мишеней (фигура 15A). Выбранные mAb модифицировали в формат nfhIgG1 (hIgG1-nf) и подвергали скринингу аналогичным образом.

Таблица 7. Перекрестная сшивка CD16-экспрессирующих репортерных клеток под действием mAb против CCR8

| mAb против CCR8 | $EC_{50}$ (нМ) |
|-----------------|----------------|
| 8D55            | 6,58           |
| 10R3            | 3,02           |
| 14S15           | 8,02           |
| 16B13           | 0,67           |
| 4A19            | 0,69           |
| 18Y12           | 0,698          |

Большинство этих mAb против CCR8 hIgG1-nf достигали 80-100% перекрестной сшивки CD16 (фигура 15A). Двадцать семь процентов тестируемых mAb против CCR8

hIgG1-nf достигали максимального вовлечения CD16 при использовании активированных T<sub>reg</sub>-клеток человека в качестве клеток-мишеней (фигура 15A). Значения EC<sub>50</sub> для перекрестной сшивки CD16 выбранным набором тестируемых mAb против hCCR8 hIgG1-nf показан на фигуре 15B и в таблице 7.

#### ПРИМЕР 18

#### ПОТЕНЦИАЛ К ADCC mAb ПРОТИВ mCCR8, ИЗМЕРЕННЫЙ ПО СПОСОБНОСТИ К ПЕРЕКРЕСТНОЙ СШИВКЕ FcγRIV<sup>+</sup> РЕПОРТЕРНЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Способность mIgG2a против CCR8 индуцировать ADCC-опосредованное уничтожение CCR8-экспрессирующих клеток косвенно оценивали посредством измерения его способность индуцировать перекрестную сшивку FcγRIV<sup>+</sup> репортерных клеток мыши (Promega). В этом анализе FcγRIV<sup>+</sup> эффекторные клетки, экспрессирующий люциферазу светлячка, сокультивировали с первичными активированными T<sub>reg</sub>-клетками из спленоцитов мыши или mCCR8-экспрессирующими клетками СНО в соотношении 1:5. Клетки сокультивировали при 37°C в течение 4 ч. в присутствии титра mIgG2a против CCR8, mIgG1-D265A против CCR8, имеющего инертный остов, или контрольные Ab mIgG2a против KLH. Активность уничтожения клеток-мишеней измеряли как перекрестную сшивку и активацию FcγRIV<sup>+</sup> эффекторных клеток, демонстрировавших повышение биолуминесцентного сигнала (RLU), продуцируемого после инкубации клеток с субстратом люциферина BIO-GLO™ (Promega).

Специфическую перекрестную сшивку эффекторных клеток наблюдали (EC<sub>50</sub>=6,34 нм), о чем свидетельствовал высокий сигнал люциферазы, при более высоких концентрациях mIgG2a против CCR8. Это показало, что Ab связывалось с клетками-мишенями и привлекало FcγRIV к эффекторным клеткам. Специфичность этого взаимодействия оценивали с использованием нецелевого специфического Ab (mIgG2a против KLH) и не-FcγRIV-вовлекающего Ab (mIgG1-D265A против CCR8), ни одно из которых не демонстрировало какой-либо передачи сигнала люциферазы.

#### ПРИМЕР 19

#### mAb ПРОТИВ CCR8 СПОСОБСТВУЮТ ОПОСРЕДОВАННОЙ НК-КЛЕТКАМИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ T<sub>reg</sub>-КЛЕТОК

Нефукозилированные mAb против hCCR8, демонстрирующие повышенную эффекторную функцию, тестировали на их способность стимулировать опосредованный НК-клетками апоптоз активированных T<sub>reg</sub>-клеток, полученных, как описано в примере 2. Аллогенные НК-клетки для использования в качестве эффекторов выделяли с использованием разделения в градиенте плотности фикола RBMC из цельной крови с последующей отрицательной селекцией на магнитных бусах (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA) для удаления не-НК-клеток. НК-клетки выделяли из свежих RBMC здорового донора (набор для выделения НК-клеток человека, Miltenyi Biotec) и культивировали в течение 24 ч. в среде Myelocult H5100 (StemCell Technologies) с 1 мкМ гидрокортизона (StemCell

Technologies) и 500 ед./мл рекомбинантного ИЛ-2 человека (PeproTech, Cranbury, NJ) для повышения активации НК-клеток.

НК-клетки флуоресцентно метили CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific) и комбинировали с  $T_{reg}$ -клетками в соотношении 5:1 в среде RPMI с 10% FBS с ультранизким содержанием IgG и 1 mM пирувата натрия. Добавляли титры Ab против hCCR8 и Ab изотипического контроля и инкубировали с клетками в течение 3 ч. при 37°C. Клетки окрашивали с аннексин-V-FITC-конъюгированным Ab и 7-AAD в буфере, содержащем  $Ca^{2+}$ , и флуоресценцию клеток измеряли посредством проточной цитометрии с использованием цитометра BD Fortessa X-20 (BD Biosciences, San Jose, CA). Процентную долю апоптотических  $T_{reg}$ -клеток среди общих  $T_{reg}$ -клеток (аннексин-V-положительных, CellTrace Violet-отрицательных) определяли посредством стандартного проточно-цитометрического анализа.

ADCC активированных  $T_{reg}$ -клеток человека под действием аллогенных НК-клеток в присутствии hIgG1-nf mAb против hCCR8 использовали для оценки способности Ab против CCR8 опосредовать истощение инфильтрирующих опухоль  $T_{reg}$ -клеток. После скрининга более крупной совокупности Ab против hCCR8 посредством анализов связывания CCR8 (пример 9), блокирования CCL1 (пример 15) и перекрестной сшивки CD16 (пример 17), субпопуляцию Ab оценивали на их способность опосредовать ADCC активированных  $T_{reg}$ -клеток через НК-клетки. Медиана процентных долей клеток, подвергнутых апоптозу, индуцированному выбранными hIgG1-nf Ab против hCCR8, показана на фигуре 16, что свидетельствует о том, что эти процентные доли находятся в диапазоне приблизительно от 34% до 99%. Значения  $EC_{50}$  для уничтожения активированных  $T_{reg}$ -клеток под действием аллогенных НК-клеток, опосредованного разными Ab против CCR8, приведены в таблице 8, со значениями в диапазоне от приблизительно от 13 пМ до 304 нМ.

Таблица 8. Уничтожение посредством ADCC активированных  $T_{reg}$ -клеток, опосредованное mAb против CCR8

| mAb против CCR8 | Медиана $EC_{50}$ (пМ) |
|-----------------|------------------------|
| 8D55            | 38,6                   |
| 10R3            | 56,6                   |
| 14S15           | 39,7                   |
| 16B13           | 13,4                   |
| 4A19            | 13,1                   |
| 18Y12           | 18,6                   |
| 12F27           | $3,04 \times 10^5$     |

#### ПРИМЕР 20

mAb ПРОТИВ CCR8 СПОСОБСТВУЮТ ИСТОЩЕНИЮ  $T_{reg}$ -КЛЕТОК В ОПУХОЛЯХ ПАЦИЕНТОВ

Нефукозилированные mAb против hCCR8 тестировали на их способность стимулировать опосредованный NK-клетками апоптоз опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток пациентов-людей. В кратком изложении, подвергнутые диссоциации опухоли эндометрия пациента приобретали в Discovery Life Sciences. NK-клетки здорового донора выделяли и примировали в течение ночи для ADCC, как описано в примере 19, и флуоресцентно метили (CellTrace Violet, ThermoFisher). Затем эти NK-клетки ( $1,875 \times 10^5$  клеток/лунку) инкубировали с опухолевыми клетками эндометрия ( $2,5 \times 10^5$  клеток/лунку) в течение 24 ч. с титрами Ab против hCCR8 (14S15) и контрольными Ab (mAb против CCR4, могамулизумабом, и антителом против KLH-nf изотипического контроля) в среде RPMI с 10% FBS с ультранизким содержанием IgG и 1 mM пирувата натрия при 37°C. Полученные клетки окрашивали на T<sub>reg</sub>-клетки и другие популяции лимфоцитов и обрабатывали с помощью проточного цитометра. Доли T<sub>reg</sub>-клеток и общепринятых T-клеток анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo.

Для определения того могут ли Ab против hCCR8 специфически опосредовать ADCC инфильтрирующей опухоль T<sub>reg</sub>-клеток пациента, аллогенные NK-клетки сокультивировали с расщепленными опухолевыми клетками эндометрия, содержащими инфильтрирующие опухоль T<sub>reg</sub>-клетки. Ранее было показано, что могамулизумаб, hIgG1nf Ab против CCR4, может опосредовать уничтожение T<sub>reg</sub> у пациентов со злокачественными новообразованиями. Как показано на фигуре 17, могамулизумаб и mAb против CCR8, 14S15, индуцируют уничтожение опухолевых T<sub>reg</sub>, при этом 14S15 являлось более мощным (фигура 17A). mAb 14S15 специфически истощают опухолевые T<sub>reg</sub>-клетки эндометрия (фигура 17A), но не общепринятый CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> T-клетки (фигура 17B). В отличие от этого, могамулизумаб также истощает общепринятые CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> T-клетки. 14S15 не истощает какие-либо другие субпопуляции лимфоцитов (данные не представлены).

В дополнительном эксперименте получали несколько Ab против hCCR8 со следующими вариантами тяжелой цепи человека: 1) hIgG1; 2) nf IgG1 (IgG1-nf), демонстрирующее значимо более высокую аффинность связывания FcγR, чем IgG1, и могут превосходить эндогенный IgG по связыванию с CD16 в случае ADCC/ADCP (Iida, 2006); и 3) IgG1-L234A-L235E-G237A (hIgG1-инертный), минимально вовлекающий FcγR (Hezareh et al., 2001). Клоны 16B13 и 14S15 антитела против человека CCR8 в качестве Ab IgG1-nf связывались с *in vitro* активированными FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетками человека, блокировали связывание CCL1 и перекрестно сшивали CD16 после связывания с CCR8 на активированных T<sub>reg</sub>-клетках (примеры 11, 15 и 17; Campbell et al., 2021, где 16B13 обозначают как CCR8.1, и 14S15 обозначают как CCR8.2). Клон 16B13-IgG1 также был способен к перекрестной сшивке CD16, хоть и с меньшей активностью, чем соответствующий IgG1-nf (Campbell et al., 2021), в то время как 16B13-IgG1-инертный совершенно не мог опосредовать перекрестную сшивку CD16 (Campbell et al., 2021).

Затем определяли способность Ab IgG1-nf против hCCR8 истощать FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клетки из периферической крови и образцов первичных опухолей человека. Анализы

истощения PBMC осуществляли посредством инкубации  $2,0 \times 10^5$  PBMC в средах для культивирования и 100 ед./мл ИЛ-2 (Peprotech) в 96-луночной планшете с U-образным дном (Corning) в течение 48 ч. при 37°C. Через два дня добавляли соответствующие Ab и клетки дополнительно инкубировали в течение 96 ч. с последующим проточно-цитометрическим анализом.

Хотя 14S15-IgG1-nf истощало субпопуляцию  $T_{reg}$ -клеток периферической крови (менее 50%) (фигура 18A), nf Ab против человек CCR4 (против hCCR4-IgG1-nf, биосимиляр могамулизумаба) приводило к удалению более чем 90% этих клеток (фигура 18A), а также приблизительно половины периферических  $CD4^+ T_{conv}$  (фигура 18B). Ни одно из Ab не влияло на популяцию  $CD8^+$  Т-клеток (фигура 18C). Таким образом, обработка активированных PBMC Ab IgG1-nf против hCCR8 истощает субпопуляцию  $T_{reg}$ -клеток периферической крови, но, что важно, не истощает  $T_{eff}$ -клетки. У пациентов с раком молочной железы секвенирование TCR показало значительное клональное перекрытие между  $CCR8^+ T_{reg}$ -клетками периферической крови и опухолевыми  $T_{reg}$ -клетками (Wang et al., 2019), что позволяет предполагать, что (1) клоны  $T_{reg}$  с периферии мигрируют в опухоль и подвергаются экспансии и вызывают супрессию  $T_{reg}$ , или (2) активированные  $T_{reg}$  из микроокружения опухоли подвергаются экспансии на периферию. Оба варианта могут существовать одновременно и приводить к инфильтрации циркулирующих  $CCR8^+ T_{reg}$ -клеток в участках метастазирования опухоли для опосредования иммуносупрессии. Независимо от механизма, эти результаты позволяют предполагать, что массовое истощение  $CCR8^+ T_{reg}$ -клеток может служить в качестве способа системного удаления опухолеспецифических  $T_{reg}$ -клеток на периферии или в опухолях.

Для тестирования на опосредованное антителами против CCR8 истощение в образцах опухоли *ex vivo* суспензии клеток хирургически резецированных NSCLC культивировали с активированными аллогенными NK-клетками с кровью здоровых доноров. Добавление 14S15-IgG1-nf приводило к снижению доли  $FOXP3^+ T_{reg}$ -клеток (фигура 18D) без какого-либо эффекта в отношении всех  $CD4^+ T_{conv}$  (фигура 18E) или долей  $CD8^+$  Т-клеток (фигура 18F). В отличие от этого, IgG1-nf против hCCR4 приводило к истощению приблизительно 30%  $CD4^+ T_{conv}$  (фигура 18E) в дополнение к истощению  $T_{reg}$ -клеток (фигура 18D). Не наблюдали истощения  $T_{reg}$  после обработки 16B13-IgG1-инертным (фигура 18G).

Тестировали способность 16B13-IgG1-nf и 4A19 истощать  $T_{reg}$ -клетки в образцах опухоли пациента *ex vivo* в отсутствие аллогенных NK-клеток. Для исследования 16B13 свежие ткани светлоклеточной почечноклеточной карциномы (RCC) и опухоли желудка заключали в агар и получали последовательные срезы толщиной 300 мкм с использованием вибротома COMPRESSTOME® (Precisionary Instruments; Greenville, NC) до нарезания всей ткани опухоли. Срезы тканей культивировали между двумя кусками коллагеновой гемостатической губки (Becton Dickinson, Warwick, RI) в 6-луночных планшетах для культивирования тканей, содержащих 5 мл среды для культивирования

клеток RPMI 1640 (Corning) с 10% FBS, дополненной 1 мМ пирувата натрия и 55 нМ 2-меркаптоэтанола (Thermo Fisher Scientific). Культуры срезов инкубировали при 37°C на шейкере для планшетов, вращающем со скоростью 80 об./мин, для облегчения перфузии среды. Через 24 ч. лунки с культурами срезов обрабатывали 16B13-IgG1-nf или hIgG1 против KLH-nf изотипического контроля. Через 3 дня инкубации с mAb срезы опухолевой ткани подвергали ферментативной диссоциации с использованием набора (Miltenyi Biotec) в суспензии отдельных клеток и окрашивали для проточно-цитометрических анализов. Определяли процентную долю FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клеток среди CD4<sup>+</sup> T-клеток.

Как показано на фигурах 18H и 18I, обработка образцов почечноклеточного рака и опухоли желудка 16B13-IgG1-nf демонстрировала приблизительно 50% снижение доли T<sub>reg</sub>-клетках в системе культивирования срезов опухолей пациента *ex vivo* без добавления аллогенных NK-клеток, что подтверждает, что эндогенные резидентные FcγR<sup>+</sup> клетки опухоли являются достаточными для опосредования ADCC/ADCP против CCR8<sup>+</sup> клеток-мишеней *in situ*.

Для исследования 4A19, резецированную опухоль меланому нарезали на срезы и культивировали в течение 3 дней с 10 мкг/мл 4A19, биосимиляра могамулизумаба, или nf hIgG1 против KLH изотипического контроля. Через 3 дня обработанные срезы опухоли подвергали диссоциации на суспензии отдельных клеток для проточно-цитометрического анализа. В целом, срезы опухолей, обработанных 4A19, демонстрировали сниженную процентную долю FOXP3<sup>+</sup> CD4 T<sub>reg</sub>-клеток по сравнению с препаратами, обработанными биосимиларом могамулизумаба и изотипическим контролем.

#### ПРИМЕР 21

##### mAb ПРОТИВ CCR8 НЕ ИНДУЦИРУЮТ ИНТЕРНАЛИЗАЦИЮ CCR8 В КЛЕТКУ

Для определения того, индуцируют ли Ab против CCR8 интернализацию рецептора CCR8 после связывания с CCR8 на поверхности клетки, T<sub>reg</sub>-клетки активировали, как описано в примере 2. Каждое из mAb против CCR8 (4A19), Ab положительного контроля (Ab против ICOS) и антитела изотипического контроля добавляли в концентрации 10 мкг/мл к 4×10<sup>4</sup> активированных T<sub>reg</sub>-клеток и инкубировали при 37°C в течение 5 периодов времени: 0, 30, 60, 90 и 120 мин. Кроме того, в подгруппу образцов добавляли Ab козы против Fcγ человека в количестве 5 мкг/мл для перекрестной сшивки первичных Ab. После каждого периода времени к T<sub>reg</sub>-клеткам добавляли раствор азида натрия и смесь помещали на лед для предотвращения дальнейшей интернализации рецептора. И наконец, все образцы дважды промывали 0,05% раствором азида натрия, а затем окрашивали соответствующим фикоэритрин (PE)-конъюгированным вторичным Ab. Клетки фиксировали 2% параформальдегидом (PFA), а затем анализировали с помощью цитометра. Уровень экспрессии CCR8 на поверхности клетки измеряли по медиане интенсивности флуоресценции, определяемой с использованием программного обеспечения Flowjo.

Как показано на фигуре 19, mAb против ICOS в отсутствие перекрестно сшивающего Ab вызывало минимальную интернализацию ICOS за 120 мин, но в



присутствии перекрестно сшивающего Ab вызывало значительную интернализацию ICOS. В отличие от этого, mAb против CCR8, 4A19, не вызывало интернализацию CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно сшивающего Ab. Обработка активированных T<sub>reg</sub>-клеток Ab изотипического контроля с перекрестно сшивающим вторичным Ab или без него не вызывало интернализацию CCR8.

#### ПРИМЕР 22

#### ИСТОЩЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ T<sub>reg</sub>-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Донорские естественные киллеры (NK) выделяли и активировали с использованием Myelocult H5100 (StemCell), 1 мкМ гидрокортизона и 500 ед./мл ИЛ-2 (PeproTech) в течение 24 ч. Замороженную, подвергнутую диссоциации ткань аденокарциномы легких человека (Discovery Life Sciences) размораживали и сокультивировали *ex vivo* в соотношении 1:1 с  $2,5 \times 10^5$  аллогенных NK-клеток в течение 24 ч. в присутствии mAb против hCCR8 (mAb 4A19), mAb hIgG1-nf против hCCR4 (биосимиляра могамулизумаба) или контрольного nf mAb против гемоцианина морского блюдца (KLH-nf). Клетки окрашивали и измеряли истощение T<sub>reg</sub> посредством проточной цитометрии с использованием программного обеспечения FlowJo для вычисления популяций клеток.

Как показано на фигуре 20, mAb 4A19 индуцировало измеримое истощение опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток, не влияя на долю или количество T<sub>eff</sub>. Это было показано в анализах уничтожения аллогенными NK-клетками с использованием расщепленных опухолей пациента и систем эксплантатов срезов опухолей пациентов. mAb 4A19 являлось более эффективным в отношении истощения T<sub>reg</sub>, чем nf Ab против CCR4 *in vitro* (фигура 20A). Кроме того, в отличие от nf Ab против CCR4, mAb 4A19 не индуцировало истощение CD4<sup>+</sup> эффекторных T-клеток (фигура 20B). Ни антитело против CCR8, ни антитело против CCR4 не истощали эффекторные CD8<sup>+</sup> T-клетки (фигура 20C).

Ab с неродственным нацеливающим плечом (nf антитело против KLH) или инертным остовом (антитело против CCR8-инертное) не приводили к истощению T<sub>reg</sub>-клеток, что позволяет предполагать, что опосредованное мишенью совместное вовлечение FcγR через nf-остов необходимо для истощения T<sub>reg</sub> (фигура 20D).

#### ПРИМЕР 23

#### mAb ПРОТИВ CCR8 СНИЖАЕТ РОСТ ОПУХОЛИ В МОДЕЛИ ОПУХОЛИ CT26 НА МЫШАХ

Для тестирования эффектов mAb против CCR8 использовали различные модели опухолей на мышах, а именно сингенные модели CT26, MC38 и SA1N, а также модели опухолей MB49 и 4T1, являвшиеся резистентными к обработке против PD-1. Все обработки Ab осуществляли в дозе 200 мкг/мышь и опухоли измеряли дважды в неделю для всех исследований.

Противоопухолевую активность mAb против mCCR8 (mIgG2a против CCR8) оценивали в модели аденокарциномы толстого кишечника CT26 на мышах. Каждой из самок мышей BALB/cAnNHsd возрастом пятнадцать недель подкожно (SC) имплантировали  $10^6$  опухолевых клеток CT26. Мышей рандомизировали по исследуемым

группам по 10 мышей/группу через 7 дней после имплантации опухоли, когда опухоли достигали медианы размера приблизительно 100 мм<sup>3</sup>. Ab (mIgG2a против CCR8 или Ab mIgG2a изотипического контроля), составленные в PBS, вводили в количестве 200 мкг/мышь в объеме 200 мкл посредством IP инъекций в дни 7, 10 и 14 после имплантации. Объемы опухолей, массы тела и клинические наблюдения регистрировали для определения эффективности и переносимости тестируемых средств. Измерения опухолей калипером преобразовывали в объемы опухолей по формуле:  $\text{объем} = \frac{1}{2} (\text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота})$ . Измерения опухоли регистрировали дважды в неделю в течение до 35 дней после имплантации. В исследовании мышам давали стерильный корм для грызунов и воду *ad libitum* и держали их в стерильных клетках с верхним фильтром с 12-часовым циклом освещения/темноты. Все эксперименты на мышах проводили в соответствии с руководствами Международной ассоциации оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных.

Данные свидетельствуют о том, что mIgG2a против CCR8 мощно снижают скорость роста опухоли, при этом 8 из 10 мышей не имели опухолей ко дню 28 после имплантации, в то время как введение контрольного Ab mIgG2a не ингибировало рост опухоли (фигура 21A). Для экспериментов, проводимых в моделях опухолей на мышах, мышей без опухолей подвергали мониторингу на рецидивирование опухолей в течение  $\geq 25$  дней после последнего введения Ab. Измерения у мышей, которым вводили контроль, прекращали через приблизительно 35 дней после имплантации опухоли, после чего оставшихся мышей умерщвляли. Средние объемы опухолей подвергнутых лечению мышей приведены на фигуре 21B, что подтверждает сильное ингибирование роста опухоли под действием mAb против CCR8 и неингибированный рост опухолей, обработанных изотипическим контролем. Эти данные свидетельствуют о том, что Ab против CCR8 является высокоэффективным в ингибировании роста опухоли в этой модели CT26 на мышах и ассоциировано с истощением инфильтрирующих опухоль T<sub>reg</sub>-клеток.

Для анализа инфильтрирующих опухоль лимфоцитов собирали опухоли мышей через 16 дней после имплантации. Опухоли расщепляли коллагеназой, подвергали механической диссоциации с использованием диссоциатора OctoMacs (Miltenyi Biotec) и фильтровали через стерильные сита 100 мкм. Образцы блокировали по Fc-рецепторам посредством инкубации FcR-блокирующим реагентом (Miltenyi Biotec) с последующим поверхностным окрашиванием на популяции лимфоцитов, фиксацией, пермеабиллизацией и внутриклеточным окрашиванием на Foxp3. Затем клетки промывали и обрабатывали с помощью проточного цитометра. Анализ осуществляли с использованием программного обеспечения FlowJo и строили графики с использованием GraphPad Prism.

Как показано на фигуре 21C, введение мышам, несущим опухоли CT26 mIgG2a против CCR8 значительно снижало процентную долю Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-клеток в популяции CD4<sup>+</sup> T-клеток по сравнению с мышам, которым вводили изотипический контроль, в то время как популяция T<sub>reg</sub> в селезенке не была затронута введением mIgG2a против

CCR8(фигура 21D). Эти данные свидетельствуют о том, что CCR8 экспрессируется специфически на поверхности опухолеассоциированных  $T_{reg}$ -клеток, но не на периферических  $T_{reg}$ -клетках, и кроме того, что связывание Ab с CCR8 опосредует истощение опухолеассоциированных  $T_{reg}$ -клеток посредством ADCC.

#### ПРИМЕР 24

#### АНТИТЕЛО ПРОТИВ mCCR8 ОПОСРЕДУЕТ ИСТОЩЕНИЕ ТОЛЬКО ОПУХОЛЕВЫХ $T_{reg}$ -КЛЕТОК, СОХРАНЯЯ CCR8<sup>+</sup> Т-КЛЕТКИ В НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Популяции тканевых лимфоцитов мыши оценивали в модели аденокарциномы толстого кишечника CT26 на мышах. Самкам мышей BALB/C подкожно инъецировали  $10^6$  опухолевых клеток CT26. Мышей рандомизировали по размеру опухоли в исследуемых группах через 12 дней, когда объемы опухолей, измеренные калипером, достигали приблизительно 100-150 мм<sup>3</sup>. Мышам вводили базовую дозу 200 мкг (приблизительно 10мг/кг для мышей, весящих в среднем 21,2 г) mAb mIgG2a против CCR8 или mIgG2a изотипического контроля 3 раза в дни 12, 14 и 19 после имплантации. В день 20 через 24 ч. после введения третьей дозы Ab мышей умерщвляли, собирали образцы крови и иссекали ткани опухоли, кожи, селезенки и тимуса.

Ткани перерабатывали в суспензии отдельных клеток для проточной цитометрии. Опухоли измельчали и ферментативно расщепляли, ткани селезенки и тимуса подвергали механической диссоциации и истощали RBC в подвергнутой диссоциации селезенке и образцах крови, как описано в примере 2. Суспензии клеток из обработанных тканей блокировали по Fc-рецепторам посредством инкубации с FcR-блокирующим реагентом (Miltenyi Biotec) с последующим поверхностным окрашиванием на популяции лимфоцитов, фиксацией, пермеабиллизацией и внутриклеточным окрашиванием на Foxp3. Затем клетки промывали и обрабатывали с помощью проточного цитометра. Анализ осуществляли с использованием программного обеспечения FlowJo и строили график результатов с использованием GraphPad Prism.

Среди Т-клеток, инфильтрирующих опухоль CT26 мыши, CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>  $T_{reg}$ -клетки ( $T_{reg}$ ) являлись наиболее обогащенными по экспрессии CCR8 по сравнению с FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> эффекторами (CD4eff) или CD8<sup>+</sup> Т-клетками (CD8T) (фигура 22A). Экспрессию CCR8 также наблюдали на популяции резидентных Т-клеток кожи при очень низкой экспрессии на Т-клетках в селезенке или крови (фигура 22A). В тимусе CCR8 экспрессировались на субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (одиночно положительных) тимоцитов (фигура 22B). После обработки mIgG2a против CCR8 инфильтрирующие опухоль  $T_{reg}$ -клетки истощались, в то время как  $T_{reg}$ -клетки в селезенке, крови и коже не истощались (фигура 22C). Тимоциты (фигура 22D), а также CD4<sup>+</sup> (фигура 22E) и CD8<sup>+</sup> (фигура 22F) Т-клетки в коже также не подвергались влиянию. Таким образом, в модели опухоли мыши CT26 введение истощающего Ab против mCCR8 приводило к селективному истощению CCR8<sup>+</sup>  $T_{reg}$ -клеток в опухоли, но не относительно низкого количества CCR8<sup>+</sup> Т-клеток в коже, тимусе, селезенке или крови.

## ПРИМЕР 25

**mAb против CCR8 СНИЖАЮТ РОСТ ОПУХОЛИ В МОДЕЛИ ОПУХОЛИ MC38 НА МЫШАХ**

Противоопухолевую активность mIgG2a против CCR8 измеряли в модели аденокарциномы толстого кишечника MC38 на мышах. Каждой из самок мышей FOXP3\_IRES-EGFP (C57BL/6) возрастом пятнадцать недель (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) SC имплантировали  $10^6$  опухолевых клеток MC38 и рандомизировали их по исследуемым группам по 10 мышей/группу через 7 дней после имплантации опухоли. Ab (mIgG2a против CCR8 или контрольное Ab mIgG2a) вводили в количестве 200 мкг/мышь в объеме 200 мкл посредством IP инъекций в дни 7, 10 и 14 после имплантации. Измерения опухолей регистрировали дважды в неделю в течение до 51 дня после имплантации, после чего мышей умерщвляли. Анализ данных и построение графиков осуществляли с использованием GraphPad Prism.

Данные свидетельствуют о том, что mIgG2a против CCR8 мощно снижало скорость роста опухоли, при этом 7 из 10 мышей имели объемы опухолей ниже  $10 \text{ мм}^3$  ко дню 51 после имплантации, по сравнению со средними объемами более  $1100 \text{ мм}^3$  в случае опухолей, демонстрирующих неингибированный рост, в то время как введение контрольного Ab mIgG2a не ингибировало рост опухоли (фигура 23А). Средние объемы опухолей подвергнутых введению мышей показаны на фигуре 23В, что подтверждает сильное ингибирование роста опухоли под действием mIgG2a против CCR8 и неингибированный рост опухолей, подвергнутых действию изотипического контроля. Эти данные свидетельствуют о том, что Ab против CCR8 является высокоэффективным в ингибировании роста опухоли в этой модели MC38 на мышах.

## ПРИМЕР 26

**ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ НА ВВЕДЕНИЕ mAb ПРОТИВ CCR8 В МОДЕЛИ ОПУХОЛИ MC38 НА МЫШАХ**

Мышам C57BL/6 SC инъецировали  $1,0 \times 10^6$  клеток MC38. Опухоли измеряли калипером в двух измерениях и вычисляли объем опухоли как  $L \times (W^2/2)$ , где L=длина (большее из 2 измерений) и W= ширина. Мышей рандомизировали на 6 групп по 25 мышей каждая (21 мышь в группе изотипического контроля), когда средний объем опухоли достигал приблизительно  $77 \text{ мм}^3$ , и вводили им посредством IP инъекции mIgG2a против CCR8 или mIgG2a изотипического контроля, разведенное в PBS, в день 10 после имплантации в дозах, приведенных в таблице 9. Животных ежедневно проверяли на изменения положения тела, груминга и дыхания, а также летаргию. Опухоли и массы тела в группе регистрировали по меньшей мере дважды в неделю до гибели, умерщвления или конца периода исследования. Животных умерщвляли, если опухоль достигала более приблизительно  $2000 \text{ мм}^3$  или выглядела изъязвленной.

Для исследования эффекта mAb против mCCR8 в отношении инфильтрирующих опухоль лимфоцитов опухоли (n=7 мышей/исследуемую группу) собирали в дни 3, 5 и 10 после введения. Суспензии отдельных клеток из опухолей получали с использованием

пробирок gentleMACS C. Суспензии клеток пропускали через фильтр 70 мкм, а затем осаждали. После ресуспендирования клетки подсчитывали с использованием счетчика клеток Vi (Beckman Coulter, Miami, FL). Затем клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве  $3,0 \times 10^6$  клеток на лунку и окрашивали на субпопуляции иммунных клеток и функциональные маркеры с использованием Ab для проточной цитометрии. Флуоресценцию Ab определяли посредством проточной цитометрии с помощью цитометра Fortessa X-20 (BD Biosciences) и результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo.

Для оценки фармакокинетики (PK) mAb против mCCR8 получали образцы цельной крови ( $n=4$  мышей/временную точку) посредством забора крови из хвостовой вены или терминального забора крови через 4, 24, 72, 120, 168 и 240 часов после введения дозы. Образцы крови подвергали свертыванию и центрифугировали при 4°C (от 1500 до 2000×g) для получения сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -80°C до анализа. Образцы сыворотки мышей анализировали с использованием LC-MS/MS с иммунозахватом для детекции mAb против mCCR8. Референсный материал использовали для получения калибраторов и образцов контроля качества. Диапазон калибровочной кривой mAb против mCCR8 составлял от 200 до 200000 нг/мл в сыворотке мыши. Верхний и нижний пределы количественного анализа составляли 200000 и 200 нг/мл, соответственно (т.е. ULOQ 200000 нг/мл, LLOQ 200 нг/мл). Параметры PK получали посредством некомпартментного анализа данных о концентрации в сыворотке против времени с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonlin (Certara, Menlo Park, CA). Площадь под кривой от времени ноль до последнего времени забора [AUC (0-T)] и площадь под кривой от времени ноль до бесконечности [AUC (INF)] вычисляли с использованием комбинации линейного и логарифмического метода трапеций. CLT Vss и  $T_{1/2}$  оценивали после IP введения. В частности, CLT представляет собой общий клиренс лекарственного средства, и Vss представляет собой объем распределения (лекарственного средства) в равновесном состоянии. Вычисления времени полужизни ( $T_{1/2}$ ) осуществляли с использованием по меньшей мере 3 терминальных временных точек с количественно измеримыми концентрациями.

В соответствии с результатами в примере 25, введение однократной дозы mAb против mCCR8 приводило к сниженному росту опухоли в модели MC38. В день 10 после введения средние объемы опухолей являлись такими, как показано на фигуре 24A и в таблице 9.

Таблица 9. Уничтожение активированных  $T_{reg}$ -клеток посредством ADCC, опосредованной mAb против CCR8

| Группа | Введение Ab (доза)  | Объем опухоли в день 10 (мм <sup>3</sup> ) | % $T_{reg}$ -клеток | % CD8 <sup>+</sup> T-клеток |
|--------|---------------------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 1      | Контроль (10 мг/кг) | 629                                        | 59,5±12,8           | 10,1±2,0                    |
| 2      | CCR8 (0,03 мг/кг)   | 453                                        | 57,3±13,8           | 17,8±11,3                   |

|   |                  |     |           |           |
|---|------------------|-----|-----------|-----------|
| 3 | CCR8 (0,1 мг/кг) | 438 | 51,4±13,8 | 21,2±8,4  |
| 4 | CCR8 (0,3 мг/кг) | 375 | 28,9±5,2  | 29,0±15,0 |
| 5 | CCR8 (1 мг/кг)   | 161 | 38±14,7   | 31,7±15,5 |
| 6 | CCR8 (3 мг/кг)   | 207 | 21,6±6,5  | 32,0±13,1 |

Исследования иммунофенотипирования в модели MC38 дополнительно показали, что антитело против mCCR8 индуцирует истощение  $T_{reg}$  дозозависимым образом. В день 5 после введения средняя ( $\pm SD$ ) процентная доля  $T_{reg}$ -клеток (% Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Т-клеток) у мышей, которым вводили антитела против mCCR8 в более низких дозах 0,03 и 0,1 мг/кг оставались сравнимыми с группой, которой вводили изотипический контроль (см. фигуру 24B; таблицу 9).

В день 5 после введения доля (%) инфильтрирующих опухоль CD8<sup>+</sup> Т-клеток повышалась в группах, которым вводили mAb против mCCR8, по сравнению с группой, которой вводили изотипический контроль, как показано на фигуре 24C; таблица 9.

В случае однократной IP дозы mIgG2a против CCR8 наблюдали нелинейную PK в диапазоне доз от 0,03 до 3 мг/кг, что свидетельствует о мишене-опосредованном распределении лекарственного средства (TMDD). По сравнению с дозой 0,3 мг/кг,  $T_{1/2}$  повышается приблизительно в три раза по сравнению с  $T_{1/2}$  для доз 1 и 3 мг/кг (фигура 24D).

#### ПРИМЕР 27

#### mAb ПРОТИВ CCR8 И ПРОТИВ PD-1 СИНЕРГИЧЕСКИ СНИЖАЮТ РОСТ ОПУХОЛИ В МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ МЫШИ MB49

Измеряли противоопухолевую активность mIgG2a против CCR8 в виде монотерапии или в комбинации с Ab против mPD-1 (клон 4H2) в модели карциномы мочевого пузыря мыши MB49, как известно, менее отвечающей на монотерапию антителом против mPD-1. Мышам также вводили контрольное Ab mIgG2a или 4H2 в отдельности. Клон 4H2 антитела против mPD-1 представляет собой химерное mAb крысы-мыши против mPD-1, сконструированное из Ab IgG2a крысы против PD-1 мыши, в котором Fc-часть заменяли Fc-частью из изотипа IgG1 мыши для получения mAb со сниженным связыванием с FcR мыши (Li et al., 2009). Оно блокирует связывание mPD-L1 и mPD-L2 с mPD-1, стимулирует Т-клеточный ответ и демонстрирует противоопухолевую активность у мышей, и его получали, как описано ранее (Li et al., 2009), и экспрессировали в клетках CHO.

Самцам мышей C57BL/6 Foxp3-IRES-EGFP возрастом пятнадцать недель SC инъекцировали  $2 \times 10^5$  опухолевых клеток MB49 и рандомизировали по исследуемым группам по 10 мышей/группу через 9 дней после имплантации опухоли. mAb вводили в количестве 200 мкг/мышь посредством IP инъекций в дни 10, 13 и 18 после имплантации. Измерения опухолей регистрировали дважды в неделю до дня 39, после чего мышей умерщвляли.

Для анализа инфильтрирующих опухоль лимфоцитов собирали опухоли мышей через 17 дней после имплантации. Опухоли расщепляли коллагеназой, подвергали механической диссоциации с использованием диссоциатора OctoMacs (Miltenyi Biotech) и фильтровали через стерильные сита 100 мкм. Образцы блокировали по Fc-рецепторам FcR-блокирующим реагентом с последующим поверхностным окрашиванием на популяции лимфоцитов. Затем клетки промывали и обрабатывали с помощью проточного цитометра. Анализ осуществляли с использованием программного обеспечения FlowJo и строили графики с использованием GraphPad Prism.

Как показано на фигуре 25A, монотерапия антителом против CCR8 и антителом против PD-1 вызывала частичную противоопухолевую активность в модели опухоли мыши MB49, при этом mAb против CCR8 имело более сильный эффект, чем mAb против PD-1. Однако, введение mAb против CCR8 и против PD-1 в комбинации имело синергический эффект почти полного ингибирования роста опухоли, что приводило к тому, что у 8 из 10 мышей не было опухолей. Это свидетельствует о том, что введение антитела против PD-1 может синергически повышать противоопухолевую активность антитела против CCR8 в модели менее иммуногенной опухоли. Комбинацию Ab считают синергической, если противоопухолевый эффект комбинации больше суммы уровней ингибирования, демонстрируемых каждым Ab индивидуально.

На фигуре 25B показана процентная доля опухолеассоциированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, являющихся T<sub>reg</sub>-клетками, после введения различных Ab. Несмотря на схожие уровни истощения опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток и при монотерапии антителом против CCR8, и при использовании комбинации антител против CCR8/против PD-1 комбинация, в группе монотерапии антителом против CCR8 наблюдали недостаточность ингибирования роста опухоли.

На фигуре 25C показана процентная доля опухолеассоциированных CD45<sup>+</sup> Т-клеток, являющихся CD8<sup>+</sup> Т-клетками, после введения различных Ab. Обнаружено, что уровни экспансии CD8<sup>+</sup> Т-клеток являлись схожими в группах монотерапии и комбинированного лечения. Однако качество ответов CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно улучшать посредством комбинированного лечения.

#### ПРИМЕР 28

#### mAb ПРОТИВ CCR8 И ПРОТИВ PD-1 СИНЕРГИЧЕСКИ СНИЖАЮТ РОСТ ОПУХОЛИ В МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ 4T1

Противоопухолевую активность mIgG2a против CCR8 измеряли в виде монотерапии или в комбинации с Ab против PD-1 (клон 4H2) в модели карциномы молочной железы 4T1, другой модели опухоли на мышах, резистентной к монотерапии антителом против mPD-1. Мышам также вводили 4H2 в отдельности и с комбинацией контрольного mIgG2a и Ab mIgG1-D265A. Самкам мышей Balb/C (Envigo, Indianapolis, IN) возрастом пятнадцать недель SC инъецировали 10<sup>6</sup> опухолевых клеток 4T1 и рандомизировали в исследуемые группы по 10 мышей на группу через 7 дней после имплантации опухоли, когда опухоли достигали медианы размера приблизительно 100

мм<sup>3</sup>. Ab вводили в количестве 200 мкг/мышь посредством IP инъекций в дни 7, 10 и 14 после имплантации. Измерения опухоли регистрировали дважды в неделю до дня 27, после чего мышей умерщвляли. Анализ данных и построение графиков осуществляли с использованием GraphPad Prism.

Как показано на фигуре 26, монотерапия антителом против CCR8 вызывала частичную противоопухолевую активность в модели опухоли мыши 4T1, в то время как введение антитела против PD-1 в отдельности не демонстрировало какой-либо противоопухолевой эффективности в этой модели. Несмотря на отсутствие ингибирования роста опухоли под действием антитела против PD-1, комбинация этого Ab и Ab против CCR8 приводила к сильному синергическому взаимодействию, о чем свидетельствует значительное повышение противоопухолевой активности, наблюдаемое в случае антитела против CCR8, при этом 7 из 10 мышей имели объемы опухолей менее 20 мм<sup>3</sup> по сравнению со средними объемами приблизительно 1500 мм<sup>3</sup> у опухолей, демонстрировавших неингибированный рост. В совокупности с данными о MB49 (пример 27), это свидетельствует о том, что в моделях опухолей, резистентных к антителам против PD-1, введение антитела против CCR8 может иметь синергические противоопухолевые эффекты при комбинировании с введением антитела против PD-1.

#### ПРИМЕР 29

#### mAb против CCR8 СНИЖАЮТ РОСТ ОПУХОЛИ В МОДЕЛИ ФИБРОСАРКОМЫ МЫШИ SA1N

Измеряли противоопухолевую активность mIgG2a против CCR8 и сравнивали ее с CCR8-mIgG1-D265A, вариантом с Fc-инертной тяжелой цепью mIgG1-D265A, в модели фибросаркомы мыши SA1N. Каждой из самок мышей A/J SC инъецировали 10<sup>6</sup> опухолевых клеток SA1N и рандомизировали их в исследуемые группы по 9 мышей на группу через 5 дней после имплантации опухоли. Ab (mIgG2a против CCR8, mIgG1-D265A против CCR8 или контрольное mIgG2a) вводили в количестве 200 мкг/мышь в объеме 200 мкл посредством IP инъекций Ab в дни 5, 8 и 12 после имплантации. Измерения опухоли регистрировали дважды в неделю в течение до 57 дней после имплантации, после чего мышей умерщвляли. Анализ данных и построение графиков осуществляли с использованием GraphPad Prism.

Для анализа инфильтрирующих опухоль лимфоцитов собирали опухоли мышей через 16 дней после имплантации. Опухоли подвергали механической диссоциации и фильтровали через стерильные сита 100 мкм. Образцы блокировали по Fc-рецепторам FcR-блокирующим реагентом с последующим поверхностным окрашиванием на популяции лимфоцитов, фиксацией, пермеабиллизацией и внутриклеточным окрашиванием на Foxp3. Затем клетки промывали и обрабатывали с помощью проточного цитометра. Анализ осуществляли с использованием программного обеспечения FlowJo и строили графики с использованием GraphPad Prism.

Данные свидетельствуют о том, что mIgG2a против CCR8 мощно снижало скорость роста опухоли, при этом 9 из 9 мышей не имели опухолей ко дню 25 после имплантации, в



то время как введение контрольного mAb mIgG2a не ингибировало рост опухоли (фигура 27A). Измерения мышей, которым вводили контроль, прекращали через приблизительно 57 дней после имплантации опухоли, после чего оставшихся мышей умерщвляли. Эти данные свидетельствуют о том, что Ab против CCR8 является высокоэффективным в ингибировании роста опухоли в этой модели SA1N на мышах. Примечательно, что введение мышам неистощающего mAb против CCR8 (CCR8-mIgG1-D265A) приводило к частичному ингибированию роста опухоли (фигура 27A), что свидетельствует о том, что по меньшей мере в модели опухоли SA1N вовлечение CCR8 под действием CCL1 может повышать иммуносупрессию  $T_{reg}$ -клеток в микроокружении опухоли.

На фигуре 27B показана процентная доля опухолеассоциированных  $CD4^+$  Т-клеток, являющихся  $T_{reg}$ -клетками, после введения различных Ab. Несмотря на противоопухолевую активность, наблюдаемую в случае введения неистощающего mIgG1-D265A против CCR8, только введение истощающего mIgG2a против CCR8 приводило к истощению опухолевых  $T_{reg}$ . Блокада CCL1-опосредованного повышения супрессии  $T_{reg}$  может приводить к повышенным провоспалительным и противоопухолевым ответам.

#### ПРИМЕР 30

#### ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОБХОДИМ Fc-ВОВЛЕКАЮЩИЙ ИЗОТИП АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR8

Для дальнейшего изучения относительного вклада блокады опосредованного Ab против CCR8 истощения  $T_{reg}$ -клеток в противоопухолевый иммунитет конструировали Ab против mCCR8 (клон SA214G2 от BioLegend) в Fc-вовлекающей (mIgG2a против CCR8) и не-Fc-вовлекающей или инертной (mIgG1-D265A против CCR8) изоформах, и мышам, несущим опухоль MC38, вводили mIgG2a против CCR8 или mIgG1-D265A против CCR8. Изотип mIgG2a сильно активирует Fc-рецепторы для стимуляции ADCC и ADCP, в то время как версия mIgG1-D265A - нет (Baudino et al., 2008; Nimmerjahn et al., 2010). Введение mIgG2a против CCR8 индуцировало значимое регрессирование опухоли (фигуры 28A и D), в то время как введение mIgG1-D265A против CCR8 не имело выраженного эффекта в отношении роста опухоли в этой модели MC38 (фигуры 28A и C) по сравнению с введением IgG2a изотипического контроля (фигуры 28A и B). Важно, что доля  $T_{reg}$ -клеток в опухолях снижалась на 75% после введения mIgG2a против CCR8, в то время как введение mIgG1-D265A против CCR8 не вызывало снижения доли опухолевых  $T_{reg}$ -клеток (фигура 28E). Это отражает результат экспериментов *in vitro*, показавших, что, в то время как mAb 4A19 опосредовало истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток, Ab против CCR8 с инертным остовом (против CCR8-инертное) не истощало  $T_{reg}$ -клетки, что позволяет предполагать, что мишене-опосредованное совместное вовлечение FcγR через nF остов необходимо для истощения  $T_{reg}$  (пример 22). Это также похоже на результат, наблюдаемый в случае модели опухоли SA1N, где, хотя введение mIgG1-D265A против CCR8 приводило к частичному ингибированию роста опухоли (пример 29), иммуносупрессорные опухолевые  $T_{reg}$ -клетки не истощались (фигура 27B).

Фактически, несмотря на схожие характеристики связывания, mIgG2a против CCR8 эффективно перекрестно сшивали FcγRIV в присутствии CCR8-экспрессирующих клеток-мишеней, в то время как изоформа CCR8-mIgG1-D265A - нет (данные не представлены; см. Campbell et al., 2021). Также подтверждали, что оба Ab, mIgG2a против CCR8 и mIgG1-D265A против CCR8, блокировали связывание CCL1 в схожей степени (данные не представлены; см. Campbell et al., 2021).

Можно сделать вывод, что блокада CCR8, как правило, не является необходимой для противоопухолевой активности, но в некоторых высокоиммуногенных опухолях, таких как SA1N, блокада связывания CCL1 может приводить к частичному ингибированию роста опухоли благодаря повышению провоспалительных цитокинов. Большого регрессирования опухоли достигают посредством истощения иммуносупрессорных опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток, для которого необходимо Fc-вовлекающее Ab против CCR8.

#### *Миграция FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> в опухоли является CCR8-независимой*

В качестве ортогонального подхода, смешанные химеры костного мозга получали с использованием конгенного Ccr8<sup>+/+</sup> и Ccr8<sup>-/-</sup> донорского костного мозга для определения того, способствует ли CCR8 хемотаксической миграции T<sub>reg</sub>-клеток в развивающиеся опухоли.

#### *Химера костного мозга*

Самкам мышей-реципиентов (WT-CD45.2-Thy1.1; Jackson Laboratory) давали 2 дозы 4,5 Гр с интервалом 3 ч. с последующим внутривенным введением конгенного CCR8<sup>+/+</sup> (WT-CD45.1-Thy1.2; Jackson Laboratory) и CCR8<sup>-/-</sup> (CCR8KO/B6N-CD45.2; Jackson Laboratory) костного мозга. Мышей держали на воде с антибиотиком, подвергали мониторингу в течение 8 недель и из них получали кровь через 8 недель после трансплантации для оценки реконституции донорских клеток. Затем 10<sup>6</sup> клеток MC38 имплантировали SC. Опухоли, цельную кровь, лимфоузлы и спленоциты собирали через 12 дней для иммунного мониторинга.

После 8-недельной фазы реконституции, эквивалентную реконституцию донорских иммунных клеток наблюдали в крови (данные не представлены). Затем мышам-реципиентам подкожно имплантировали опухоли MC38. CCR8-дефектные FOXP3<sup>+</sup> клетки накапливались в опухолях аналогично соответствующим клеткам дикого типа (фигура 28F), что подтверждает, что миграция FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> в опухоли является CCR8-независимой.

#### **ПРИМЕР 31**

**ОПОСРЕДОВАННОЕ АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ CCR8 ИСТОЩЕНИЕ T<sub>reg</sub> ПОВЫШАЕТ ПОТЕНЦИАЛ ПАМЯТИ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ CD8<sup>+</sup> Т-КЛЕТОК**

Измеряли эффект истощения T<sub>reg</sub> в отношении образования долгоживущих CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, распознающих опухолевый антиген, AN1 (Huang et al., 1996).

Мышам BALB/c подкожно инъецировали 10<sup>6</sup> опухолевых клеток CT26 и их рандомизировали, когда опухоли достигали объема 100-120 мм<sup>3</sup>. Мышам ретроорбитально вводили 200 мкг на дозу mIgG2a против CCR8 и Ab IgG2a против mCTLA-4 или IgG2a

изотипического контроля в дни 1, 4 и 8 после стадирования. Опухоли собирали в день 9 и хирургически резецировали в день 11. Через 3 месяца из мышей получали кровь для количественного анализа АН-1-специфических  $CD8^+$  Т-клеток. Мышей внутривенно стимулировали с помощью  $10^7$  КОЕ рекомбинантных *Listeria monocytogenes*, экспрессирующих пептид АН-1 (LM-АН1А5). *Listeria* культивировали в стерильном модифицированном сердечно-мозговом бульоне (Teknova Inc., Hollister, CA) в течение ночи для достижения культуры стационарной фазы  $10^9$  КОЕ/мл, а затем разводили сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) до  $10^8$  КОЕ./мл для иммунизации. Через пять дней после стимуляции собирали селезенку и кровь и обрабатывали их для проточной цитометрии.

Как и ожидали, IgG2a против mCTLA4 и mIgG2a против CCR8 индуцировали мощные противоопухолевые ответы (фигуры 29А и В) по сравнению с контролем (фигура 29С) и истощение  $T_{reg}$  (фигура 29D). Через день после последнего введения доля АН-1 тетрамер<sup>+</sup> клеток из резецированных опухолей имела тенденцию к повышению у мышей, которым вводили IgG2a против mCTLA-4 или mIgG2a против CCR8 относительно мышей, которым вводили контроль (фигура 29Е), и АН-1 тетрамер<sup>+</sup> клетки оставались повышенными в крови и селезенке через 3 месяца после резекции (фигура 29F). После стимуляции с помощью штамма *Listeria monocytogenes*, экспрессирующего АН-1 для оценки АН-1-специфических анамнестических ответов, мышам исходно вводили IgG2a против mCTLA-4 или mIgG2a против CCR8, вызывавшие более высокую анамнестическую экспансию АН-1 тетрамер<sup>+</sup> клеток эффекторной памяти по сравнению с контрольными мышами (фигура 29G).

Мыши, которым вводили антитело против CCR8, также имели значимо более высокую величину  $IFN\gamma^+$  и полифункциональных  $IFN\gamma^+ FNO\alpha^+ CD8^+$  Т-клеток в селезенке после стимуляции пептидом АН1А5 (фигуры 29H и 29I), что свидетельствует о том, что введение мышам, несущим опухоли, mIgG2a против CCR8 приводит к повышению доли специфических по опухолевому антигену  $CD8^+$  Т-клеток с повышенными эффекторными функциями.

#### ПРИМЕР 32

##### ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ CCR8 НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Данные об экспрессии генов CCR8 и CD8A использовали для приоритизации типов опухолей, при которых можно получить пользу от лечения с помощью Ab против CCR8. Данные об экспрессии генов, полученные посредством секвенирования РНК, из уротелиальной карциномы мочевого пузыря (BLCA), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), плоскоклеточной карциномы шейки матки и эндоцервикальной аденокарциномы (CESC), аденокарциномы толстого кишечника (COAD), карциномы пищевода (ESCA), мультиформной глиобластомы (GBM), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSC), хромофобного почечноклеточного рака (KICH), светлоклеточной карциномы почек (KIRC), папиллярной почечноклеточной карциномы (KIRP), острого миелолейкоза (LAML), глиомы головного мозга низкой степени злокачественности

(LGG), печеночноклеточной карциномы печени (LIHC), аденокарциномы легких (LUAD), плоскоклеточной карциномы легких (LUSC), мезотелиомы (MESO), серозной цистаденокарциномы яичника (OV), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), феохромоцитомы и параганглиомы (PCPG), аденокарциномы предстательной железы (PRAD), аденокарциномы прямой кишки (READ), саркомы (SARC), кожной меланомы (SKCM), аденокарциномы желудка (STAD), THCA, UCEC и UVM анализировали с помощью данных, полученных исследовательской сетью TCGA, доступных по адресу <https://www.cancer.gov/tcga>. Инициатива Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET, <https://ocg.cancer.gov/programs/target>), данные которой доступны по адресу <https://portal.gdc.cancer.gov/projects>, и наборы данных M2GEN Oncology Research Information Exchange Network (ORIEN) <https://www.oriencancer.org/> использовали для исследования гематологических опухолей.

Сравнивали TMM-нормализованные log2-преобразованные значения CPM CCR8 и CD8A и соотношения CCR8/CD8A среди типов опухолей. Обнаружили, что HNSC, LUAD, STAD, LUSC, PAAD, READ, ESCA, BRCA, COAD, CESC, фолликулярная лимфома, острый лимфоцитарный лейкоз и лимфома имели наиболее высокую относительную экспрессию CCR8 среди исследуемых типов опухолей. KIRC, LUAD, LUSC, SKCM, STAD, CESC, MESO, HNSC, PAAD и BRCA имеют наиболее высокую относительную экспрессию CD8A среди типов опухолей. Соотношения CD8A/CCR8 использовали для улучшения CD8A-положительных опухолей, также имеющих экспрессию CCR8. HNSC, STAD, LUAD, BRCA, LUSC, PAAD, LAML, CESC, SKCM и MESO имеют наиболее высокую относительную экспрессию CD8A/CCR8 среди анализируемых типов опухолей.

Относительная высокая экспрессия CCR8 и CD8A и высокое соотношение CCR8/CD8A определяют HNSC, LUAD, STAD, LUSC, PAAD, READ, ESCA, BRCA, COAD, CESC, фолликулярную лимфому, острый лимфоцитарный лейкоз и лимфому как типы опухолей, которые, как ожидают, будут особенно восприимчивы к лечению с помощью Ab против CCR8.

### ПРИМЕР 33

#### ЭКСПРЕССИЯ CCR8 ВО МНОЖЕСТВЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Для профилирования экспрессии CCR8 среди множества типов злокачественных новообразований для подтверждения выбора показаний, учитывая основополагающую гипотезу о том, что типы опухолей с более высокими уровнями экспрессии CCR8 наиболее вероятно ответят на терапию mAb против CCR8, осуществляли иммуногистохимию (ИHC) на 17 типах или подтипах злокачественных новообразований из двух наборов образцов (наборы TR-TP и MTB).

Исследовали набор образцов TR-TP, содержащий полноразмерные, фиксированные формалином, погруженные в парафин (FFPE) препараты 6 типов/подтипов опухолей, включая колоректальную аденокарциному (CRC), плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточную аденокарциному легких (NSCLC-AD),

немелкоклеточную плоскоклеточную карциному легких (NSCLC-SQC), карциному поджелудочной железы и мелкоклеточную карциному легких (SCLC), с 14-24 образцами на тип опухоли. FFPE-образцы тканей получали от различных коммерческих поставщиков тканей.

Кроме того, исследовали многоопухолевые блоки (MTB), содержащие 16 типов/подтипов опухолей включая рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, CRC, рак эндометрия, рак желудка, GBM, HNSCC, меланому, NHL, NSCLC-AD, NSCLC-SQC, рак яичника, RCC, рак предстательной железы и карциному поджелудочной железы, с 20 типами случаев/опухолей. Каждый MTB содержал 5 случаев одного показания на блок FFPE и 1 гиперпластическую миндалину в качестве положительного контроля. MTB делали на заказ в Discovery Life Sciences.

Для детекции связывания тканевого CCR8 разрабатывали автоматизированный анализ ИHC и валидировали его с помощью коммерческого mAb мыши против hCCR8, клона 433H (BD Biosciences) и системы Leica Bond RX (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL). Препараты депарафинизировали и регидратировали после общепринятых гистологических операций. Влажные препараты загружали на автоматизированное устройство для ИHC-окраски Leica BondRX для теплового демаскирования антигена (HIER) и окрашивания. HIER осуществляли с использованием раствора для демаскирования Leica Bond ER2 (pH 9) при 100°C в течение 30 мин и ИHC-окрашивание CCR8 осуществляли с использованием системы точной детекции на основе полимера Bond (Leica). В кратком изложении, осуществляли блокирование пероксидазы (Leica) в течение 10 мин с последующим блокированием неспецифического связывания с использованием бессывороточного блокатора белков Dako (Agilent, Santa Clara, CA), дополненного 0,5% гаммаглобулинами человека (Sigma), в течение 20 мин. Первичное Ab 433H инкубировали в течение 60 мин в количестве 0,25 мкг/мл с последующим добавлением линкерного антитела кролика против мыши, и затем поли-HRP-IgG против кролика (Leica) по 8 мин каждое. И наконец, проводили реакцию препаратов с раствором субстрата-хромогена DAB (Leica) в течение 10 мин. Затем препараты докрашивали гематоксилином (Leica) в течение 5 мин и дегидратировали, очищали и закрывали покровным стеклом после общепринятых гистологических операций. Окрашенные препараты сканировали с использованием сканера Leica AT Turbo и осуществляли анализ визуализации целых препаратов с использованием программного обеспечения HALO® (Indica Labs, Albuquerque, NM). Экспрессию CCR8 регистрировали как процентную долю положительных клеток из всех клеток в области опухоли. В небольшой подгруппе образцов, когда баллы анализа изображений не приводили к точному результату по мнению сертифицированного патолога, патолог осуществлял визуальную балльную оценку вручную.

Сильное CCR8-положительное окрашивание, главным образом, распределялось в субпопуляции иммунных клеток, демонстрирующих и мембранные, и цитоплазматические паттерны. В небольшом количестве случаев также наблюдали

цитоплазматическое окрашивание в опухолевых клетках от слабого до умеренного. Анализ визуализации целых препаратов CCR8<sup>+</sup> клеток в полноразмерных тканевых срезах TR-TP показано на фигуре 30А, в то время как анализ визуализации целых препаратов CCR8<sup>+</sup> клеток в наборе МТВ показан на фигуре 30В. Оба набора данных TR-TP и МТВ свидетельствуют о том, что среди 17 оцениваемых типов опухолей, экспрессия CCR8 являлась наиболее высокой в HNSCC и наименее высокой в GBM. В порядке от наибольшей к наименьшей экспрессии CCR8 когорты опухолей ранжировали следующим образом: HNSCC, рак шейки матки, CRC, NSCLC-SCC, NSCLC-ADC, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, карциномы молочной железы, рак яичников и GBM. Когорты опухолей RCC, рака предстательной железы, меланомы, рака эндометрия и NHL демонстрировали схожие уровни экспрессии CCR8, которые были ниже экспрессии, наблюдаемой в когорте рака молочной железы.

основываясь на гипотезе о том, что опухоли с высокой экспрессией CCR8 более вероятно ответят на терапию mAb против CCR8, эти данные профилирования опухолей подтверждают приоритизацию выбора показаний в отношении HNSCC, рака шейки матки, CRC, NSCLC-SCC, NSCLC-ADC, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака мочевого пузыря и рака молочной железы.

#### ПРИМЕР 34

#### КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗЫ 1/2 АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR8 В ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Исследование фазы 1/2 mAb 4A19 против CCR8, вводимого в виде монотерапии и в комбинации с mAb против PD-1 ниволумабом, осуществляют на индивидуумах, имеющих выбранные солидные опухоли на поздней стадии, а именно NSCLC, SCCHN, CRC, рак желудка/гастроэзофагеального перехода (GE) и рак шейки матки, для оценки, в частности, безопасности, переносимости и предварительной эффективности введения 4A19 в виде монотерапии и комбинированного лечения с ниволумабом.

##### *Дизайн исследования*

Настоящее исследование состоит из 4 частей: 4A19, вводимое в виде монотерапии в фазу повышения дозы (часть 1А) и фазу расширения выборки получающих дозу (часть 2А), и 4A19, вводимое в комбинации с ниволумабом в фазу повышения дозы (часть 1В) и фазу расширения выборки получающих дозу (часть 2В).

В фазу повышения дозы для идентификации подходящих доз антитела против CCR8 вводят диапазон доз 4A19 по меньшей мере 3 индивидуумам для каждой дозы, за исключением наименьших 2 уровней доз при монотерапии 4A19, состоящих из по меньшей мере 1 индивидуум на уровень дозы для минимизации количества участников, которым вводили 4A19 в потенциально субэффективных дозах. В части 1А 4A19 вводят индивидуумам внутривенно (IV) в базовой дозе 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 и 800 мг один раз в 2 недели (Q2W). Начальную базовую дозу, впервые используемую на человеке (FIH), 0,3 мг (4 мкг/кг) IV Q2W для 4A19 получали с использованием совокупности данных, полученных из смешения фармакологических и токсикологических подходов с целью

обеспечения адекватной безопасности при минимизации воздействия на участников потенциально субэффективных доз и риска высвобождения цитокинов.

В части 1В 4А19 вводят индивидуумам внутривенно (IV) в тех же базовых дозах в комбинации с ниволумабом, вводимым IV в одобренной FDA базовой дозе 480 мг один раз в 4 недели (Q4W).

Для фазы расширения выборки получающих дозу открывают несравнимые и рандомизированные когорты, включающие различные типы опухолей и уровни доз из фазы повышения доз, для проведения монотерапии и комбинированного лечения по меньшей мере 20 индивидуумов на когорту.

Все индивидуумы завершали до 3 периодов исследования:

(а) скрининг (до 28 дней), в течение которого индивидуумов оценивают для проверки соответствия критериям пригодности и получают свежие биоптаты опухоли;

(b) лечение (до 26 циклов исследуемой терапии [104 недели] от первого лечения, независимо от задержек в лечении, 28 дней на цикл); и

(с) последующее наблюдение, включая последующее наблюдение для оценки безопасности и выживания (до 2 лет после окончания периодов лечения [EOT])). Максимальная длительность участия в исследовании составляет приблизительно 4 года (до 28 дней скрининга, лечение до 2 лет и последующее наблюдение до 2 лет).

Аб-лекарственные средства вводят индивидуумам до возникновения прогрессирования, неприемлемой токсичности, отзыва согласия на участие, завершения 26 циклов исследуемой терапии (104 недели) или окончания исследования, в зависимости от того, что произойдет первым.

Таблица 10. SEQ ID NO и Совокупность аминокислотных последовательностей

| SEQ ID NO | Описание последовательности                     | Аминокислотная последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | Аминокислотная последовательность CCR8 человека | MDYTLDLSTV TVTDYYYPDI FSSPCDAELI<br>QTNGKLLAV FYCLLFVFS L LGNSLVILVL<br>VVCKKLRSIT DVYLLNLALS DLLFVFSFPF<br>QTYLLDQWV FGTVMCKVVS GFYYIGFYSS<br>MFFITLMSVD RYLAVVHAVY ALKVRTIRMG<br>TTLCLAVWLT AIMATIPLLV FYQVASEDGV<br>LQCYSFYNNQ TLKWKIFTNF KMNILGLLIP<br>FTIFMFCYIK ILHQLKRCQN HNKTKAIRLV<br>LIVVIASLLF WVPFNVVLFL TSLHSMHILD<br>GCSISQQLTY ATHVTEIISF THCCVNPVIY<br>AFVGEKFKKH LSEIFQKSCS QIFNYLGRQM<br>PRESCEKSSS CQQHSSRSSS VDYIL |
| 2         | Аминокислотные                                  | YYYPDIF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

|    |                                                                    |                                                                                                                                                    |
|----|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | остатки<br>последовательности<br>CCR8 человека                     |                                                                                                                                                    |
| 3  | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 16B13 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS<br>SFNMNWVRQA PGKGGLEWISY ISSGSTTIAH<br>ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED<br>TAVYYCVRRLL KGSFDYWGQG TLVTVSS        |
| 4  | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 14S15 | EVQLVEFGGG LVQPKGSLKL SCVVSGFRFN<br>PYAMNWVRQA PGKGGLEWLGR IRSKSNNYET<br>YYADSVKDRF IISRDDSQKM VYLQMNNVKT<br>EDTAMYYCVG YSDLYVLDYW GQGTSTVTVSS     |
| 5  | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 18Y12 | QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT<br>DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA IDPKTGSTAY<br>NQKFKGKAIM TADKSSSTAY MELRSLTSED<br>SVVYYCTGLR RFVYWGQGTP VTVSA            |
| 6  | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 4A19  | QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT<br>DSEMHWVRQA TGQGLEWMGA IQPETGGTAY<br>NQKFKARVTM TRDTSISTAY MELSSLRSED<br>TAVYYCARRR RNFYDWGQGT LTVTVSS          |
| 7  | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 2M18  | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCVVSGFTFS<br>NFMNIWVRQV PGKGGLEWISH ISRGGTINIH<br>ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED<br>TAVYYCARRR LGVFDYWGQG TLVTVSS         |
| 8  | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 15C17 | QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS<br>SYDMNWVRQA PGKGGLEWISY ISSSNGNKH<br>ADSVKGRFTI SRDNAENSLY LQMNSLRDED<br>TAVYYCARRR QGVFDIWGQG TLVTVSS          |
| 9  | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 13T20 | QVQLVESGGG LVKPRGSLRL SCAASGFTFS<br>VAWMHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKTDGGTT<br>DYATPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMHSLLKT<br>EDTAVYYCTV VTMVRGVLYD FWGQGT LTVTV SS |
| 10 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 10R3  | QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS<br>SYAMHWVRQA PGKGLEWVGI ISYDGSNKYY<br>ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED                                           |



|    |                                                                    |                                                                                                                                               |
|----|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                    | TALYSCARVP NWRGAFDIWG QGTMVTVSS                                                                                                               |
| 11 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 8D55  | QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS<br>NYNMIWVRQT PGKGLEWISY ISSRSIISY<br>ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED<br>TAVYYCARRW KGVFDYWGQG TLVTVSS      |
| 12 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 1V11  | QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS<br>NYAMHWVRQA PGKGLDWLAV ISYDGSNKYH<br>SDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQINSLRAED<br>AAVYYCARRG ELGIGGFDYW GQGTTLVTVSS |
| 13 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 11K16 | QVQLVESGGG LVLPGGSLRL SCAASGFTFS<br>SNNMIWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTISY<br>ADSVRGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRDED<br>TAVYYCARRW RGVFDYWGQG TLVTVSS    |
| 14 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 12F27 | QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFR<br>SYGIHWVRQA PGKGLEWVAV ISYEGSNKRY<br>ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED<br>TAVYYCAKGR RPSGEGAFDI WGQGTMTVS S |
| 15 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 16B13 | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS<br>SWLAWYQQKP EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS<br>RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ<br>YNSYPPTFGQ GTKVEIK                |
| 16 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 14S15 | DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSL<br>HSNGNTFLYW FLQRPQGSPQ LLIYRMSNLA<br>SGVPHRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV<br>YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IK           |
| 17 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 18Y12 | DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSRQSLV<br>HSSGYTYLHW YLQKPGQSPK LLIYRVSNRF<br>SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV<br>YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IK           |
| 18 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 4A19  | DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLF<br>HSSGNTYLHW YLQKPGQPPQ LLIYKVSNRF<br>SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV<br>YYCSQSTHVP FTFGQGTKLE IK          |
| 19 | Аминокислотная                                                     | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS                                                                                                              |

|    |                                                                    |                                                                    |                                        |                                        |
|----|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
|    | последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 2M18                    | SWLAWYQQKP<br>RFSGSGSGTD<br>YNSYPPTFGG GTKVEIK                     | EKAPKSLIYA<br>FTLTISLQP                | ASSLQSGVPS<br>EDFATYYCQQ               |
| 20 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 15C17 | DIVMTQSPSS<br>RWLAWYQQKP<br>RFSGSGSGTD<br>YNSYPPTFGG GTKVEIK       | LSASVGDRVT<br>EKAPKSLIYA<br>FTLTISLQP  | ITCRASQGIS<br>ASSLQSGVPS<br>EDFATYYCQQ |
| 21 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 13T20 | DIVMTQSPGT<br>SNYLA WYQQK<br>DRFSGSGSGT<br>QYGSSRTFGG GTKVEIK      | LSLSPGERAT<br>PGQAPRLLIY<br>DFTLTISRLE | LSCRASQSVS<br>GASSRATGIP<br>PEDFAVYYCQ |
| 22 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 10R3  | EIVLTQSPDF<br>SHLHWYQQKP<br>RFSGSGSGTD<br>SYSPLTFGG GTKVEIK        | QSVTPKEKVT<br>DQSPKLLIKY<br>FSLTINSLET | ITCRASQSIG<br>ASQSFSGVPS<br>EDAATYFCHQ |
| 23 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 8D55  | DIVMTQSPSS<br>SWLAWYQQKP<br>RFSGSGSGTD<br>YNSYPPTFGG GTKVEIK       | LSASVGDRVT<br>EKAPKSLIYA<br>FTLTISLQP  | ITCRASQGIS<br>ASSLQSGVPS<br>EDFATYYCQQ |
| 24 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 1V11  | DIVMTQTPLS<br>HTDGNTYLNW<br>SGVPDRFSGS<br>YYCMQATQFP LTFGPGTKVD IK | SPVTLGRPAS<br>LQQRPGQPPR<br>GAGTDFTLKI | ISCRSSRSLV<br>LLIYKISNRF<br>TRVEAEDVGV |
| 25 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 11K16 | DIVMTQSPSS<br>SWLAWYQQKP<br>RFSGSGSGTD<br>YNSYPPTFGG GTKVEIK       | LSASVGDRVT<br>EKAPKSLIYA<br>FTLTISLQP  | ITCRASQGIS<br>ASSLQSGVPS<br>EDFATYYCQQ |
| 26 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 12F27 | DIQMTQSPSS<br>SWLAWYQQKP<br>RFSGSGSGTD<br>YNSFPPTFGG GTKVEIK       | LSASVGDRVT<br>EKAPKSLIYA<br>FTLTISLQP  | ITCRASQGIS<br>ASSLQSGVPS<br>EDFATYYCQQ |
| 27 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb  | GFTFSSFNMN                                                         |                                        |                                        |

|    |                                                                            |                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|    | 16B13                                                                      |                      |
| 28 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>16B13 | YISSGSTTIA HADSVKG   |
| 29 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>16B13 | RLKGSFDY             |
| 30 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>16B13 | RASQGISSWL A         |
| 31 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>16B13 | GASRLQS              |
| 32 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>16B13 | QQYNSYPPT            |
| 33 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>14S15 | GFRFNPYAMN           |
| 34 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>14S15 | RIRSKSNNYE TYYADSVKD |
| 35 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>14S15 | YSDLYVLDY            |
| 36 | Аминокислотная                                                             | RSSKSLLSN GNTFLY     |

|    |                                                                            |                    |
|----|----------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|    | последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>14S15                   |                    |
| 37 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>14S15 | RMSNLAS            |
| 38 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>14S15 | MQHLEYPFT          |
| 39 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>18Y12 | GYTFTDYEMH         |
| 40 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>18Y12 | AIDPKTGSTA YNQKFKG |
| 41 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>18Y12 | LRRFVY             |
| 42 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>18Y12 | RSSKSLHNSN GNTFLY  |
| 43 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>18Y12 | RVSNRFS            |
| 44 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb          | SQSTHVPFT          |

|    |                                                                           |                    |
|----|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|    | 18Y12                                                                     |                    |
| 45 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>4A19 | GYTFTDSEMH         |
| 46 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>4A19 | AIQPETGGTA YNQKFKA |
| 47 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>4A19 | RRRNFDY            |
| 48 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>4A19 | RSSQSLFHSS GNTYLH  |
| 49 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>4A19 | KVSNRFS            |
| 50 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>4A19 | SQSTHVPFT          |
| 51 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>2M18 | GFTFSNFMNI         |
| 52 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>2M18 | HISRGGTTIN HADSVKG |
| 53 | Аминокислотная                                                            | RLGVFDY            |

|    |                                                                            |                    |
|----|----------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|    | последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>2M18                    |                    |
| 54 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>2M18  | RASQGISSWL A       |
| 55 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>2M18  | AASSLQS            |
| 56 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>2M18  | QQYNSYPPT          |
| 57 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>15C17 | GFTFSSYDMN         |
| 58 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>15C17 | YISSSNGNKH HADSVKG |
| 59 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>15C17 | RQGVFDI            |
| 60 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>15C17 | RASQGISRWL A       |
| 61 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb          | AASSLQS            |

|    |                                                                            |                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|    | 15C17                                                                      |                      |
| 62 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>15C17 | QQYNSYPPT            |
| 63 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>13T20 | GFTFSVAWMH           |
| 64 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>13T20 | RIKSKTDGGT TDYATPVKG |
| 65 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>13T20 | VTMVRGVLYD F         |
| 66 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>13T20 | RASQSVSSNY LA        |
| 67 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>13T20 | GASSRAT              |
| 68 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>13T20 | QQYGSSRT             |
| 69 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>10R3  | GFTFSSYAMH           |
| 70 | Аминокислотная                                                             | IISYDGSNKY YADSVKG   |

|    |                                                                  |                   |
|----|------------------------------------------------------------------|-------------------|
|    | последовательность<br>CDR2 $V_H$ в mAb<br>10R3                   |                   |
| 71 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 $V_H$ в mAb<br>10R3 | VPNWRGAFDI        |
| 72 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 $V_L$ в mAb 10R3    | RASQSIGSHL H      |
| 73 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 $V_L$ в mAb 10R3    | YASQSFS           |
| 74 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 $V_L$ в mAb 10R3    | HQSYSLPLT         |
| 75 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 $V_H$ в mAb<br>8D55 | GFTFSNYNMI        |
| 76 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 $V_H$ в mAb<br>8D55 | YISSRSIIS YADSVKG |
| 77 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 $V_H$ в mAb<br>8D55 | RWKGVFDY          |
| 78 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 $V_L$ в mAb<br>8D55 | RASQGISSWL A      |
| 79 | Аминокислотная<br>последовательность                             | AASSLQS           |



|    |                                                                            |                   |
|----|----------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|    | CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>8D55                                          |                   |
| 80 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>8D55  | QQYNSYPPT         |
| 81 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>1V11  | GFTFSNYAMH        |
| 82 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>1V11  | YDGSNKYHSD SVKG   |
| 83 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>1V11  | RGELGIGGFD Y      |
| 84 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>1V11  | RSSRSLVHTD GNTYLN |
| 85 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>1V11  | KISNRFS           |
| 86 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>1V11  | MQATQFPLT         |
| 87 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>11K16 | GFTFSSNNMI        |

|    |                                                                            |                    |
|----|----------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 88 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>11K16 | YISSSSSTIS YADSVRG |
| 89 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>11K16 | RWRGVFDY           |
| 90 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>11K16 | RASQGISSL A        |
| 91 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>11K16 | AASSLQS            |
| 92 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>11K16 | QQYNSYPPT          |
| 93 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>12F27 | GFSFRSYGIH         |
| 94 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>12F27 | VISYEGSNKR YADSVKG |
| 95 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>12F27 | GRRPSGEGAF DI      |
| 96 | Аминокислотная<br>последовательность                                       | RASQGISSL A        |

|     |                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>12F27                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 97  | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>12F27 | AASSLQS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 98  | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>12F27 | QQYNSFPPT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 99  | Аминокислотная<br>последовательность<br>тяжелой цепи mAb<br>16B13          | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS<br>SFNMNWVRQA PGKGGLEWISY ISSGSTTIAH<br>ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED<br>TAVYYCVRRL KGSFDYWGQG TLVTVSSAST<br>KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY<br>SLSSVVTGPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK<br>VDKRVEPKSC DKHTTCPPCP APELLGGPSV<br>FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY<br>RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA<br>PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN<br>YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG<br>NVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSPGK |
| 100 | Аминокислотная<br>последовательность<br>тяжелой цепи mAb<br>14S15          | EVQLVEFGGG LVQPKGSLKL SCVVS GFRFN<br>PYAMNWVRQA PGKGGLEWLGR IRSKSNNYET<br>YYADSVKDRF IISRDDSQKM VYLQMNNVKT<br>EDTAMYVCVG YSDLYVLDYW GQGTSTVTVSS<br>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVK<br>DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS<br>NTKVDKRVEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG<br>PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN                                                                                                                                                                                 |

|     |                                                                   |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                |
|-----|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                   | STYRVVSVLT<br>LPAPIEKTIS<br>MTKNQVSLTC<br>ENNYKTTTPV<br>QQGNVFSCSV                                                                                                                                        | VLHQDWLNGK<br>KAKGQPREPQ<br>LVKGFYPSDI<br>LDSGSSFFLY<br>MHEALHNHYT                                                                                                                                        | EYKCKVSNKA<br>VYTLPPSREE<br>AVEWESNGQP<br>SKLTVDKSRW<br>QKSLSLSPGK                                                                                                                                             |
| 101 | Аминокислотная<br>последовательность<br>тяжелой цепи mAb<br>18Y12 | QVQLQQSGAE<br>DYEMHWVKQT<br>NQKFKGKAIM<br>SVVYYCTGLR<br>PSVFPLAPSS<br>PVTVSWNSGA<br>SSVVTVPSSS<br>KRVEPKSCDK<br>FPPKPKDTLM<br>VKFNWYVDGV<br>VSVLTVLHQD<br>EKTISKAKGQ<br>VSLTCLVKGF<br>TTPPVLDSDG<br>FSCSV | LVRPGASVTL<br>PVHGLEWIGA<br>TADKSSSTAY<br>RFVYWGQGTP<br>KSTSGGTAAL<br>LTSGVHTFPA<br>LGTQTYICNV<br>THTCPPCPAP<br>ISRTPEVTCV<br>EVHNAKTKPR<br>WLNGKEYKCK<br>PREPQVYTL<br>YPSDIAVEWE<br>SFFLYSKLTV<br>HNHYT  | SCKASGYTFT<br>IDPKTGSTAY<br>MELRSLTSED<br>VTVSAASTKG<br>GCLVKDYFPE<br>VLQSSGLYSL<br>NHKPSNTKVD<br>ELLGGPSVFL<br>VVDVSHEDPE<br>EEQYNSTYRV<br>VSNKALPAPI<br>PSREEMTKNQ<br>SNGQPENNYK<br>DKSRWQQGNV<br>QKSLSLSPGK |
| 102 | Аминокислотная<br>последовательность<br>тяжелой цепи mAb<br>4A19  | QVQLVQSGAE<br>DSEMHVVRQA<br>NQKFKARVTM<br>TAVYYCARRR<br>GPSVFPLAPS<br>EPVTVSWNSG<br>LSSVVTVPSS<br>DKRVEPKSCD<br>LFPPKPKDTL<br>EVKFNWYVDG<br>VSVLTVLHQ<br>IEKTISKAKG<br>QVSLTCLVKG<br>KTTTPVLDS<br>VFSCSV  | VKKPGASVKV<br>TGQGLEWMGA<br>TRDTSISTAY<br>RNFYWGQGT<br>SKSTSGGTAA<br>ALTSGVHTFP<br>SLGTQTYICN<br>KTHTCPPCPA<br>MISRTPEVTC<br>VEVHNAKTKP<br>DWLNGKEYKC<br>QPREPQVYTL<br>FYPSDIAVEW<br>GSFFLYSKLT<br>LHNHYT | SCKASGYTFT<br>IQPETGGTAY<br>MELSSLRSED<br>LVTVSSASTK<br>LGCLVKDYFP<br>AVLQSSGLYS<br>VNHKPSNTKV<br>PELLGGPSVF<br>VVVDVSHEDP<br>REEQYNSTYR<br>KVSNAKALPAP<br>PPSREEMTKN<br>ESNGQPENNY<br>VDKSRWQQGN<br>SLSPG     |

|     |                                                                             |                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 103 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>H</sub> в mAb<br>14S15h | GFRFGPYAMN                                                                                                                                                                                                            |
| 104 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>H</sub> в mAb<br>14S15h | RIRSKSNNYE TYYADSVKD                                                                                                                                                                                                  |
| 105 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>H</sub> в mAb<br>14S15h | YSDLYVLDY                                                                                                                                                                                                             |
| 106 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR1 V <sub>L</sub> в mAb<br>14S15h | RSSKSLLSQGNTFLY                                                                                                                                                                                                       |
| 107 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR2 V <sub>L</sub> в mAb<br>14S15h | RMSNLAS                                                                                                                                                                                                               |
| 108 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CDR3 V <sub>L</sub> в mAb<br>14S15h | MQHLEYPFT                                                                                                                                                                                                             |
| 109 | Аминокислотные<br>остатки 12-22<br>последовательности<br>CCR8 человека      | VTDYYYPDIFS                                                                                                                                                                                                           |
| 110 | Аминокислотная<br>последовательность<br>тяжелой цепи mAb<br>12F27           | QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFR<br>SYGIHWVRQA PGKGLEWVAV ISYEGSNKRY<br>ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED<br>TAVYYCAKGR RPSGEGAFDI WGQGTMTVTVS<br>SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV<br>KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS |

|     |                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                  | SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP<br>SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG<br>GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ<br>PENNYKTPP VLDSDGFFL YSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K |
| 111 | Аминокислотная<br>последовательность<br>легкой цепи mAb<br>16B13 | DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIS<br>SWLAWYQQKP EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS<br>RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ<br>YNSYPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP<br>SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV<br>DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT<br>LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC                                                                   |
| 112 | Аминокислотная<br>последовательность<br>легкой цепи mAb<br>14S15 | DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSL<br>HSNGNTFLYW FLQRPQGSPQ LLIYRMSNLA<br>SGVPHRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV<br>YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL<br>SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV<br>TKSFNRGEC                                                           |
| 113 | Аминокислотная<br>последовательность<br>легкой цепи mAb<br>18Y12 | DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSRQSLV<br>HSSGYTYLHW YLQKPGQSPK LLIYRVSNRF<br>SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV<br>YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL<br>SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV<br>TKSFNRGEC                                                          |
| 114 | Аминокислотная<br>последовательность<br>легкой цепи mAb          | DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLF<br>HSSGNTYLHW YLQKPGQPPQ LLIYKVSNRF<br>SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV                                                                                                                                                                                                                        |

|     |                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 4A19                                                                | YYCSQSTHVP    FTFGQGTKLE    IKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQL    KSGTASVVCL    LNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQ    SGNSQESVTE    QDSKDSTYSL<br>SSTLTLSKAD    YEKHKVYACE    VTHQGLSSPV<br>TKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 115 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>H</sub> в mAb 14S15h | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFRFGPYAMN<br>WVRQAPGKGLEWVGRIRSKSNNYETYYADSVKDR<br>FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVGYSDL<br>YVLDYWGGQGLTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 116 | Аминокислотная<br>последовательность<br>V <sub>L</sub> в mAb 14S15h | DIVMTQTTPPSLPVNPGEPAISCRSSKSLLSQGNTF<br>LYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNLAGVPDRFSGSGS<br>GSDFTLKISWVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGPGT<br>KVDIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 117 | Аминокислотная<br>последовательность<br>тяжелой цепи mAb<br>14S15h  | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFRFGPYAMN<br>WVRQAPGKGLEWVGRIRSKSNNYETYYADSVKDR<br>FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVGYSDL<br>YVLDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA<br>VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT<br>KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT<br>LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 118 | Аминокислотная<br>последовательность<br>легкой цепи mAb<br>14S15h   | DIVMTQTTPPSLPVNPGEPAISCRSSKSLLSQGNTF<br>LYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNLAGVPDRFSGSGS<br>GSDFTLKISWVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGPGT<br>KVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF<br>YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 119 | Аминокислотная<br>последовательность                                | DIQMTQSPSS    LSASVGDRVT    ITCRASQGIS<br>SWLAWYQQKP    EKAPKSLIYA    ASSLQSGVPS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|     |                                                   |                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                            |
|-----|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | легкой цепи mAb<br>12F27                          | RFSGSGSGTD<br>YNSFPPTFGQ<br>SDEQLKSGTA<br>DNALQSGNSQ<br>LSKADYEKHK                                                                                                        | FTLTISSLQP<br>GTKVEIKRTV<br>SVVCLLNNFY<br>ESVTEQDSKD<br>VYACEVTHQG                                                                                          | EDFATYYCQQ<br>AAPSVFIFPP<br>PREAKVQWKV<br>STYLSSTLT<br>LSSPVTKSFN<br>RGEC                                                                                                  |
| 120 | Аминокислотная<br>последовательность<br>CCR8 мыши | MDYTMEPNVT<br>GSMLYLAILY<br>NSLVILVLVGCKKLR<br>LFLVSIPFQT<br>YYIGFFSSMF<br>KVRTASVGTA<br>QVASEDGMLQ<br>NALGLLLPFA<br>RTRAIKLVLT<br>LHDLHILDGC<br>CCVNPVIYAF<br>FLYLGRQMPV | MTDYYPDFFT<br><br>YLLNLAASDL<br>HNLLDQWVFG<br>FITLMSVDRY<br>LSLTVWLA AV<br>CFQFYEEQSL<br>ILLFCYVRIL<br>VVIVSLLFWV<br>ATRQRLALAI<br>IGEKFKKHLM<br>GALERQLSSN | APCDAEFLLR<br>CVLFLVGLLG<br>YLLNLAASDL<br>TAMCKVVSGL<br>LAIVHAVYAI<br>TATIPLMVFY<br>RWKLFTHFEI<br>QQLRGCLNHN<br>PFNVALFLTS<br>HVTEVISFTH<br>DVFQKSCSHI<br>QRSSHSTLD<br>DIL |

## ССЫЛКИ

Abhinandan KR, Martin AC (2008) Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol* 45:3832-3839.

Akinleye A, Rasool Z (2019) Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J HematolOncol* 12(92).

Al-Lazikani, Lesk AM, Chothia C (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273(4):927-48.

Alvisi G, Brummelman J, Puccio S, Mazza EMC, Tomada EP, Losurdo A et al. (2020) IRF4 instructs effector Treg differentiation and immune suppression in human cancer. *J Clin Invest* 130(6):3137-50.

Arce Vargas F, Furness AJS, Solomon I, Joshi K, Mekkaoui L (2017) Fc-optimized anti-CD25 depletes tumor-infiltrating regulatory T cells and synergizes with PD-1 blockade to eradicate established tumors. *Immunity* 46(4):577-86.

Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals JP et al. (2012) Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PloS One* 7(2): e30852.

BarsheshetY, Wildbaum G, Levy E, Vitenshtein A, Akinseye C et al. (2017) CCR8+FOXP3+ Treg cells as master drivers of immune regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 14(23):6086-91.



Baudino L, Shinohara Y, Nimmerjahn F, Furukawa J-I, Nakata M, Martínez-Soria E et al. (2008) Crucial role of aspartic acid at position 265 in the CH2 domain for murine IgG2a and IgG2b Fc-associated effector functions. *J Immunol* 181(9):6664-9.

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J et al. (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28:3167-75.

Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ (2015) Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity. *Future Oncol* 11(9):1307-26.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL et al. (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366:2455-65.

Callahan M, Postow MA, Wolchok JD (2016) Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity* 44(5):1069-78.

Campbell JR, McDonald BR, Mesko PM, Siemers NO, Singh PB et al. (2021) Fc-optimized anti-CCR8 antibody depletes regulatory T cells in human tumor models. *Cancer Res* (in press).

Chakravarthi BVSK, Nepal S, Varambally S (2016) Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol* 186(7): 1724-35.

Chothia C, Lesk AM (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-17.

Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill JS et al. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342:877-83.

Dall'Ozzo S, Tartas S, Pintaud G, Cartron G, Colombat P, et al. (2004) Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64:4664-9.

Dépis F, Hu C, Weaver J, McGrath L, Klebanov B et al. (2020) Preclinical evaluation of JTX-1811, an anti-CCR8 antibody with enhanced ADCC activity, for preferential depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells [abstract]. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020; 2020 Apr 27-28 and Jun 22-24. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 80(16 Suppl):Abstract nr 4532.

De Simone M, Arrigoni A, Rossetti G et al. (2016) Transcriptional landscape of human tissue lymphocytes unveils uniqueness of tumor-infiltrating T regulatory cells. *Immunity* 5:1135-47.

Drugs.com - Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>, last accessed March 23, 2020.

European Patent No. EP 1176195, granted May 22, 2013 to Kyowa Hakko Kirin Co.

Farkona et al. (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* 14:73.

Fares CM, Van Allen EM, Drake CG, Allison JP, Hu-Lieskovan S (2019) Mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade: why does checkpoint inhibitor immunotherapy not work for all patients? *ASCO Education Book* 39:147-64.

Finotello F, Trajanoski Z (2017) New strategies for cancer immunotherapy: targeting regulatory T cells. *Genome Medicine* 9:10.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunol* 4(4):330-6.

Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi Met al. (2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10:5650-5.

Goldman M, Craft B, Hastie M, Repečka K, McDade F et al. (2019) The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation. *bioRxiv* 326470; doi: <https://doi.org/10.1101/326470>.

Gorelik L, Avgerinos G, Kunes Y, Marasco WA (2017) Preclinical characterization of a novel fully human IgG1 anti-PD-L1 mAb CK-301. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, Apr 1-5, 2017, *Cancer Res* 77(13 Suppl): Abstract No. 4606.

Guo L, Zhang H, Chen B (2017) Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) inhibitor for targeted immunotherapy in tumor. *J Cancer* 8(3):410-416.

Hagemann UB, Gunnarsson L, Géraudie S, Scheffler U, Griep RA et al. (2014) Fully human antagonistic antibodies against CCR4 potently inhibit cell signaling and chemotaxis. *PLoS ONE* 9(7): e103776.

Han S, Toker A, Liu ZQ, Ohashi PS (2019) Turning the tide against regulatory T cells. *Front Oncol* 9: 279.

Harbour BioMed (2020) Harbour BioMed presented its newly discovered anti-human CCR8 novel monoclonal antibodies at the 16th PEGS Boston 2020. September 2, 2020 press release, available at <https://www.harbourbiomed.com/news/126.html#> (last accessed February 22, 2020).

Haslam A, Prasad V (2019) Estimation of the percentage of us patients with cancer who are eligible for and respond to checkpoint inhibitor immunotherapy drugs. *JAMA Netw Open* 2(5): e192535.

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O et al. (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515: 563-7.

Hezareh M, Hessel AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW (2001) Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75(24):12161-8.

Hollinger and Hudson (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotech* 23(9):1126-36.

Huang AY, Gulden PH, Woods AS, Thomas MC, Tong CD et al. (1996) The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(18):9730-5.

Huttenhower C, Flamholz AI, Landis JN, Sahi S, Myers CL et al. (2007) Nearest neighbor networks: clustering expression data based on gene neighborhoods. *BMC Bioinformatics* 8:250.

Iida S (2006) Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum Immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to Fc RIIIa. *Clin Cancer Res* 12(9):2879-87.

Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A et al. (2012) Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 30:837-42.

Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT (2018) Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 118(1):9-16.

Kabat EA, Wu TT, Bilofsky H, Reid-Miller M, Perry H (1983) Sequence of proteins of immunological interest. Bethesda: National Institute of Health; 1983. 323

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edn. National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Kamada T, Togashi Y, Tay C et al. (2019) PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:9999-10008.

Kamta J, Chaar M, Ande A, Altomare DA, Ait-Oudhia S (2017) Advancing cancer therapy with present and emerging immuno-oncology approaches. *Front Oncol* 18(7):64.

Kaufman RJ, Sharp PA (1982) Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *Mol Biol* 159:601-21.

Kavanagh B, O'Brien S, Lee D, Hou Y, Weinberg V, Rini B et al. (2008) CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion. *Blood* 112(4):1175-83.

Khattari R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunol* 4(4):337-42.

Korman AJ, Engelhardt J, Loffredo J, Valle J, Akter R et al. (2017) Next-generation anti-CTLA-4 antibodies [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; Apr 1-5, 2017; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 77(13 Suppl): Abstract nr SY09-01.

Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT et al. (2014) Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 345(6204):1623-1627.

Kumar P, Bhattacharya P, Prabhakar BS (2018) A comprehensive review on the role of co-signaling receptors and Treg homeostasis in autoimmunity and tumor immunity. *J Autoimmun* 95:77-99.

Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T et al. (2015) Phase Ia study of FoxP3+ CD4 Treg depletion by infusion of a humanized anti-CCR4 antibody, KW-0761, in cancer patients. *Clin Cancer Res* 21(19):4327-36.

Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E et al. (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol* 27:55-77.

Li B, VanRoey M, Wang C, Chen TT, Korman A, Jooss K (2009) Anti-Programmed Death-1 synergizes with granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell immunotherapy providing therapeutic benefit to mice with established tumors. *Clin Cancer Res* 15(5):1623-34.

Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM et al. (2013) Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 19:462-8.

Liu SY, Wu YL (2017) Ongoing clinical trials of PD-1 and PD-L1 inhibitors for lung cancer in China. *J Hematol Oncol* 10(1):136.

Louis E, El Ghoul Z, Vermeire S, Dall'Ozzo S, Rutgeerts P et al. (2004) Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 511-9.

Ludeman JP, Stone MJ (2014) The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition. *Br J Pharmacol* 171:1167-79.

Luke JJ, Zha Y, Matijevich K, Gajewski TF (2016) Single dose denileukin diftitox does not enhance vaccine-induced T cell responses or effectively deplete Tregs in advanced melanoma: immune monitoring and clinical results of a randomized phase II trial. *J Immunother Cancer* 4:35.

Martin A, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(23):9268-72.

MacCallum RM., Martin ACR, Thornton JT (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* 262:732-745.

Mahvi DA, Liu R, Grinstaff MW, Colson YL, Raut CP (2018) Local cancer recurrence: the realities, challenges, and opportunities for new therapies. *CA Cancer J Clin* 68(6):488-505.

Mehta AY, Heimbürg-Molinaro J, Cummings RD, Goth CK (2020) Emerging patterns of tyrosine sulfation and O-glycosylation cross-talk and co-localization. *Curr Opin Struct Biol* 62:102-11.

Mellman I, Coukos G, Dranoff (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480: 480-9.

Miescher S, Spycher MO, Amstutz H, De Haas M, Kleijer M et al. (2004) A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcγRIIA and FcγRIIA genes. *Blood* 103: 4028-35.

Moore KL. (2003) The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J Biol Chem* 278(27):24243-6.

Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C et al. (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody

with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115:4393-402.

Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM et al. (2017) Stereotactic radiotherapy increases functionally suppressive regulatory T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res* 5:992-1004.

National Cancer Institute (2021). The Cancer Genome Atlas Program. <https://www.cancer.gov/tcga>. Last accessed March 13, 2021.

Natsume A, Niwa R, Satoh M et al. (2009) Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther* 3:7-16.

Ni X, Tao J, Barbi J, Chen Q, Park BV et al. (2018) YAP is essential for Treg-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Discov* 8(8): 1026-43.

Nimmerjahn F, Lux A, Albert H, Woigk M, Lehmann C, Dudziak D et al. (2010) FcγRIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(45):19396-401.

Nimmerjahn F, Ravetch JV (2005) Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310:1510-2.

Olafsen and Wu (2010) Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 40(3):167-81.

Pardoll DM (2012) The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252-64.

Публикация РСТ № WO 2007/044756, опубликованная 19 апреля 2007 года, ICOS Corp.

Публикация РСТ № WO 2008/156712, опубликованная 24 декабря 2008 года, Organon NV.

Публикация РСТ № WO 2012/145493, опубликованная 26 октября 2012 года, Amplimmune, Inc.

Публикация РСТ № WO 2013/173223, опубликованная 21 ноября 2013 года, Bristol-Myers Squibb Co.

Публикация РСТ № WO 2014/179664, опубликованная 6 ноября 2014 года, AnaptysBio, Inc.

Публикация РСТ № WO 2014/194302, опубликованная 4 декабря 2014 года, Sorrento Терапевтический, Inc.

Публикация РСТ № WO 2014/206107, опубликованная 31 декабря 2014 года, Shanghai Junshi Biosciences Inc.

Публикация РСТ № WO 2015/035606, опубликованная 19 марта 2015 года, Beigene, Ltd.

Публикация РСТ № WO 2015/085847, опубликованная 18 июня 2015 года, Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.

Публикация РСТ № WO 2015/112800, опубликованная 30 июля 2015 года, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Публикация PCT № WO 2015/112900, опубликованная 30 июля 2015 года, Dana-Farber Cancer Institute, Inc. и Novartis AG

Публикация PCT № WO 2016/106159, опубликованная 30 июня 2016 года, Enumeral Biomedical Holdings, Inc.

Публикация PCT № WO 2016/149201, опубликованная 22 сентября 2016 года, Cytomx Therapeutics, Inc.

Публикация PCT № WO 2016/197367, опубликованная 15 декабря 2016 года, Wuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.

Публикация PCT № WO 2017/020291, опубликованная 9 февраля 2017 года, Wuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.

Публикация PCT № WO 2017/020858, опубликованная 9 февраля 2017 года, Wuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.

Публикация PCT № WO 2017/024465, опубликованная 16 февраля 2017 года, Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

Публикация PCT № WO 2017/024515, опубликованная 16 февраля 2017 года, Wuxi Biologics (Cayman) Inc.

Публикация PCT № WO 2017/025016, опубликованная 16 февраля 2017 года, Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

Публикация PCT № WO 2017/025051, опубликованная 16 февраля 2017 года, Wuxi Biologics (Cayman) Inc.

Публикация PCT № WO 2017/034916, опубликованная 2 марта 2017 года, Eli Lilly и Co.

Публикация PCT № WO 2017/040790, опубликованная 9 марта 2017 года, Agenus Inc.

Публикация PCT № WO 2017/106061, опубликованная 22 июня 2017 года, MacroGenics, Inc.

Публикация PCT № WO 2017/123557, опубликованная 20 июля 2017 года, Armo Biosciences, Inc.

Публикация PCT № WO 2017/132827, опубликованная 10 августа 2017 года, Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

Публикация PCT № WO 2017/133540, опубликованная 10 августа 2017 года, Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

Публикация PCT № WO 2018/112033, опубликованная 21 июня 2018 года, Harvard College.

Публикация PCT № WO 2019/157098, опубликованная 15 августа 2019 года, Advaxis, Inc.

Публикация PCT № WO 2020/138489, опубликованная 2 июля 2020 года, Shionogi & Co., Ltd.

Pianko MJ, Liu Y, Bagchi S, Lesokhin AM (2017) Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. Stem Cell Investig 4:32.

Plitas G, Konopacki C, Wu K et al. (2016) Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer. *Immunity* 5:1122-34.

Saleh R, Elkord E (2020) FoxP3+ T regulatory cells in cancer: prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Cancer Lett* 490:174-85.

Scortegagna M, Hockemeyer K, Dolgalev I, Poźniak J, Rambow F et al. (2020) Siah2 control of T-regulatory cells limits anti-tumor immunity. *Nat Commun* doi: 10.1038/s41467-019-13826-7.

Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M et al. (2013) Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* 1(1):32-42.

Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y (2011) A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol* 8:59-66.

Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Scutti J, Vence L, Wargo J, Allison JP et al. (2019a) Anti-CTLA-4 immunotherapy does not deplete FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) in human cancers. *Clin Cancer Res* 25(4):1233-8.

Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Vence L, Wargo J, Allison JP et al. (2019b) Anti-CTLA-4 immunotherapy does not deplete foxp3+ regulatory t cells (tregs) in human cancers - Response. *Clin Cancer Res* 25(11):3469-3470.

Shitara K, Nishikawa H (2018) Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1417(1):104-15.

Siemers NO, Holloway JL, Chang H, Chasalow SD, Ross-MacDonald PB et al. (2017) Genome-wide association analysis identifies genetic correlates of immune infiltrates in solid tumors. *PLoS ONE* 12(7): e0179726.

Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F et al. (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210(9):1695-710.

Tao H, Mimura Y, Aoe K et al. (2012) Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 75:95-101.

Teng MWL, Ngio SF, von Scheidt B, McLaughlin N, Sparwasser T, Smyth MJ (2010) Conditional regulatory T-cell depletion releases adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth. *Cancer Research* 70(20):7800-9.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3(5):541-7.

Патент США № 6808710, выданный 26 октября 2004 года Wood et al.

Патент США № 7488802, выданный 10 февраля 2009 года Collins et al.

Патент США № 7943743, выданный 17 мая 2011 года Korman et al.

- Патент США № 7767429, выданный 3 августа 2010 года Bookbinder et al.
- Патент США № 8008449, выданный 30 августа 2011 года Korman et al.
- Патент США № 8168757, выданный 1 мая 2012 года Finnefrock et al.
- Патент США № 8217149, выданный 10 июля 2012 года Irving et al.
- Патент США № 8354509, выданный 15 января 2013 года Carven et al.
- Патент США № 8779108, выданный 15 июля 2014 года Queva et al.
- Патент США № 9175082, выданный 3 ноября 2015 года Zhou et al.
- Патент США № 9205148, выданный 3 декабря 2015 года Langermann et al.
- Патент США № 9624298, выданный 18 апреля 2017 года Nastri et al.
- Патент США № 10087259, выданный 2 октября 2018 года Rudenski and Plitas
- Патент США № 10550191, выданный 4 февраля 2020 года Yoshida et al.
- Патентная публикация США № 2004/0110704, опубликованная 10 июня 2004 года, Yamane et al.
- Патентная публикация США № 2015/0079109, опубликованная 19 марта 2015 года, Li et al.
- Патентная публикация США № 2016/0272708, опубликованная 22 сентября 2016 года, Chen et al.
- Vila-Caballer M, Gonzalez-Granado JM, Zorita V, Abu Nabah YN, Silvestre-Roig Cet al. (2019) Disruption of the CCL1-CCR8 axis inhibits vascular Treg recruitment and function and promotes atherosclerosis in mice. *J Mol Cell Cardiol* 132:154-63.
- Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT et al. (2014) In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Imm Res* 2(9):846-56.
- Wang DD, Zhang S, Zhao H, Men AY, Parivar K (2009) Fixed dosing versus body size-based dosing of monoclonal antibodies in adult clinical trials. *J Clin Pharmacol* 49:1012-24.
- Wang L, Simons DL, Lu X et al. (2019) Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer. *Nature Immunol* 20:1220-30.
- Wang S, Liu X (2019). The UCSCXenaTools R package: a toolkit for accessing genomics data from UCSC Xena platform, from cancer multi-omics to single-cell RNA-seq. *J Open Source Software* 4(40): 1627, <https://doi.org/10.21105/joss.01627>.
- Weber J (2010) Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer-preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol* 37(5): 430-9.
- Wolchok JD, Weber JS, Maio M, Neyns B, Harmankaya K et al. (2013) Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Ann Oncol* 24(8):2174-80.
- Wu TT, Kabat EA (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132:211-250.



Xu K, He J, Zhang J, Liu T, Yang F, Ren T (2020) A novel prognostic risk score model based on immune-related genes in patients with stage IV colorectal cancer. *Biosci Rep* 40(10):BSR20201725.

Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S et al. (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16(11):1643-56.

Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S et al. (2004) Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22.

Yao S, Zhu Y, Chen L (2013) Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nature Rev Drug Discov* 12:130-46.

Yi J, Jiang S-J. (2018) Dysregulation of CCL18/CCR8 axis predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Eur J Inflamm* 16: 1-7.

Zhang F, Wei H, Wang X, Bai Y, Wang P et al. (2017) Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discov* 3:17004.

Zhao S, Jiang T, Zhang L, Yang H, Liu X et al. (2016) Clinicopathological and prognostic significance of regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget* 7:36065-73.

Zheng C, Zheng L, Yoo JK, Guo H, Zhang Y et al. (2017) Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing. *Cell* 169(7):1342-56.

Zhu JZ, Millard CJ, Ludeman JP, Simpson LS, Clayton DJ et al. (2011) Tyrosine sulfation influences the chemokine binding selectivity of peptides derived from chemokine receptor CCR3. *Biochemistry* 50:1524-34.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающееся с рецептором хемокинов с C-C-мотивом 8 (CCR8), экспрессирующимся на поверхности клетки, и опосредующее истощение CCR8-экспрессирующей клетки посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, специфически связывающееся с CCR8 человека (hCCR8), последовательность которого приведена как SEQ ID NO: 1.

3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1 или 2, содержащее константную область тяжелой цепи, принадлежащую изотипу IgG1 или IgG3 человека.

4. Модифицированное моноклональное антитело против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, связывающуюся с более высокой аффинностью с рецептором Fcγ (FcγR) и опосредующую повышенную ADCC по сравнению с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью по любому из предшествующих пп., необязательно, опосредующее по меньшей мере:

(a) в 2 раза повышенную активность ADCC;

(a) в 5 раз повышенную активность ADCC; или

(c) в 10 раз повышенную активность ADCC;

что измеряют по снижению EC<sub>50</sub> лизиса клеток в анализе лизиса NK-клетками, описанном в примере 17.

5. Модифицированное моноклональное антитело против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть по п.4, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи IgG1, демонстрирующую сниженное фукозилирование, необязательно, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи IgG1, являющуюся гипофукозилированной или нефукозилированной.

6. Модифицированное моноклональное антитело против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть по п.4 или 5, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую мутацию или множество мутаций, опосредующих повышенную ADCC, необязательно, где мутация или множество мутаций выбраны из G236A; S239D; F243L; E333A; G236A/I332E; S239D/I332E; S267E/H268F; S267E/S324T; H268F/S324T; G236A/S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; S267E/H268F/S324T и G236A/S239D/A330L/I332E.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., которое

(i) специфически связывается с экспрессирующими CCR8 человека клетками китайского хомяка (CHO) с EC<sub>50</sub>, измеряемой посредством анализа связывания, как описано в примере 11, составляющей:

(a) приблизительно 10 нМ или менее;

- (b) приблизительно 5 нМ или менее;
  - (c) приблизительно 1,7 нМ или менее;
  - (d) приблизительно 1 нМ или менее;
  - (e) приблизительно 0,5 нМ или менее;
  - (f) приблизительно 0,1 нМ или менее;
  - (g) приблизительно 0,1 нМ;
  - (h) приблизительно 1,7 нМ;
  - (i) от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ;
  - (j) от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 2 нМ;
  - (k) от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 5 нМ;
  - (l) от приблизительно 1 нМ до приблизительно 2 нМ; или
  - (m) от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 1 нМ;
- и/или

(ii) специфически связывается с активированными регуляторными Т-клетками (T<sub>reg</sub>-клетками) с EC<sub>50</sub>, измеряемой посредством анализа связывания, как описано в примере 11, составляющей:

- (a) приблизительно 50 нМ или менее;
  - (b) приблизительно 14 нМ или менее;
  - (c) приблизительно 5 нМ или менее;
  - (d) приблизительно 2 нМ или менее;
  - (e) приблизительно 0,5 нМ или менее;
  - (f) приблизительно 0,3 нМ или менее;
  - (g) приблизительно 0,1 нМ или менее;
  - (h) приблизительно 0,03 нМ или менее;
  - (i) приблизительно 1,7 нМ;
  - (j) от приблизительно 0,03 нМ до приблизительно 10 нМ;
  - (k) от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ; или
  - (l) от приблизительно 0,2 нМ до приблизительно 2 нМ;
- и/или

(iii) связывается с N-концевым пептидом CCR8 человека, содержащим сульфатированные остатки тирозин-15 и тирозин-17, с K<sub>D</sub>, измеряемой посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в примере 11, составляющей:

- (a) приблизительно 100 нМ или менее;
- (b) приблизительно 50 нМ или менее;
- (c) приблизительно 10 нМ или менее;
- (d) приблизительно 5 нМ или менее;
- (e) приблизительно 1,6 нМ;
- (f) приблизительно 1,0 нМ или менее;
- (g) приблизительно 0,5 нМ или менее;
- (h) приблизительно 0,1 нМ или менее;

- (i) от приблизительно 100 нМ до приблизительно 0,1 нМ;
- (j) от приблизительно 50 нМ до приблизительно 0,5 нМ;
- (k) от приблизительно 10 нМ до приблизительно 1 нМ; или
- (l) от приблизительно 2 нМ до приблизительно 1 нМ;

и/или

(iv) связывается с N-концевым пептидом CCR8 человека, содержащим один сульфатированный остаток, тирозин-15, с  $K_D$ , измеряемой посредством SPR, как описано в примере 11, составляющей:

- (a) приблизительно 100 нМ или менее;
- (b) приблизительно 50 нМ или менее;
- (c) приблизительно 25 нМ или менее;
- (d) приблизительно 10 нМ или менее;
- (f) приблизительно 1,0 нМ или менее;
- (e) приблизительно 20 нМ;
- (i) от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 нМ;
- (j) от приблизительно 50 нМ до приблизительно 10 нМ; или
- (k) от приблизительно 30 нМ до приблизительно 20 нМ.

8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., специфически связывающееся с редкими и рассеянными иммунными клетками в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, но не связывающееся с тканью головного мозга, мозжечка, сердца, печени, легких, почки, миндалины, селезенки, тимуса, толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, надпочечника, гипофиза, кожи, периферического нерва, яичка или матки или мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) человека.

9. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., дополнительно ингибирующее связывание лиганда рецептора хемокинов с C-C-мотивом 1 (CCL1) с CCR8 и ингибирующее передачу сигнала CCR8/CCL1, что измеряют по ингибированию тока кальция, как описано в примере 15.

10. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по предшествующим пп., которое

- (i) ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с  $IC_{50}$ , составляющей:
  - (a) приблизительно 10 нМ или менее;
  - (b) приблизительно 5 нМ или менее;
  - (c) приблизительно 1 нМ или менее;
  - (d) приблизительно 0,5 нМ или менее;
  - (e) приблизительно 0,1 нМ или менее;
  - (f) приблизительно 0,01 нМ или менее;
  - (g) от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 10 нМ;
  - (h) от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 5 нМ;
  - (i) от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 1 нМ; или

(j) приблизительно 0,46 нМ;

и/или

(ii) опосредует истощение CCR8-экспрессирующей клетки с  $EC_{50}$ , измеряемой посредством анализа перекрестной сшивки CD16, как описано в примере 17, составляющей:

(a) приблизительно 100 пМ или менее;

(b) приблизительно 30 пМ или менее;

(c) приблизительно 10 пМ или менее;

(d) приблизительно 3 пМ или менее;

(e) приблизительно 1 пМ или менее;

(e) приблизительно 0,5 пМ или менее;

(f) приблизительно 0,1 пМ или менее;

(g) приблизительно 0,05 пМ или менее;

(h) приблизительно 0,7 пМ;

(i) от приблизительно 0,05 пМ до приблизительно 50 пМ;

(j) от приблизительно 0,1 пМ до приблизительно 10 нМ;

(k) от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 7 нМ; или

(l) от приблизительно 0,6 нМ до приблизительно 3 нМ;

и/или

(iii) опосредует истощение активированных  $T_{reg}$ -клетки с  $EC_{50}$ , измеряемой посредством анализа апоптоза, как описано в примере 19, составляющей:

(a) приблизительно 500 пМ или менее;

(b) приблизительно 100 пМ или менее;

(c) приблизительно 30 пМ или менее;

(d) приблизительно 15 пМ или менее;

(e) приблизительно 5 пМ или менее;

(f) приблизительно 1 пМ или менее;

(g) приблизительно 13 пМ;

(h) от приблизительно 1 пМ до приблизительно 500 пМ;

(i) от приблизительно 5 пМ до приблизительно 100 пМ; или

(j) от приблизительно 10 пМ до приблизительно 50 пМ.

11. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., связывающееся с эпитопом, локализованным в N-концевом домене CCR8 человека, что определяют посредством рентгеноструктурной кристаллографии, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность  $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$  (SEQ ID NO: 109), необязательно, где

(i) эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или все аминокислоты в пептиде, имеющем последовательность  $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$  (SEQ ID NO: 109); необязательно, где

(ii) эпитоп содержит все 11 аминокислот в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109); необязательно, где

(iii) обе аминокислоты Y<sub>15</sub> и Y<sub>17</sub> являются сульфатированными.

12. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, способное опосредовать ADCC и специфически связывающееся с эпитопом на рецепторе хемокинов с C-C-мотивом 8 человека (hCCR8), последовательность которого приведена как SEQ ID NO: 1, где эпитоп локализован в N-концевом домене hCCR8 в пептиде, охватывающем аминокислотные остатки приблизительно 12-22 (V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub>; SEQ ID NO: 109), что определяют посредством рентгеноструктурной кристаллографии, необязательно, где:

(i) эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109);

(ii) эпитоп содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или все аминокислоты в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109);

(iii) эпитоп содержит 11 из аминокислот в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109); или

(iv) эпитоп состоит из всех 11 аминокислот в пептиде, имеющем последовательность V<sub>12</sub>T<sub>13</sub>D<sub>14</sub>Y<sub>15</sub>Y<sub>16</sub>Y<sub>17</sub>P<sub>18</sub>D<sub>19</sub>I<sub>20</sub>F<sub>21</sub>S<sub>22</sub> (SEQ ID NO: 109).

13. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., где

(i) антитело или его часть при связывании с CCR8 на поверхности клетки не вызывает интернализацию CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно-сшивающего антитела; и/или

(ii) антитело или его часть способствует истощению опухолеассоциированных T<sub>reg</sub>-клеток человека *in vitro*; и/или

(iii) антитело или его часть специфически индуцирует истощение опухолевых T<sub>reg</sub>-клеток без истощения CCR8<sup>+</sup> Т-клеток в неопухолевой ткани, необязательно, где неопухолевая ткань представляет собой кожу, тимус, селезенку или кровь; и/или

(iv) антитело или его часть ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в виде монотерапии; и/или

(v) антитело или его часть ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования.

14. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., демонстрирующее по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или шесть из следующих свойств:

(a) специфически связывается с CCR8, экспрессирующимся на поверхности клетки, с EC<sub>50</sub> приблизительно 2 нМ или менее;

(b) специфически связывается с редкими и рассеянными иммунными клетками в мозговом веществе тимуса и дерме кожи, но не связывается с тканью головного мозга,

мозжечка, сердца, печени, легких, почки, миндалина, селезенки, тимуса, толстого кишечника, желудка, поджелудочной железы, надпочечника, гипофиза, кожи, периферического нерва, яичка или матки или моноклеарными клетками периферической крови (PBMC) человека;

(с) ингибирует связывание CCL1 с CCR8 и ингибирует передачу сигнала CCR8/CCL1 с  $IC_{50}$  приблизительно 5 нМ или менее;

(d) при связывании с CCR8 на поверхности клетки опосредует истощение клетки с  $EC_{50}$  приблизительно 10 пМ или менее;

(е) при связывании с CCR8 на поверхности клетки не вызывает интернализацию CCR8 в присутствии или отсутствие перекрестно-сшивающего антитела;

(f) способствует истощению опухолеассоциированных  $T_{reg}$ -клеток человека *in vitro* при использовании анализа, описанного в примере 22;

(g) способствует истощению опухолеассоциированных  $T_{reg}$ -клеток человека в образцах срезов опухоли человека *ex vivo* при использовании анализа, описанного в примере 20;

(h) специфически опосредует истощение опухолевых  $T_{reg}$ -клеток, сохраняя  $CCR8^+$  T-клетки в неопухолевых тканях;

(i) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в виде монотерапии; и

(j) ингибирует рост опухолевых клеток у индивидуума при введении индивидууму в комбинации с дополнительным терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования; необязательно, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть демонстрирует все из этих свойств.

15. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.34 или 35, дополнительно связывающееся с эпитопом, локализованным в N-концевом домене CCR8 человека с  $K_D$  приблизительно 10 нМ или менее, где эпитоп содержит пептид, имеющий последовательность  $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$  (SEQ ID NO: 109), и сульфатированные остатки тирозин-15 и тирозин-17.

16. Модифицированное моноклональное антитело против hCCR8 или его антигенсвязывающая часть, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, связывающуюся с более высокой аффинностью с рецептором  $Fc\gamma$  ( $Fc\gamma R$ ) и опосредующую по меньшей мере в 2, 5 или 10 раз повышенную ADCC по сравнению с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью по п.14 или 15.

17. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., связывающееся с тем же эпитопом, что и референсное антитело, где референсное антитело содержит:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;





(l)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

18. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., перекрестно конкурирующее за связывание с hCCR8 с референсным антителом, где референсное антитело содержит:

(a)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;

(b)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(c)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 5, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 17;

(d)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 18;

(e)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 7, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 19;

(f)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 8, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 20;

(g)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 9, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 21;

(h)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие

последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 10, и V<sub>L</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 22;

(i) V<sub>H</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 11, и V<sub>L</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 23;

(j) V<sub>H</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 12, и V<sub>L</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 24;

(k)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 13, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 25;

(1) V<sub>H</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и V<sub>L</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m) V<sub>H</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и V<sub>L</sub>, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

19. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., содержащее домены CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой из:

(a) V<sub>H</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 3, и V<sub>L</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 15;

(b) V<sub>H</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 4, и V<sub>L</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 16;

(с) V<sub>Н</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 5, и V<sub>Л</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 17;

(d) V<sub>Н</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 6, и V<sub>Л</sub>, содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO:

18;

(e)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 7, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 19;

(f)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 8, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 20;

(g)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 9, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 21;

(h)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 22;

(i)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 11, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 23;

(j)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 12, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 24;

(k)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 13, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 25;

(l)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m)  $V_H$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащей последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

20. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.19, содержащее следующие домены CDR, определенные способом Kabat:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую последовательно













как SEQ ID NO: 25;

(l)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 14, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 26; или

(m)  $V_H$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 115, и  $V_L$ , содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 116.

22. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.20 или 21, содержащее:

(a) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 111;

(b) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 112;

(c) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 113;

(d) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 114;

(e) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 117, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 118; или

(f) тяжелую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 110, и легкую цепь, содержащую последовательно связанные аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную как SEQ ID NO: 119.

23. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих пп., являющееся химерным антителом, гуманизированным антителом, антителом человека или его фрагментом.

24. Иммуноконъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из предшествующих пп., связанное с

цитолитическим средством, необязательно, где цитолитическое средство является цитотоксином или радиоактивным изотопом.

25. Биспецифическая молекула, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-23, связанное со связывающим доменом, имеющим иную специфичность связывания, чем моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть.

26. Композиция, содержащая:

(а) моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-23;

(b) иммуноконъюгат по п.24; или

(с) биспецифическую молекулу по п.25, и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-23.

28. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.27.

29. Клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.28.

30. Способ получения антитела против CCR8 или его антигенсвязывающей части, включающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части в клетке-хозяине по п.29 и выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки-хозяина.

31. Способ лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-23, иммуноконъюгата по п.24, биспецифической молекулы по п.25 или фармацевтической композиции по п.26, таким образом, что индивидуума подвергают лечению.

32. Способ ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-23, иммуноконъюгата по п.24, биспецифической молекулы по п.25 или фармацевтической композиции по п.26, таким образом, что ингибируют рост опухолевых клеток у индивидуума.

33. Способ по п.31 или 32, где способ дополнительно включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества дополнительного терапевтического средства для лечения злокачественного новообразования, необязательно, где дополнительное терапевтическое средство является соединением, снижающим ингибирование иммунной системы или повышающим ее стимуляцию.

34. Способ по любому из пп.31-33, где индивидуум является человеком.

35. Способ по любому из пп.31-34, где:

(а) злокачественное новообразование является солидной опухолью, необязательно, где солидная опухоль представляет собой:

(i) злокачественное новообразование, выбранное из плоскоклеточной карциномы,

мелкоклеточного рака легких (SCLC), немелкоклеточного рака легких (NSCLC), плоскоклеточного NSCLC, неплоскоклеточного NSCLC, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, рака тонкого кишечника, рака печени, печеночноклеточной карциномы (HCC), рака поджелудочной железы (PAC), рака почки, почечноклеточной карциномы (RCC), рака мочевого пузыря, рака мочеиспускательного канала, рака мочеточника, колоректального рака (CRC), рака толстого кишечника, карциномы толстого кишечника, рака анального канала, рака эндометрия, рака предстательной железы, фибросаркомы, нейробластомы, глиомы, глиобластомы, герминомы, саркомы детского возраста, синоназальной лимфомы с фенотипом естественного киллера, меланомы, рака кожи, злокачественного новообразования костной ткани, рака шейки матки, рака матки, карциномы эндометрия, карциномы фаллопиевых труб, рака яичников, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, рака яичка, злокачественного новообразования эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака полового члена, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли спинного мозга, злокачественного новообразования головного мозга, глиомы ствола мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, солидных опухолей детского возраста, злокачественных новообразований, вызванных факторами окружающей среды, связанных с вирусами злокачественных новообразований, злокачественных новообразований вирусного происхождения, злокачественного новообразования на поздней стадии, нерезектабельного злокачественного новообразования, метастатического злокачественного новообразования, рефрактерного злокачественного новообразования, рецидивирующего злокачественного новообразования и любой их комбинации; или

(ii) злокачественное новообразование, выбранное из немелкоклеточного рака легких (NSCLC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), колоректального рака (CRC), рака желудка, рака гастроэзофагеального перехода (GE) и рака шейки матки; или

(iii) злокачественное новообразование, выбранное из плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSC), аденокарциномы легких (LUAD), аденокарциномы желудка (STAD), плоскоклеточной карциномы легких (LUSC), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), аденокарциномы прямой кишки (READ), карциномы пищевода (ESCA), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), аденокарциномы толстого кишечника (COAD) и плоскоклеточной карциномы шейки матки и эндоцервикальной аденокарциномы (CESC); или

(iv) злокачественное новообразование, выбранное из плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), рака шейки матки, колоректального рака (CRC), немелкоклеточного рака-плоскоклеточной карциномы легких (NSCLC-SCC), NSCLC-аденокарциномы (NSCLC-ADC), рака поджелудочной железы, рака желудка, рака

мочевого пузыря и рака молочной железы; или

(v) злокачественное новообразование, выбранное из аденокарциномы толстого кишечника, карциномы мочевого пузыря, карциномы молочной железы и фибросаркомы; или

(b) злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз, или опухолевые клетки представляют собой клетки гемобластоза, необязательно, где гемобластоз выбран из острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелогенного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), Т-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина (HL), неходжкинских лимфом (NHL), множественной миеломы, вялотекущей миеломы, моноклональной гаммапатии неясного генеза (MGUS), гемобластозов на поздней стадии, метастатических, рефрактерных и/или рецидивирующих гемобластозов и любых комбинаций указанных гемобластозов.

36. Способ по п.31, где дополнительное терапевтическое средство представляет собой:

(a) антагонистическое средство, специфически связывающееся с белком программируемой гибели клетки-1 (PD-1), лигандом белка программируемой гибели клетки-1 (PD-L1), антигеном цитотоксических Т-лимфоцитов-4 (CTLA-4), белком гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3), В- и Т-лимфоцитарным аттенуатором (BTLA), белком 3, содержащим домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), иммуноглобулин-подобным рецептором естественных киллеров (KIR), лектин-подобным рецептором G1 естественных киллеров (KLRG-1), рецептором аденозина A2a (A2aR), Т-клеточным иммунорецептором с доменами Ig и ITIM (TIGIT), V-доменным иммуноглобулиновым супрессором активации Т-клеток (VISTA), протоонкогеном тирозин-протеинкиназой MER (MerTK), рецептором естественных киллеров 2B4 (CD244) или CD160; или

(b) агонистическое средство, специфически связывающееся с индуцибельным Т-клеточным костимулятором (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD27, глюкокортикоид-индуцируемым TNFR-родственным белком (GITR) или медиатором проникновения вируса герпеса (HVEM); и необязательно, где:

(i) антагонистическое средство, специфически связывающееся с PD-1, выбрано из ниволумаба, пембролизумаба, цемиплимаба, спартализумаба, камрелизумаба, синтилимаба, тислелизумаба и торипалимаба; или

(ii) антагонистическое средство, специфически связывающееся с PD-L1, выбрано из атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, энвафолимаба, BMS-936559, CK-301, CS-1001, SHR-1316, CBT-502 и BGB-A333; или

(iii) антагонистическое средство, специфически связывающееся с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб или тремелиумаб.

37. Способ потенцирования противоопухолевого иммунного ответа, вызванного терапевтическим средством, у индивидуума, страдающего злокачественным

новообразованием, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-23, иммуноконъюгата по п.24, биспецифической молекулы по п.25 или фармацевтической композиции по п.26 таким образом, что индивидуум имеет более сильный иммунный ответ против злокачественного новообразования по сравнению с иммунным ответом, вызванным терапевтическим средством в отдельности.

38. Способ по п.37, где терапевтическое средство представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек или лучевую терапию, необязательно, где ингибитор контрольных точек представляет собой антитело против PD-1, против PD-L1 или против CTLA-4.

39. Набор для лечения индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, содержащий:

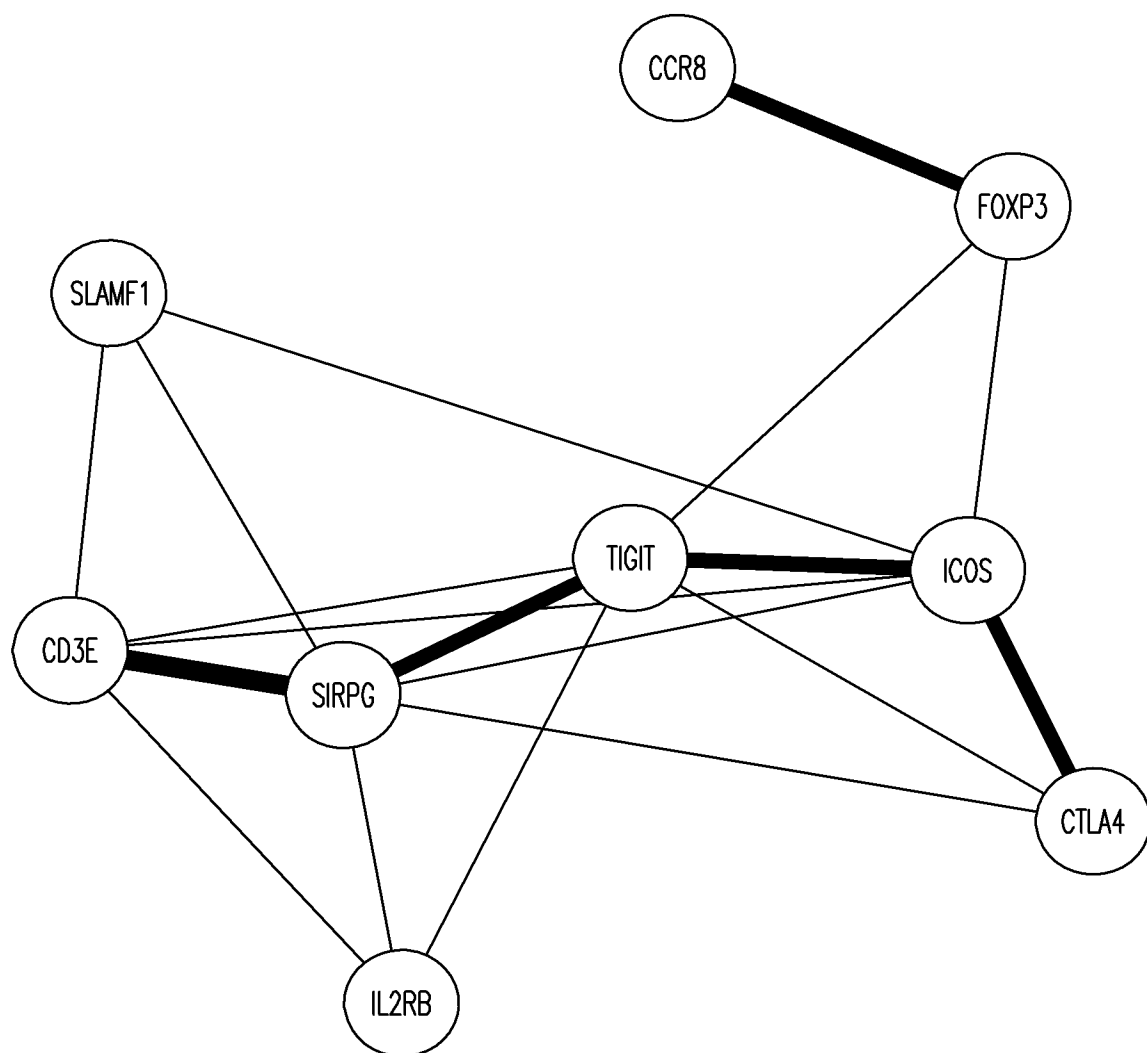
(а) одну или более доз в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, специфически связывающегося с рецептором хемокинов с C-C-мотивом 8 (CCR8) и опосредующего истощение CCR8-экспрессирующей клетки посредством ADCC;

(b) необязательно, одну или более доз в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 1600 мг моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части, специфически связывающегося с PD-1, PD-L1 или CTLA-4; и

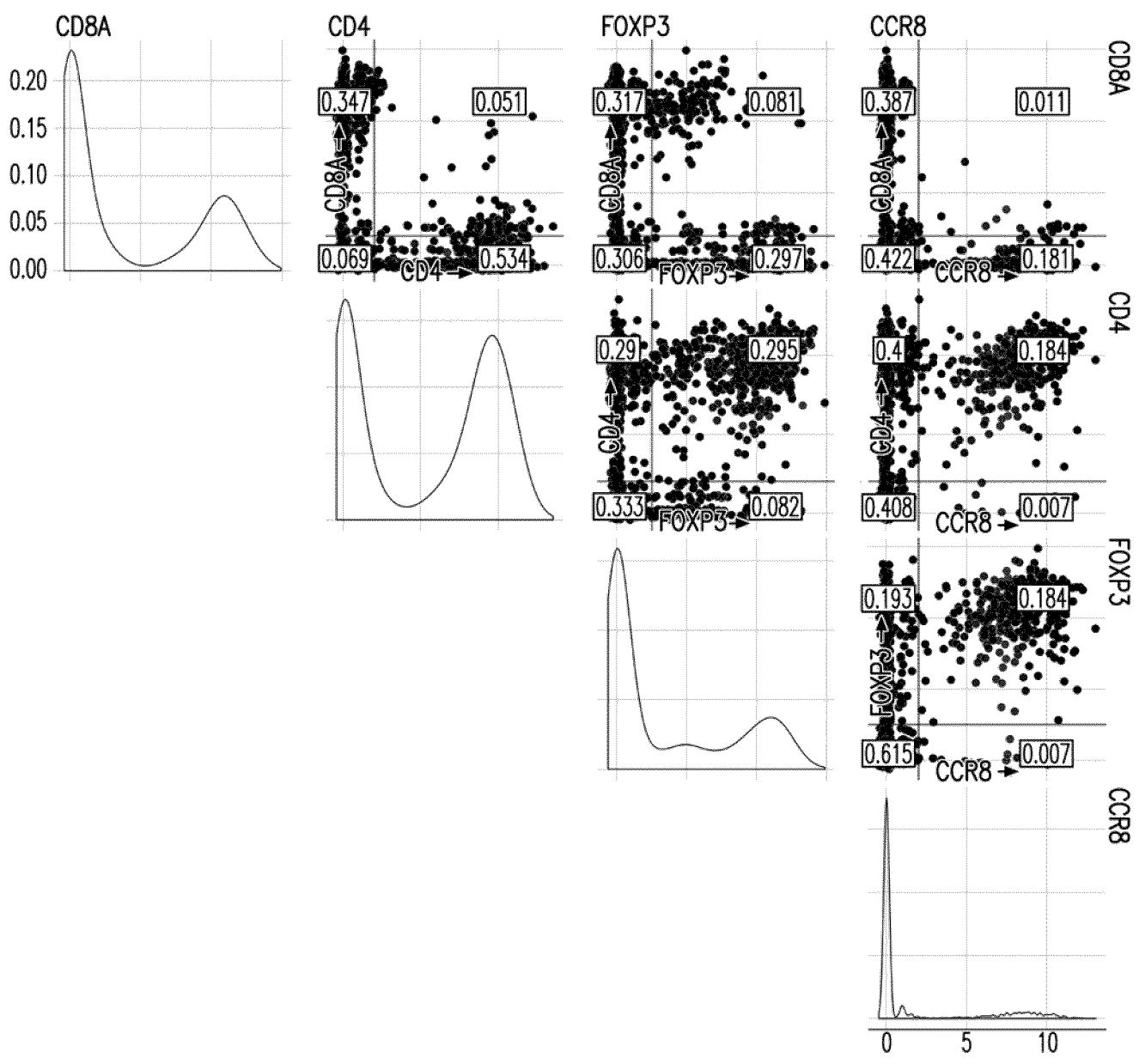
(с) инструкции по использованию моноклонального антитела или его части, специфически связывающегося с CCR8, и, необязательно, моноклонального антитела или его части, специфически связывающегося с PD-1, PD-L1 или CTLA-4, в способе по любому из пп.31-36.

По доверенности

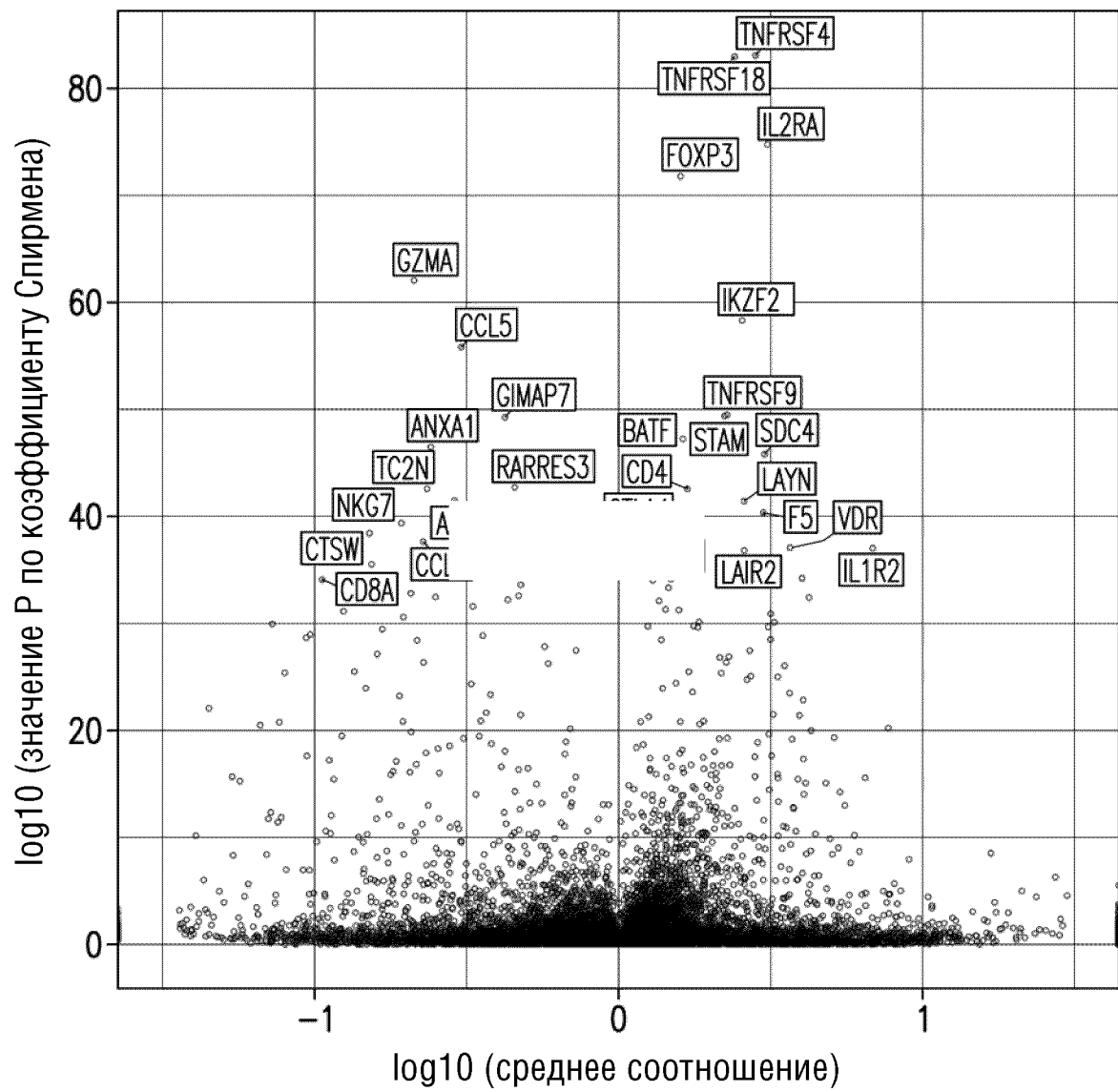
ФИГ.1А



ФИГ.1В

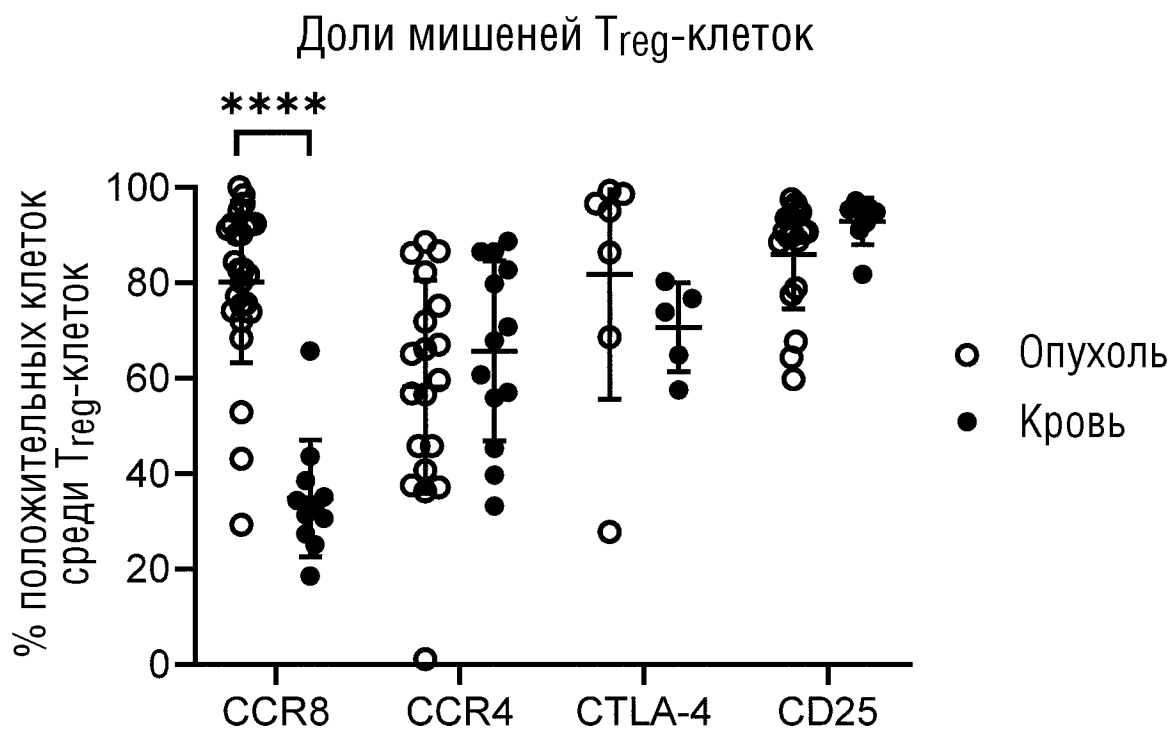


ФИГ.1С

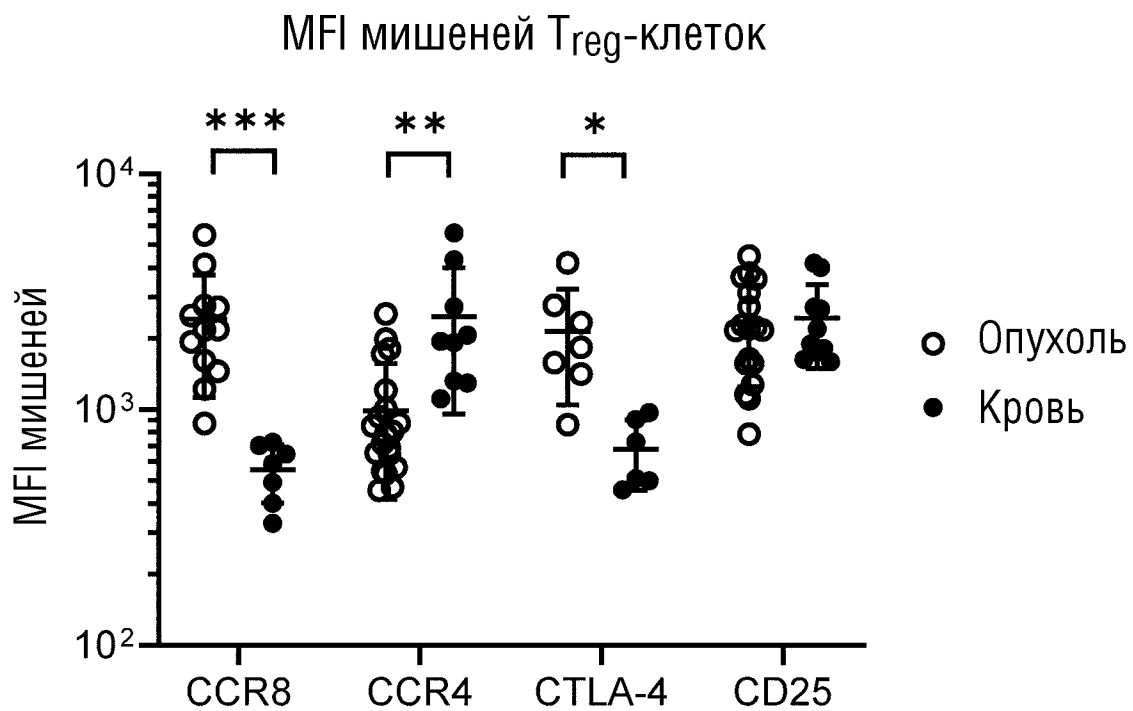




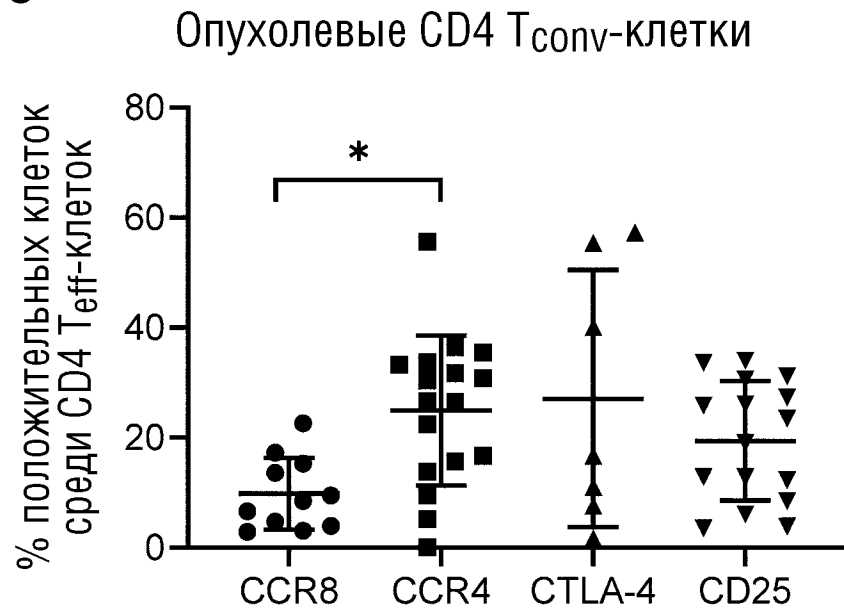
ФИГ.2А



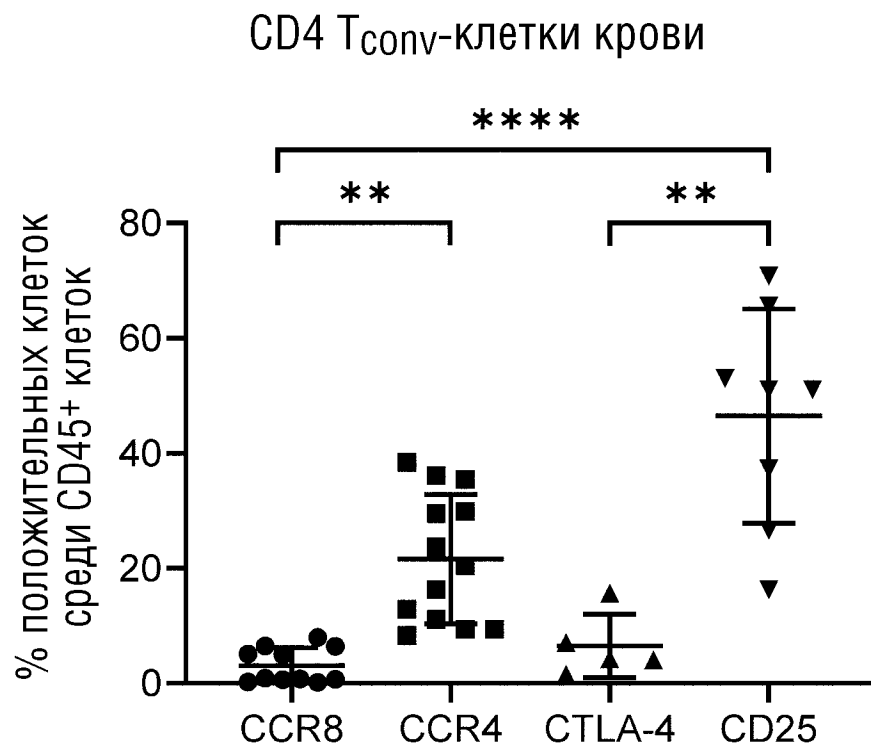
ФИГ.2В



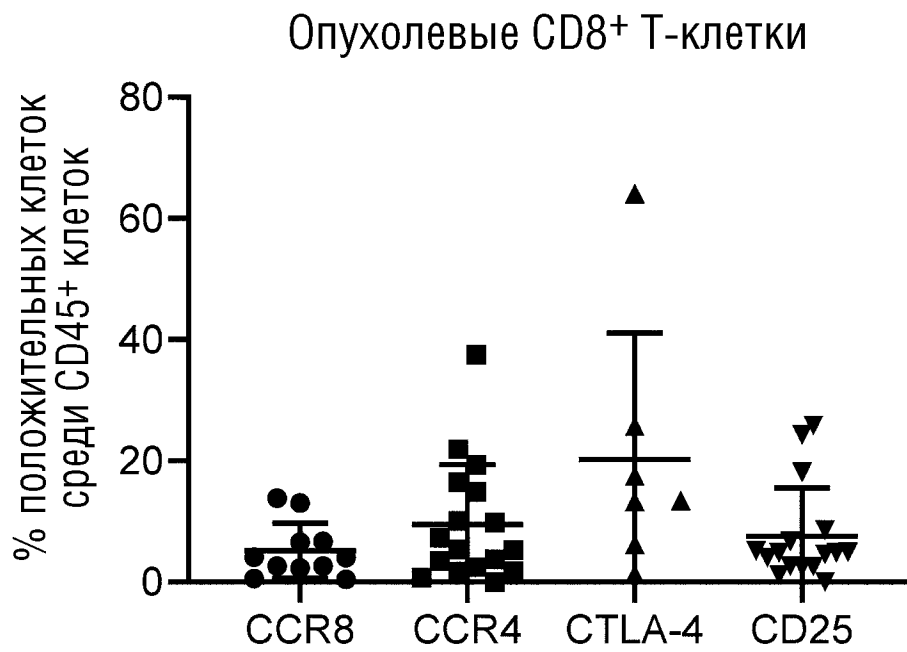
ФИГ.2С



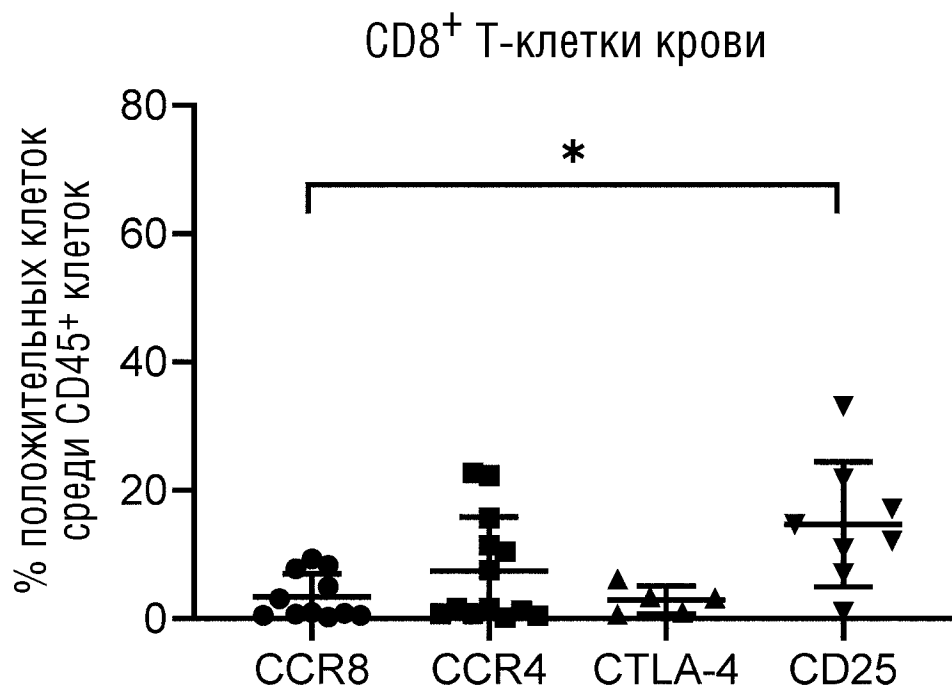
ФИГ.2D



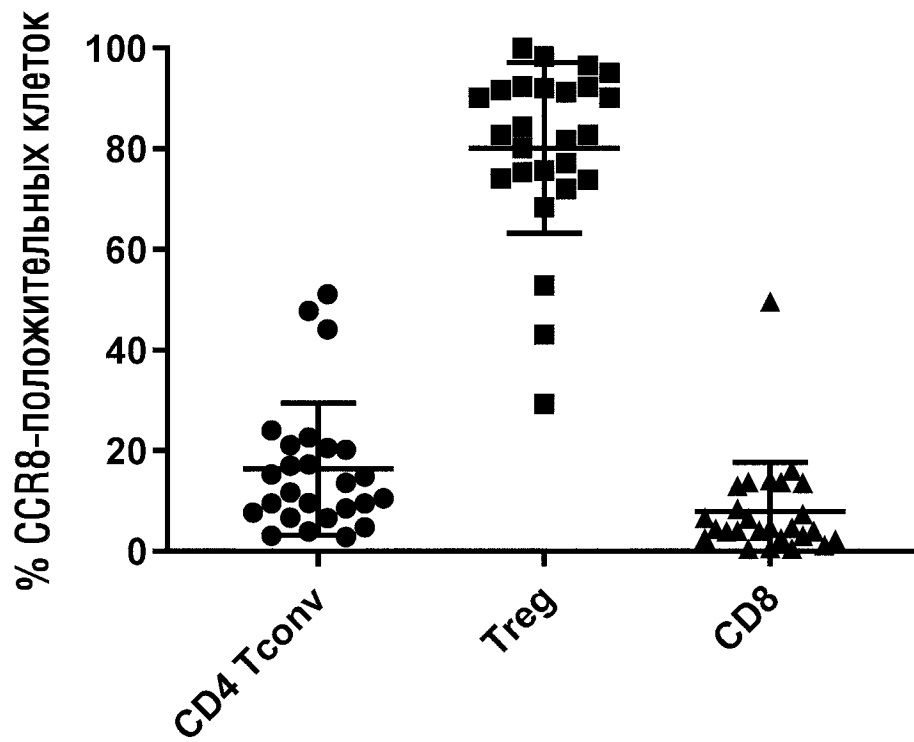
ФИГ.2Е



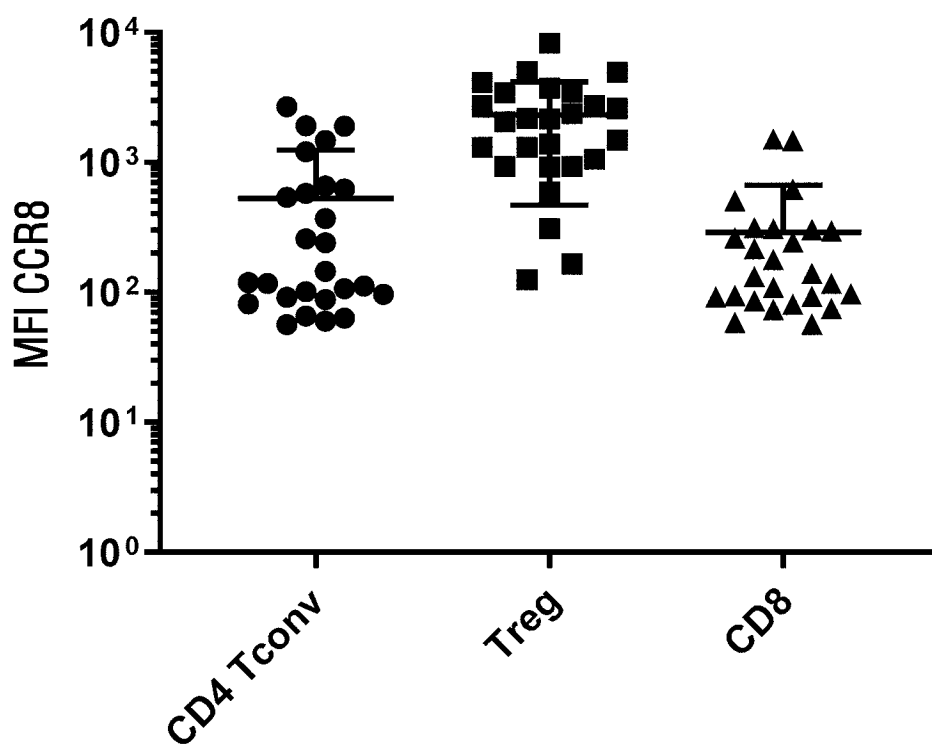
ФИГ.2F



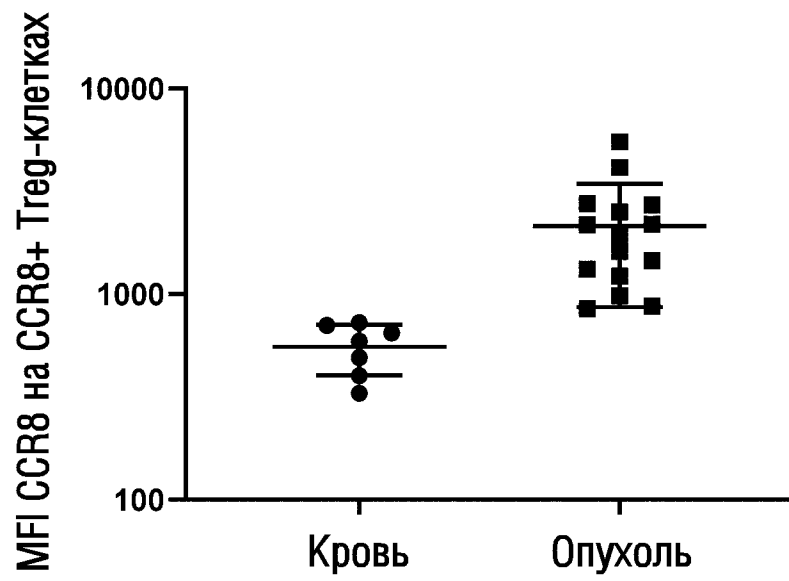
ФИГ.3А



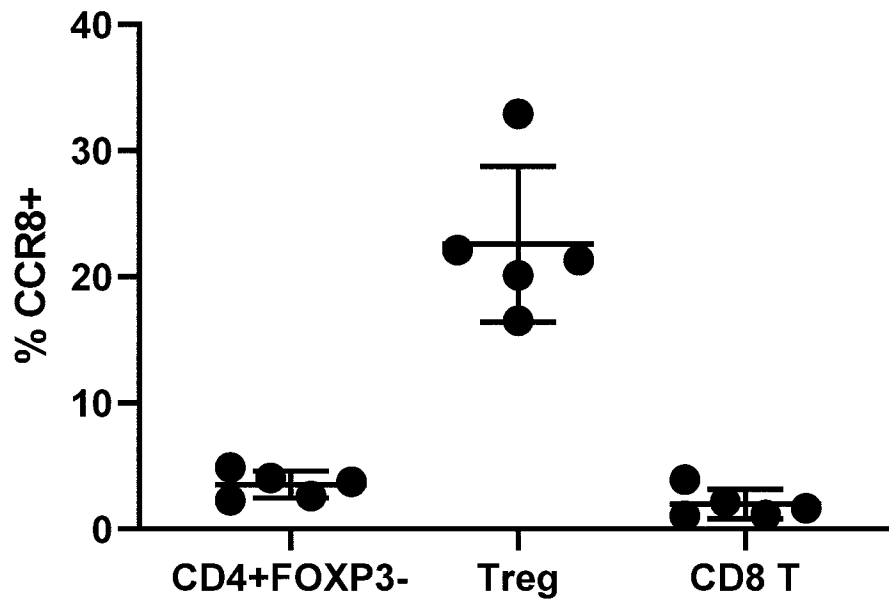
ФИГ.3В



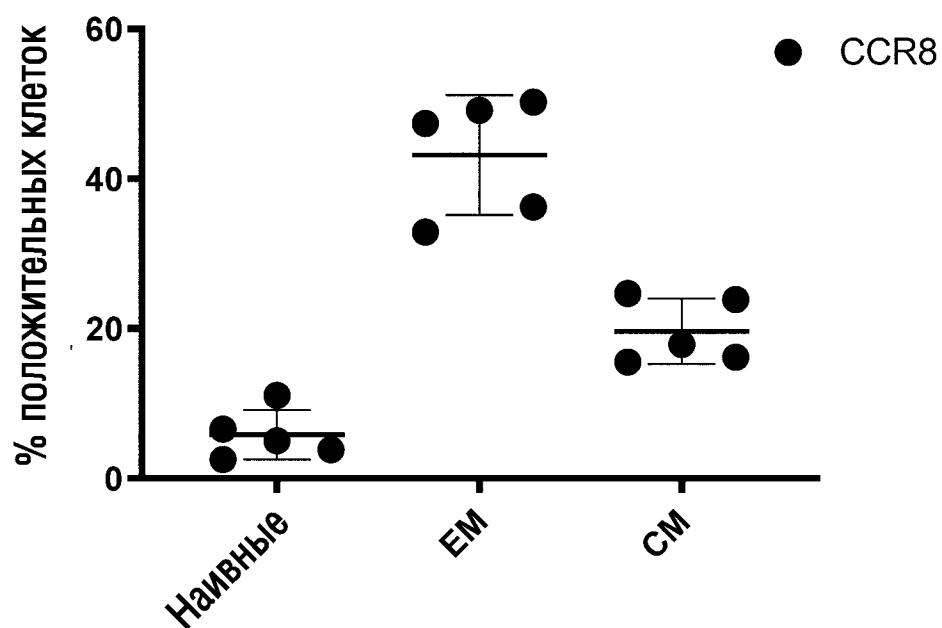
ФИГ.3С



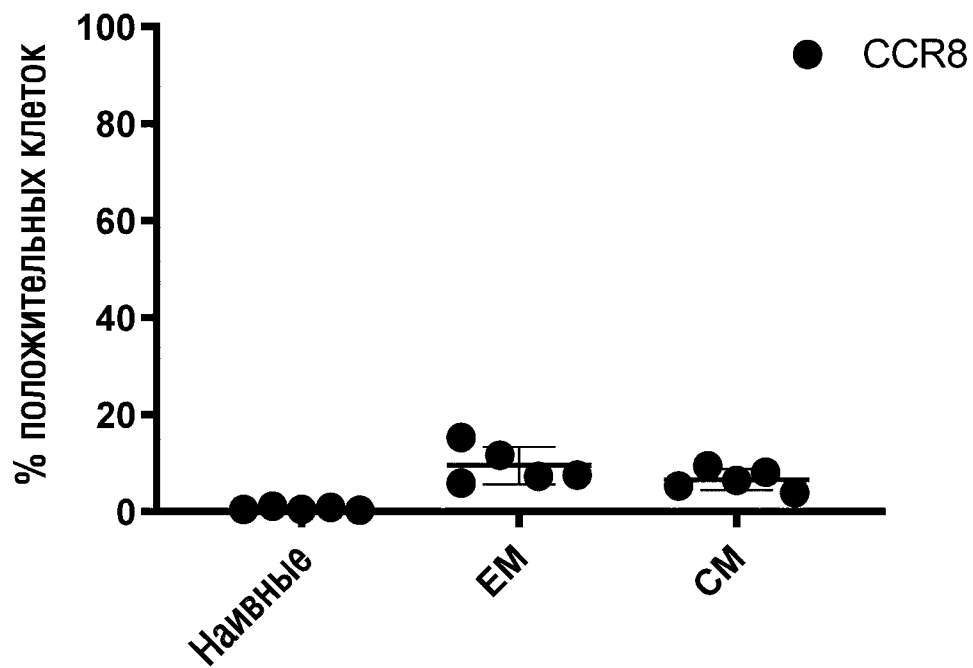
ФИГ.4А



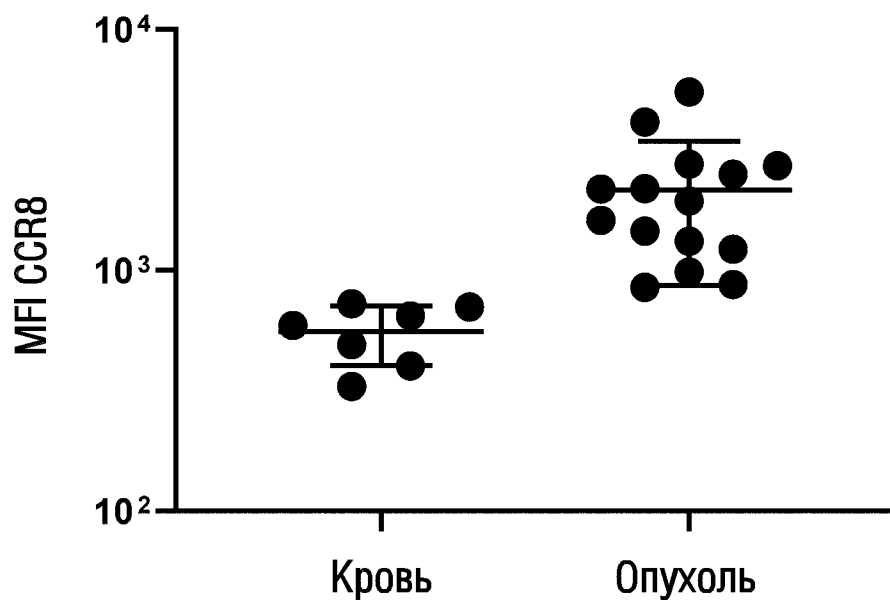
ФИГ.4В



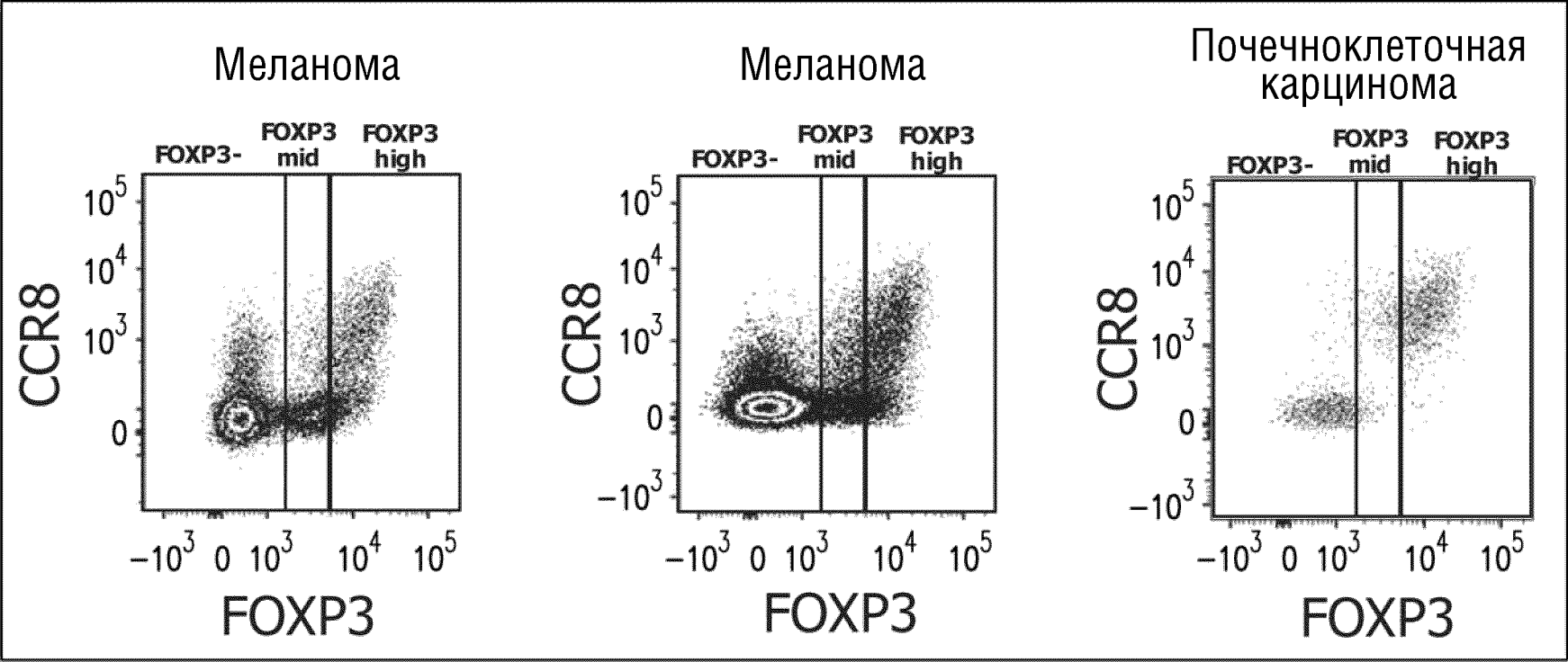
ФИГ.4С



ФИГ.4D

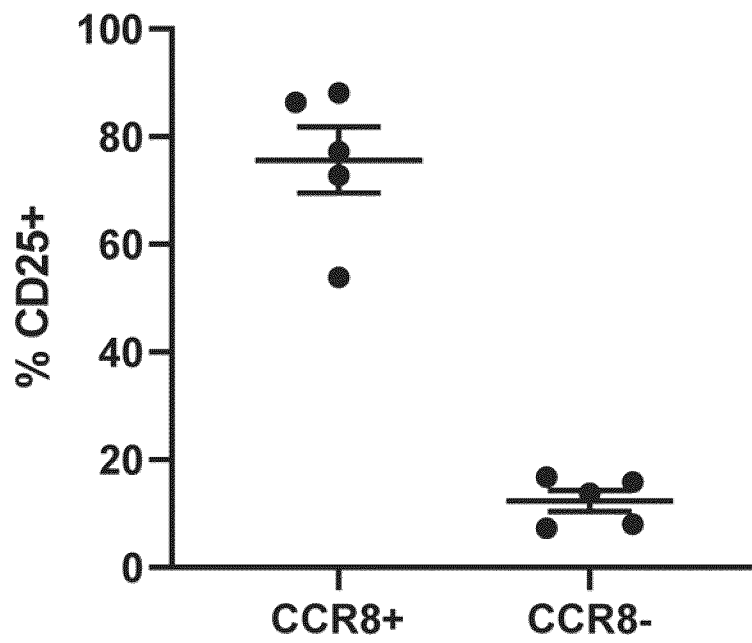


ФИГ.5

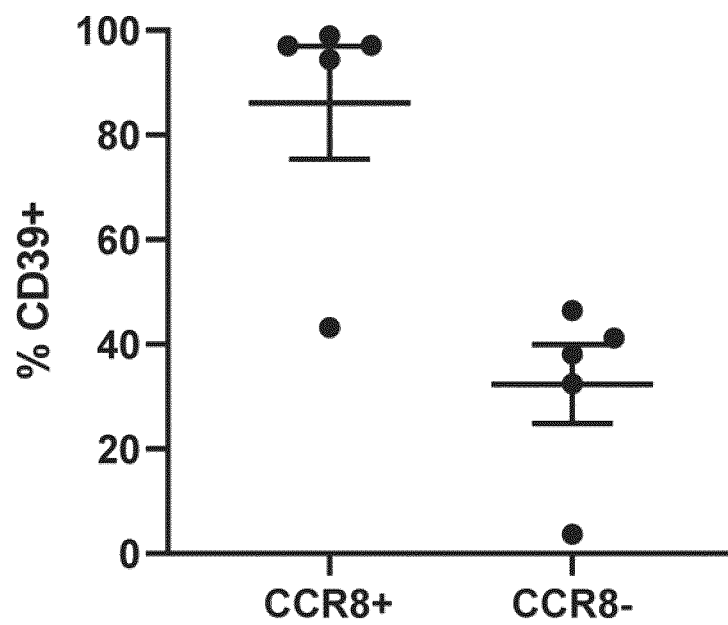




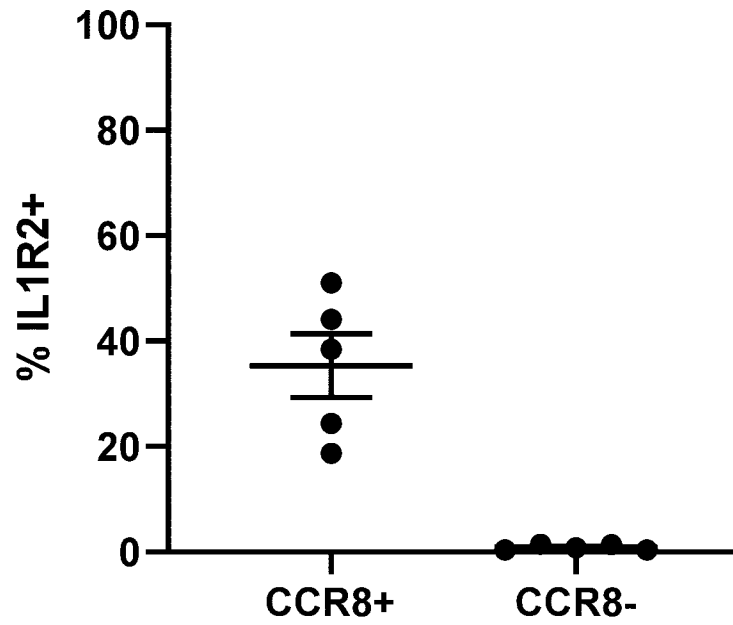
ФИГ.6А



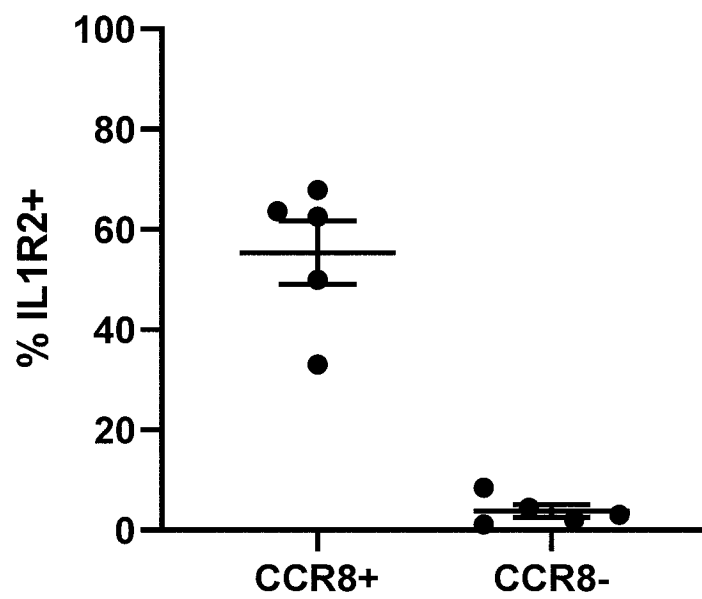
ФИГ.6В



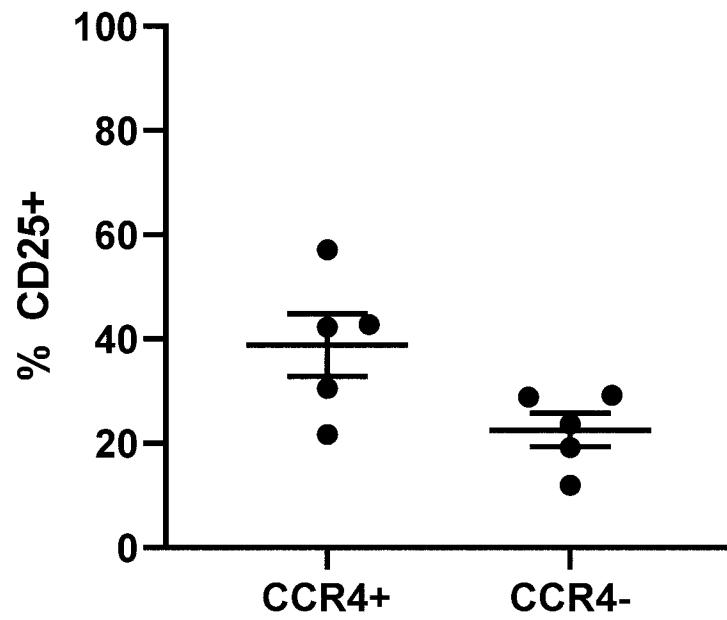
ФИГ.6С



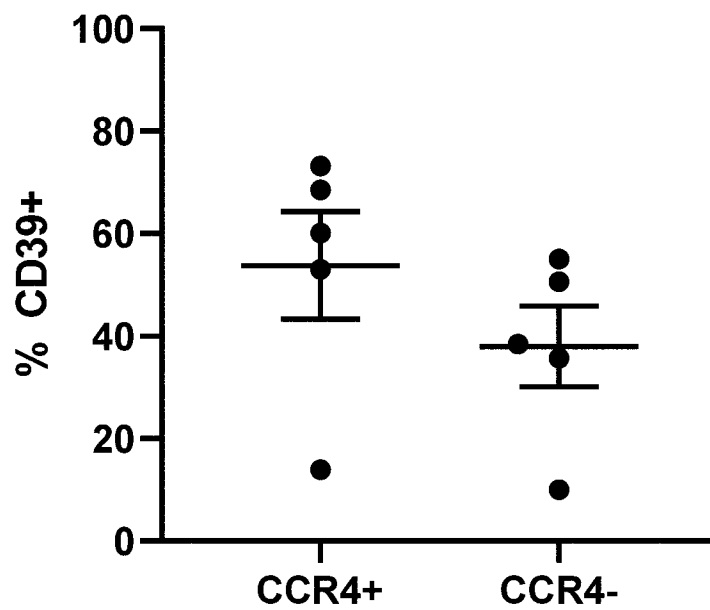
ФИГ.6D



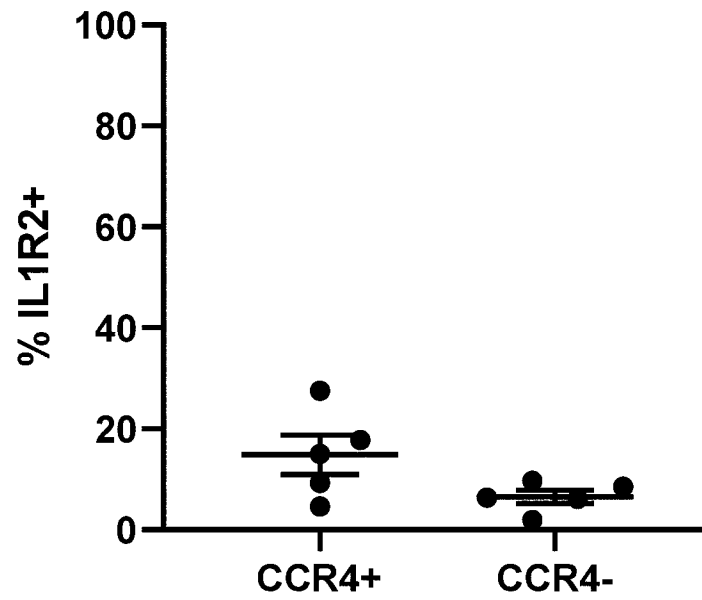
ФИГ.7А



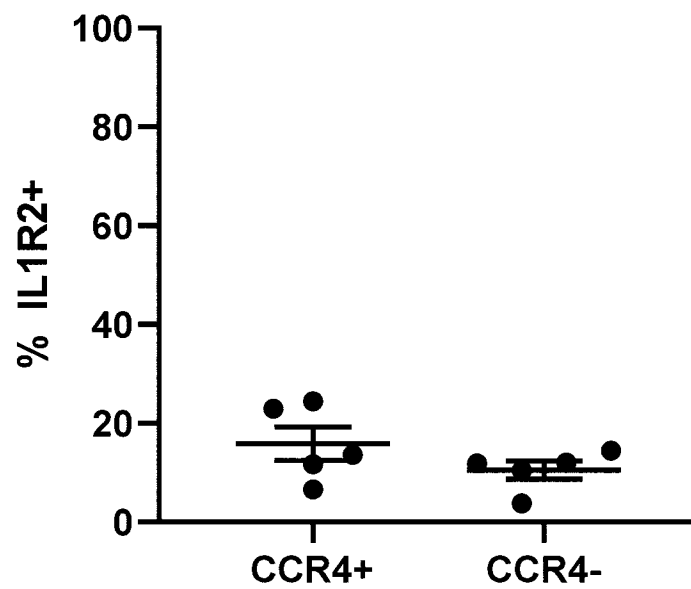
ФИГ.7В



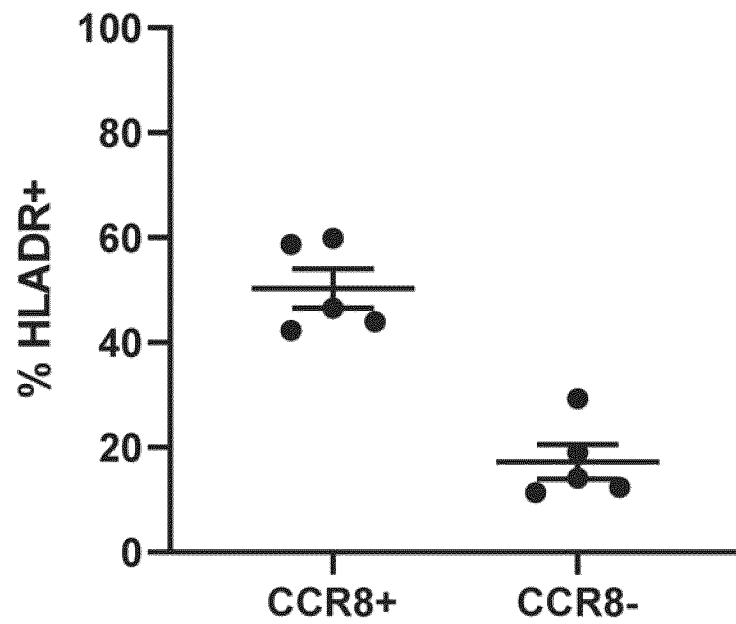
ФИГ.7С



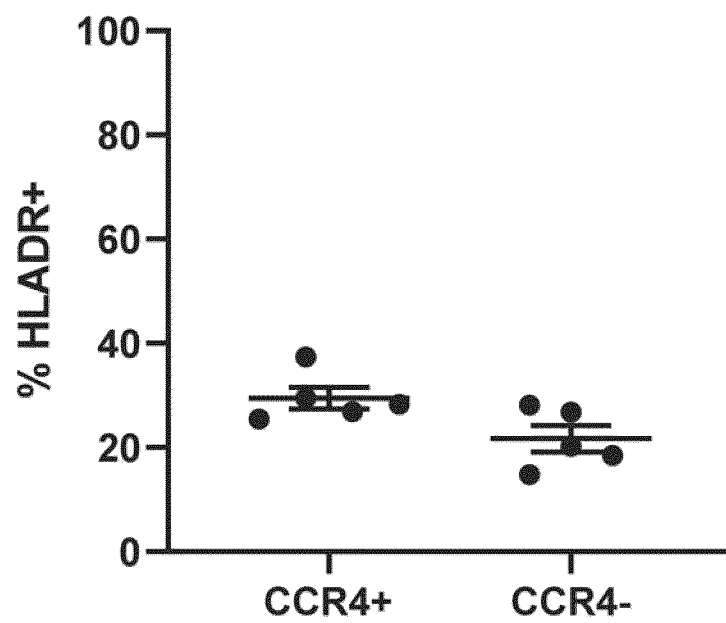
ФИГ.7D



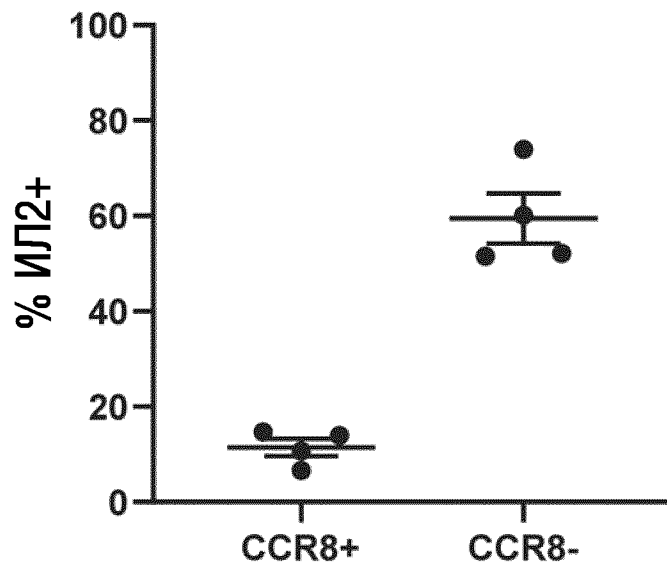
ФИГ.8А



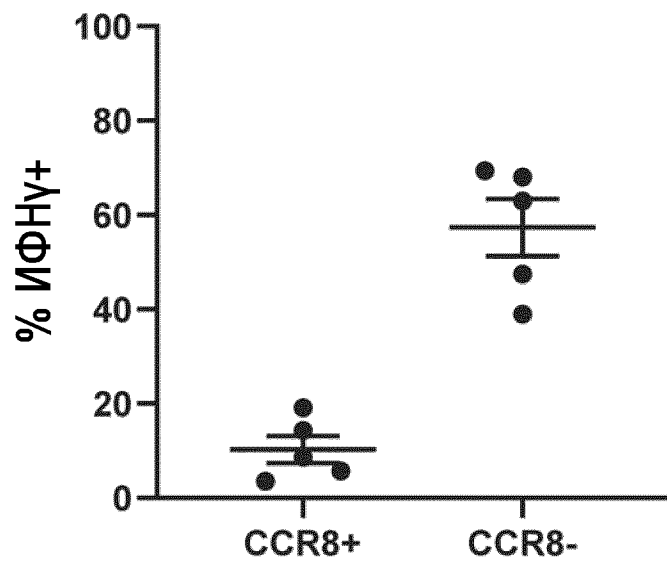
ФИГ.8В



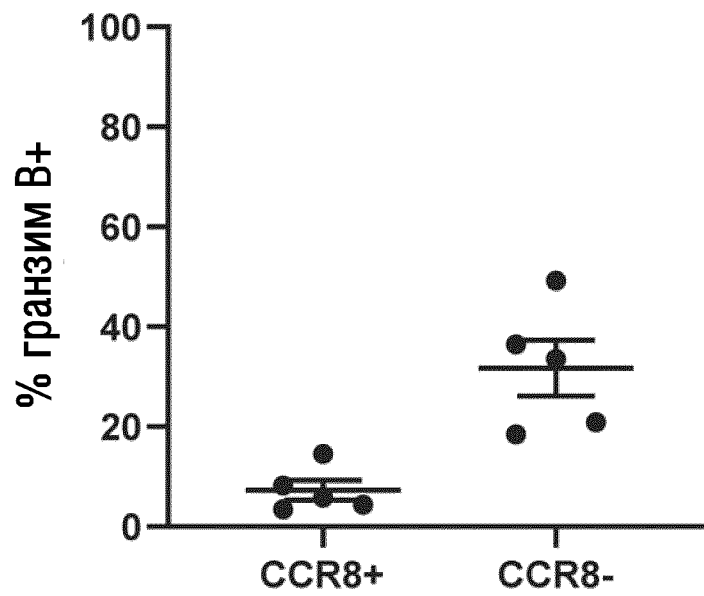
ФИГ.9А



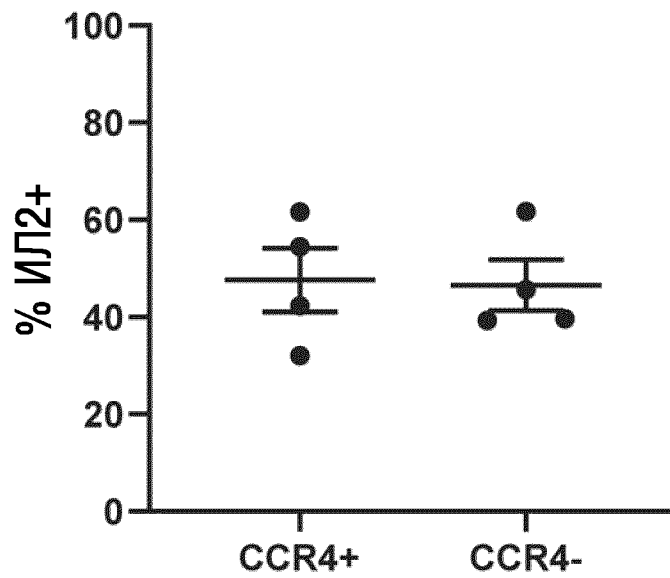
ФИГ.9В



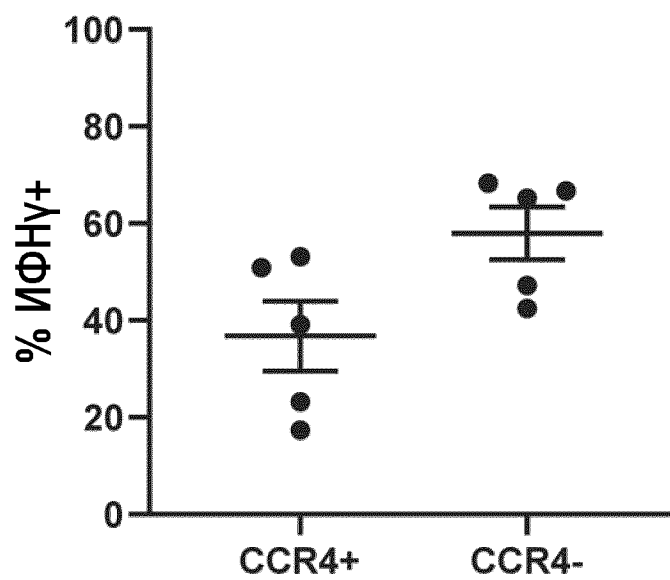
ФИГ.9С



ФИГ.10А

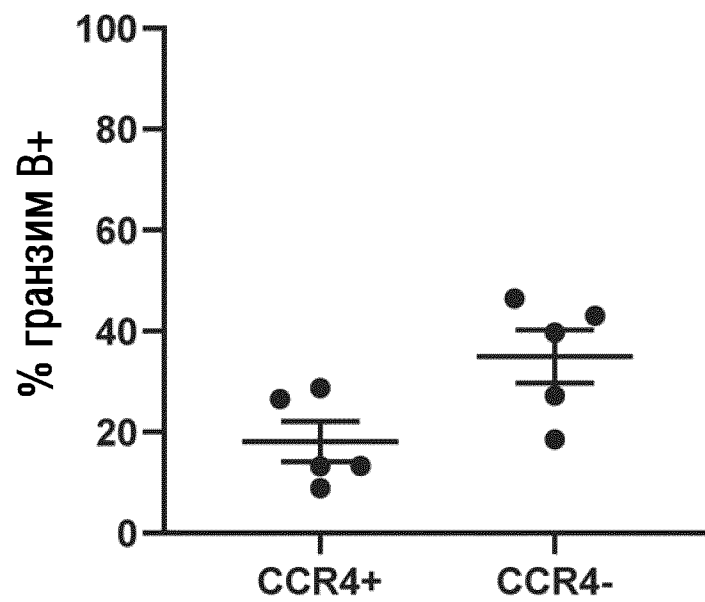


ФИГ.10В

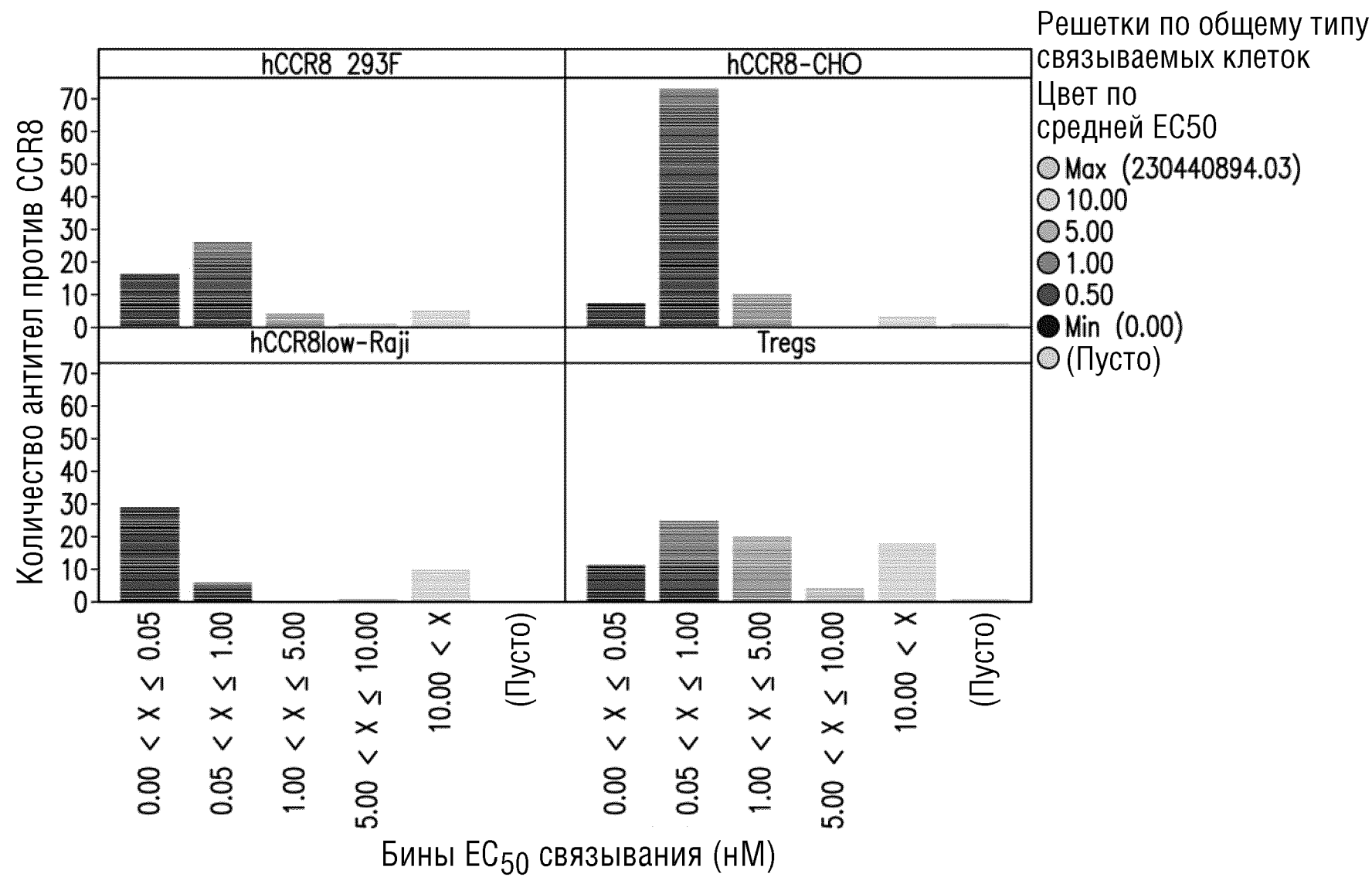




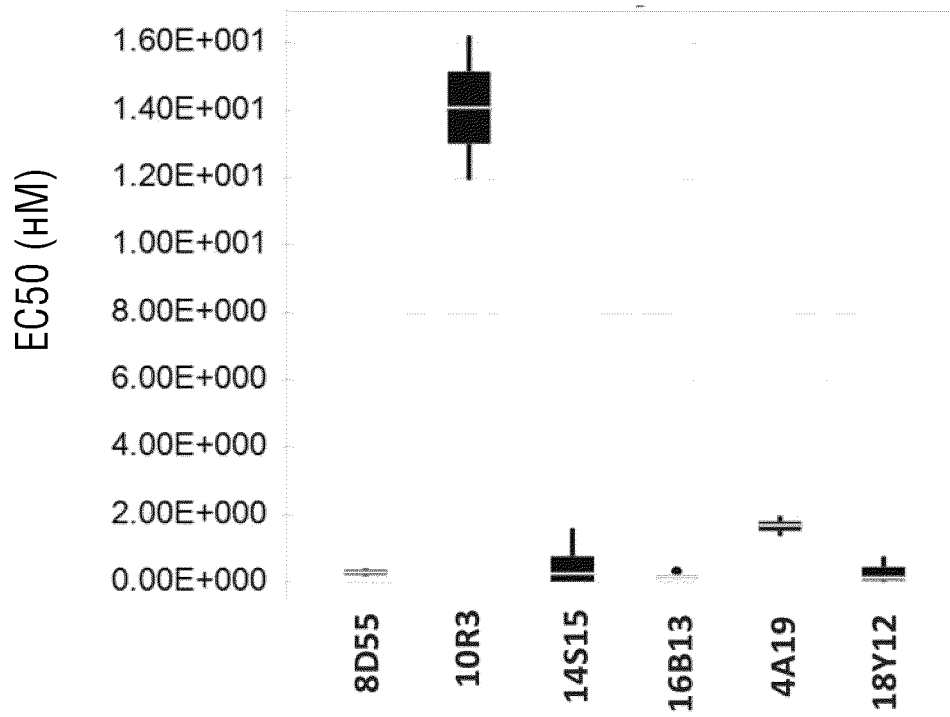
ФИГ.10С



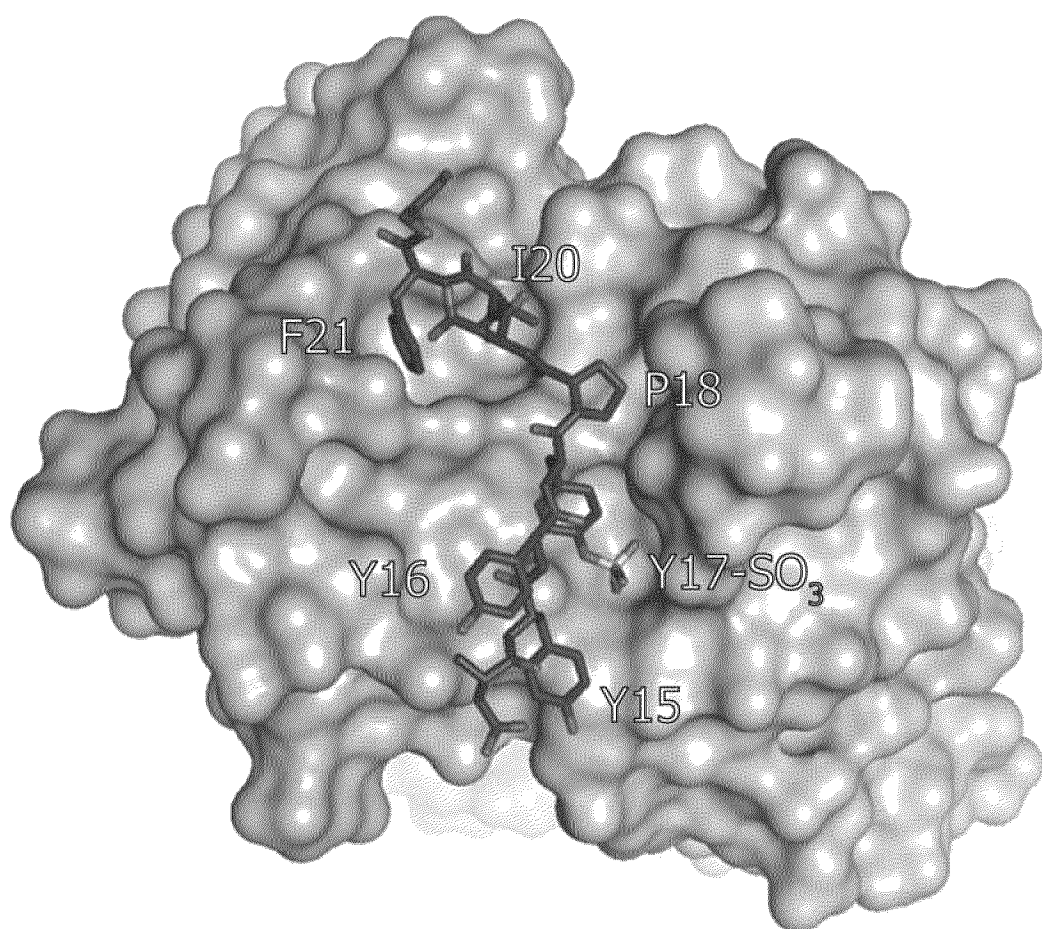
ФИГ.11А



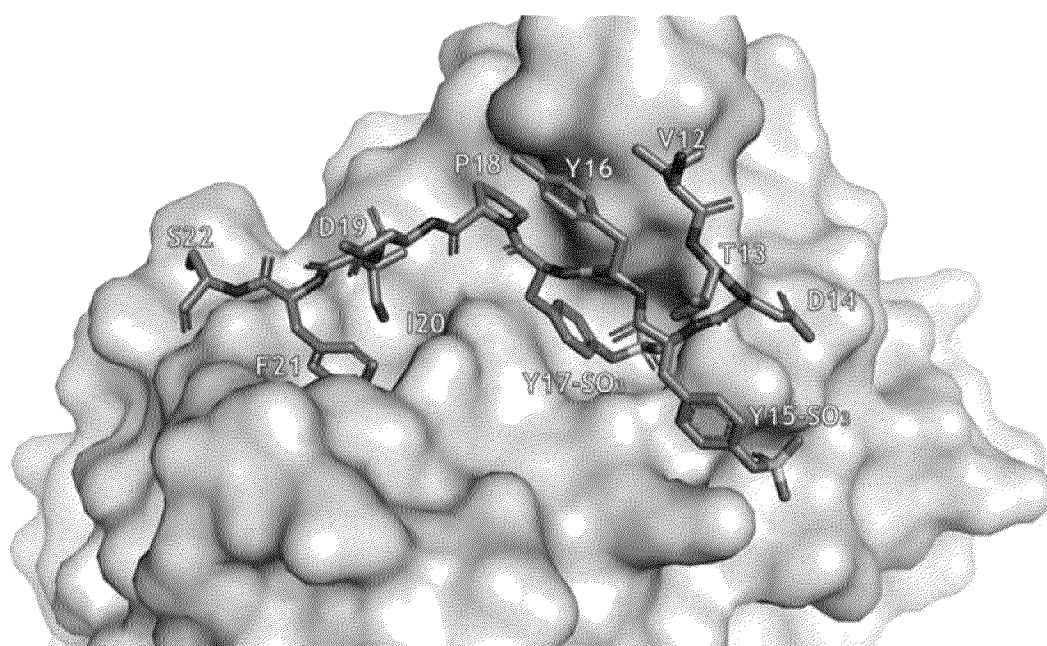
ФИГ.11В



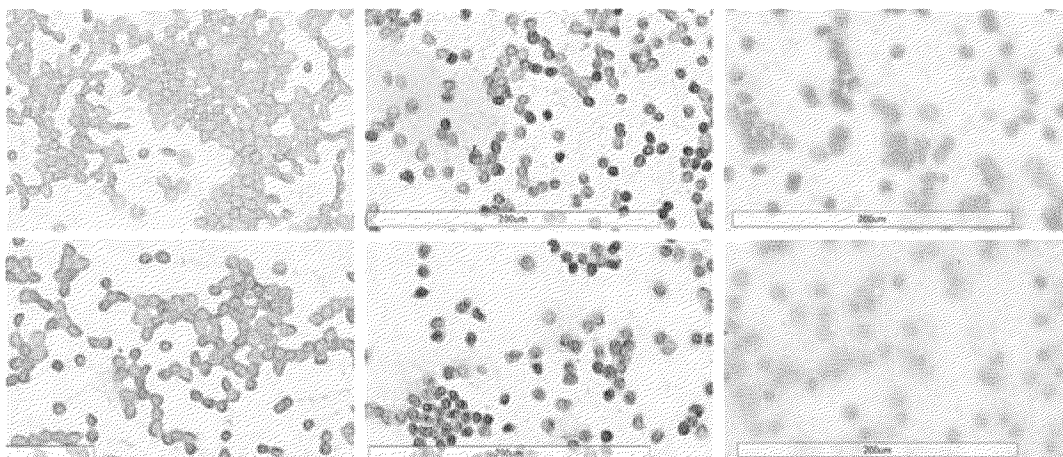
ФИГ.12А



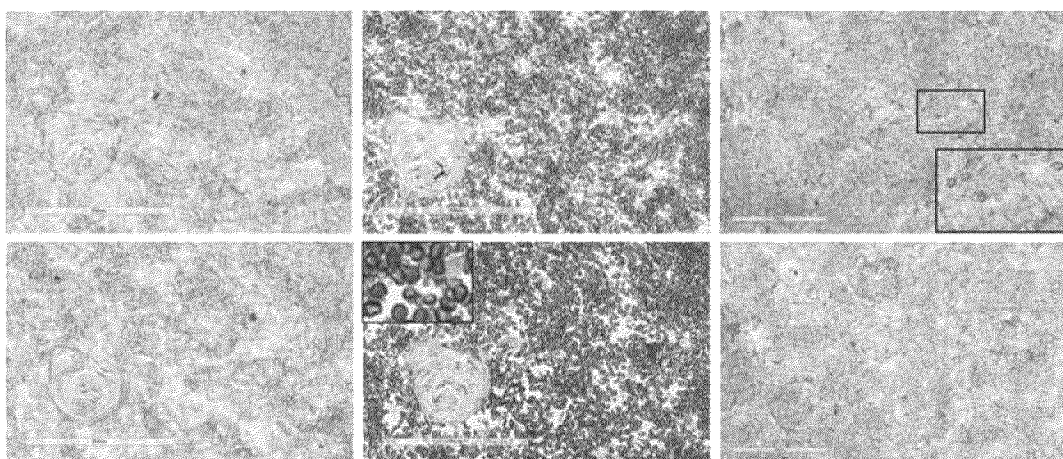
ФИГ.12В



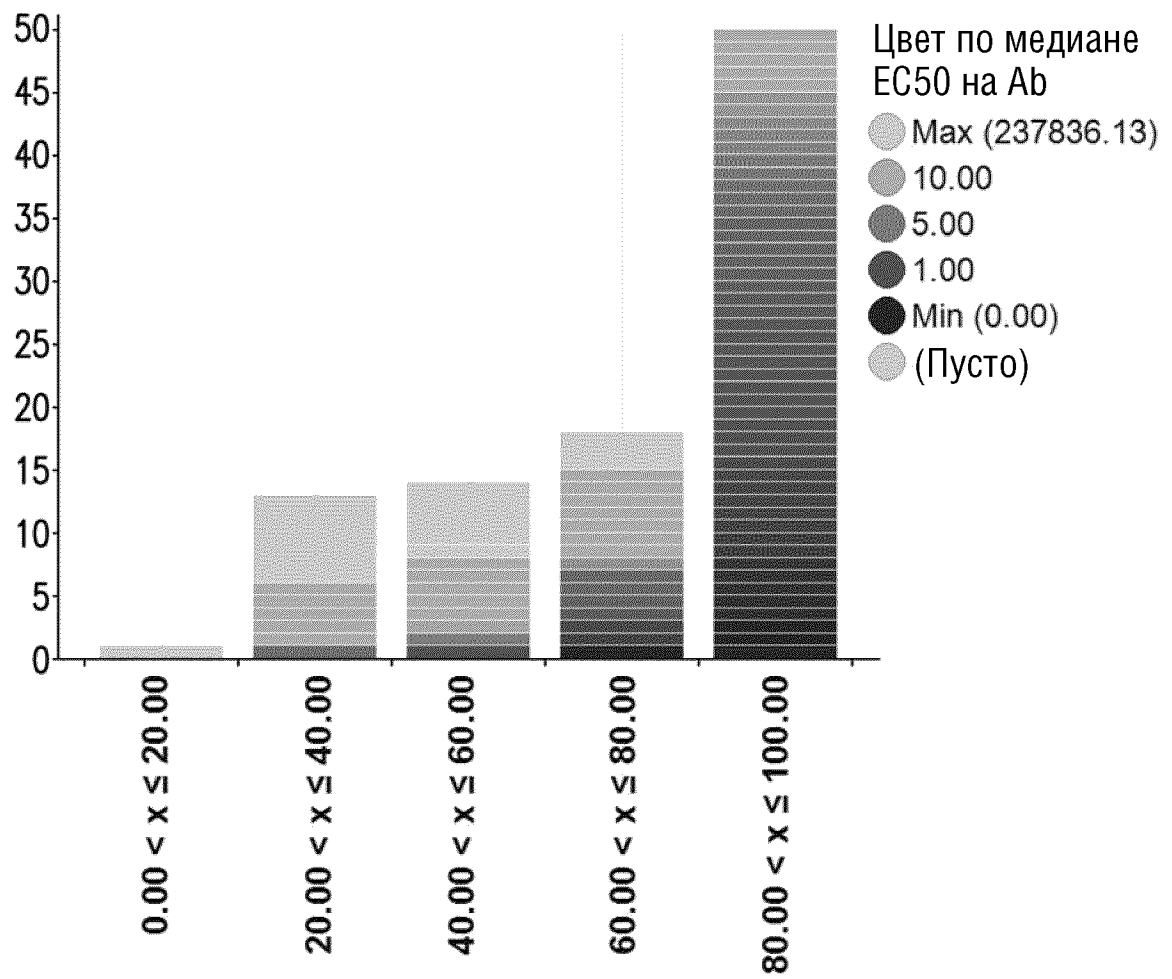
ФИГ.13А



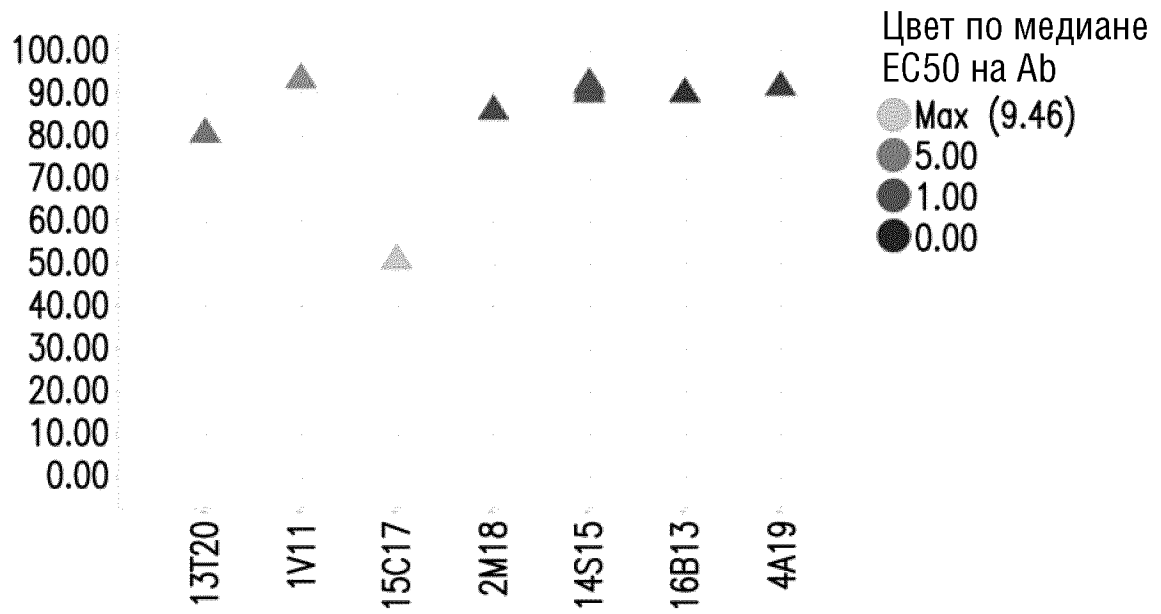
ФИГ.13В



ФИГ.14А

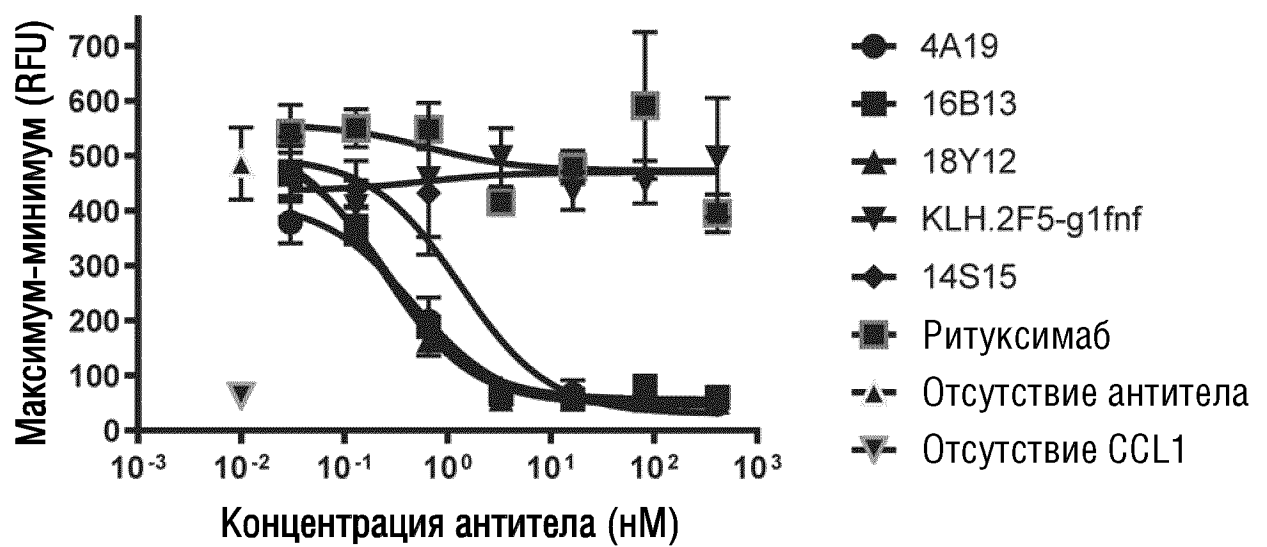


ФИГ.14В

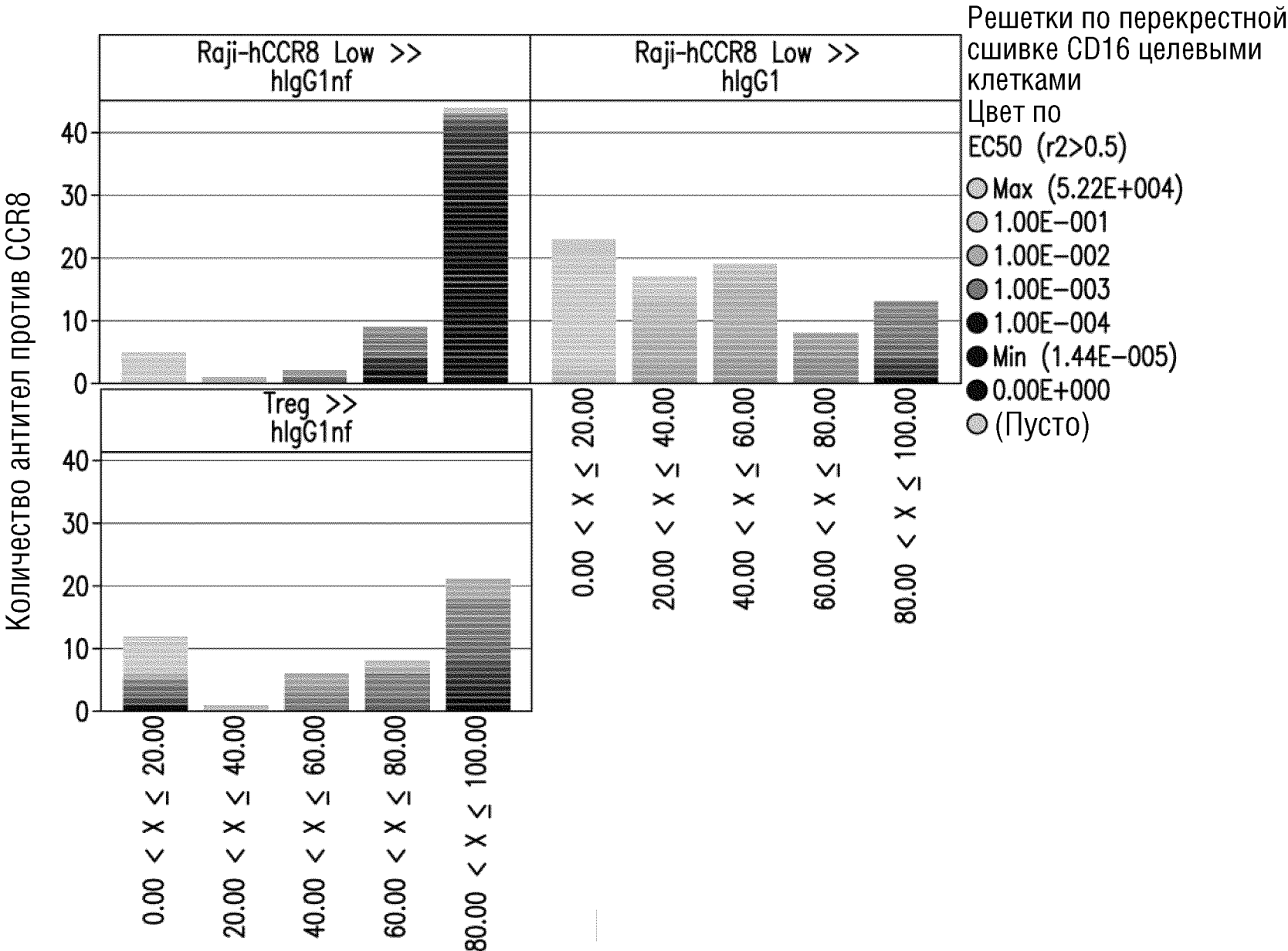




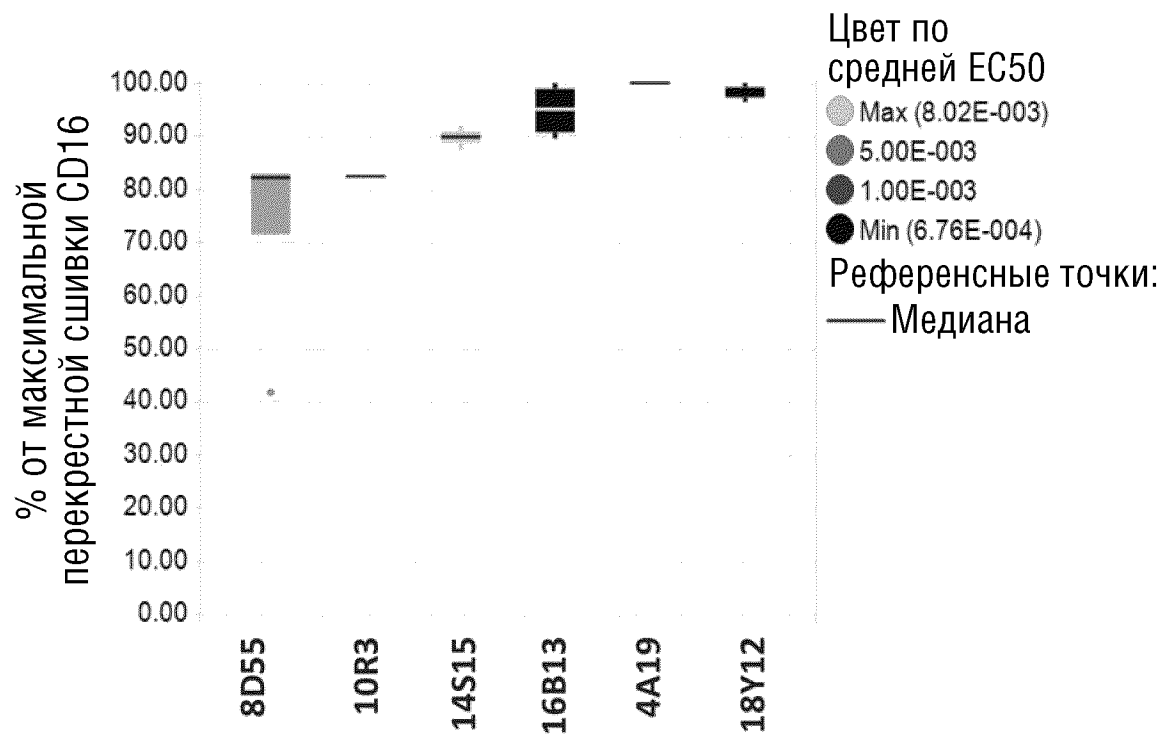
ФИГ.14С



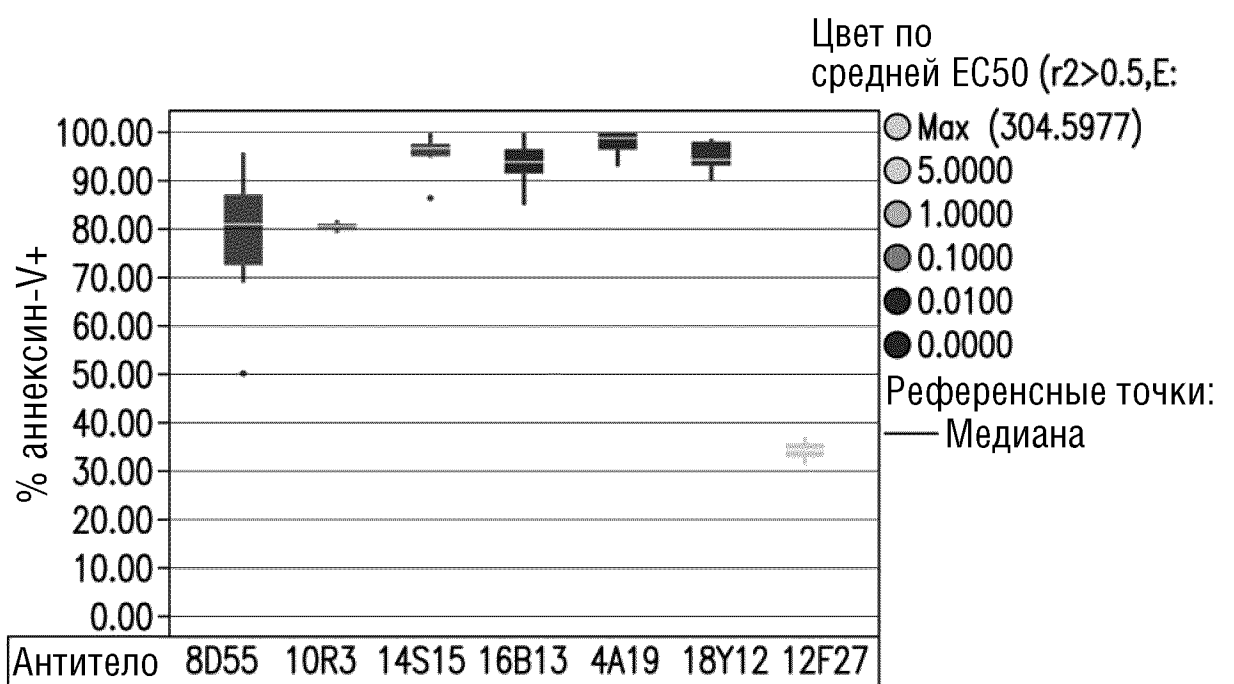
ФИГ.15А



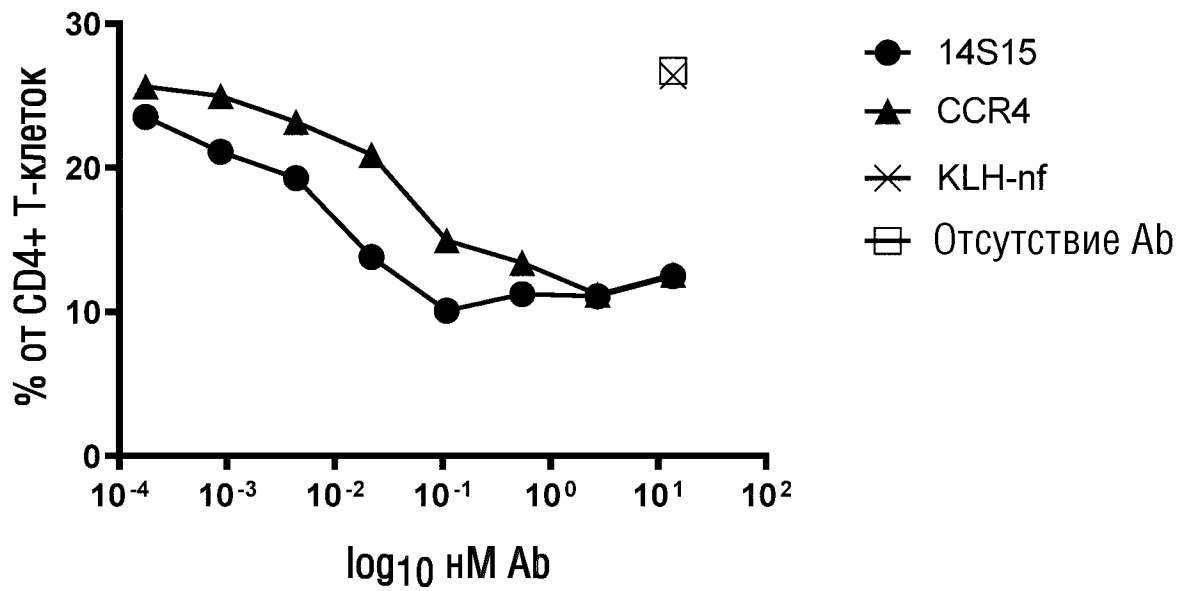
ФИГ.15В



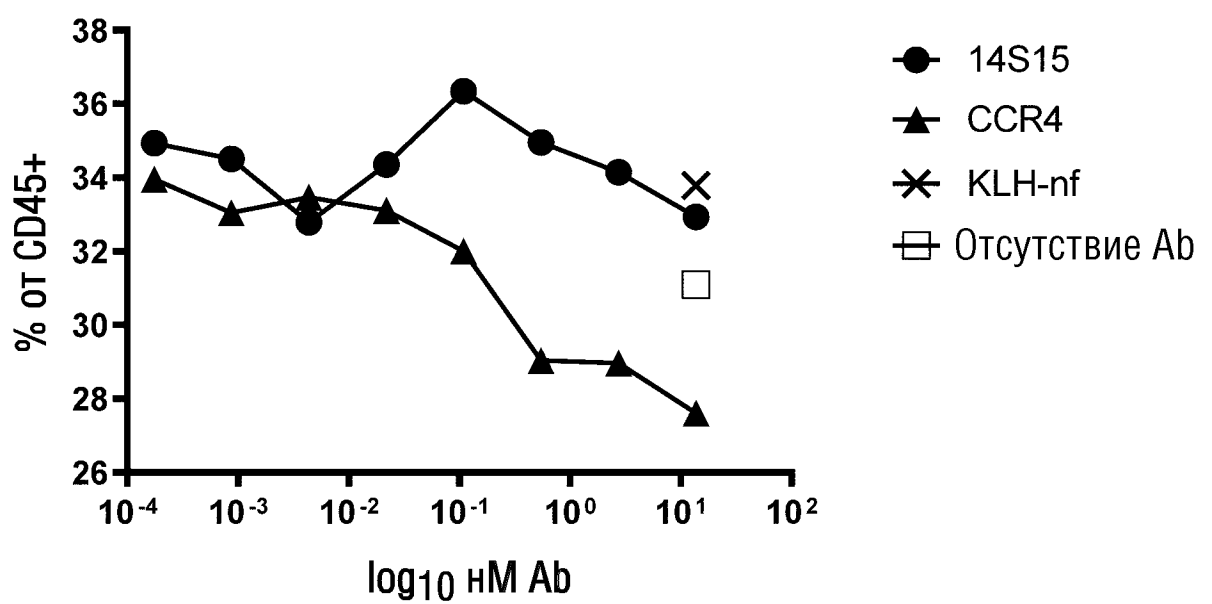
ФИГ.16



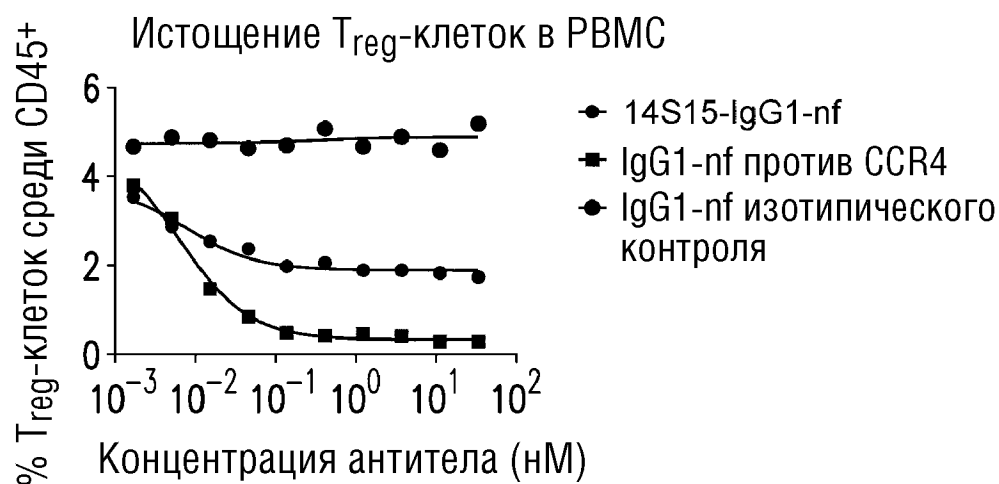
ФИГ.17А



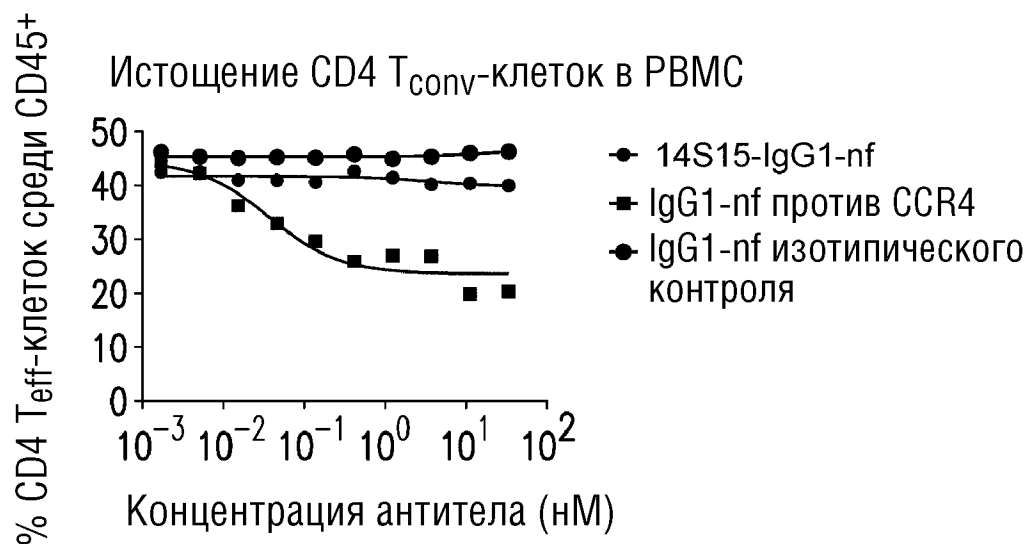
ФИГ.17В



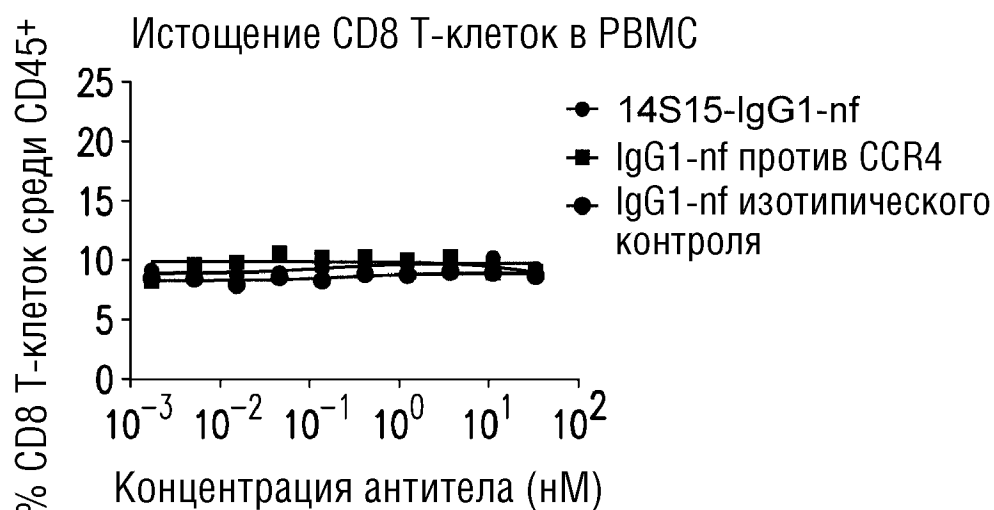
ФИГ.18А



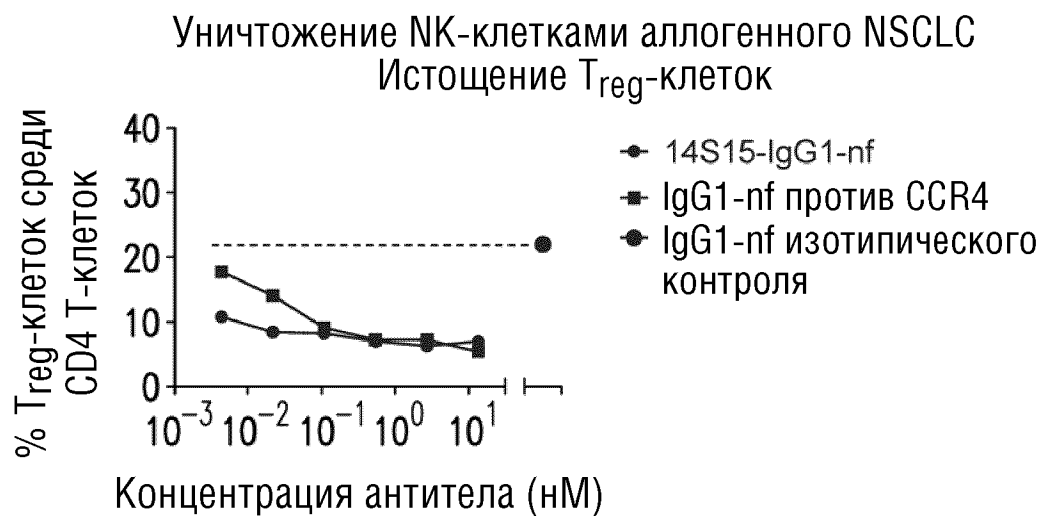
ФИГ.18В



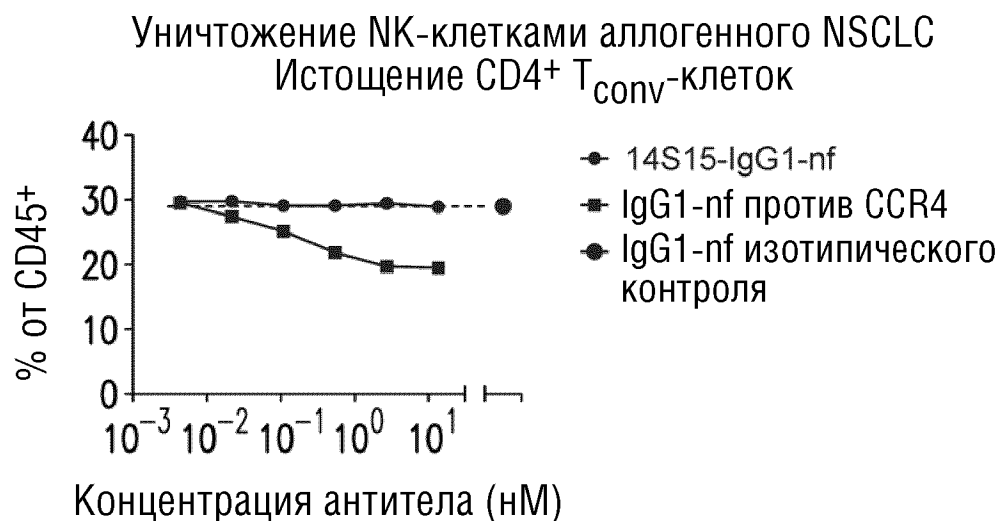
ФИГ.18С



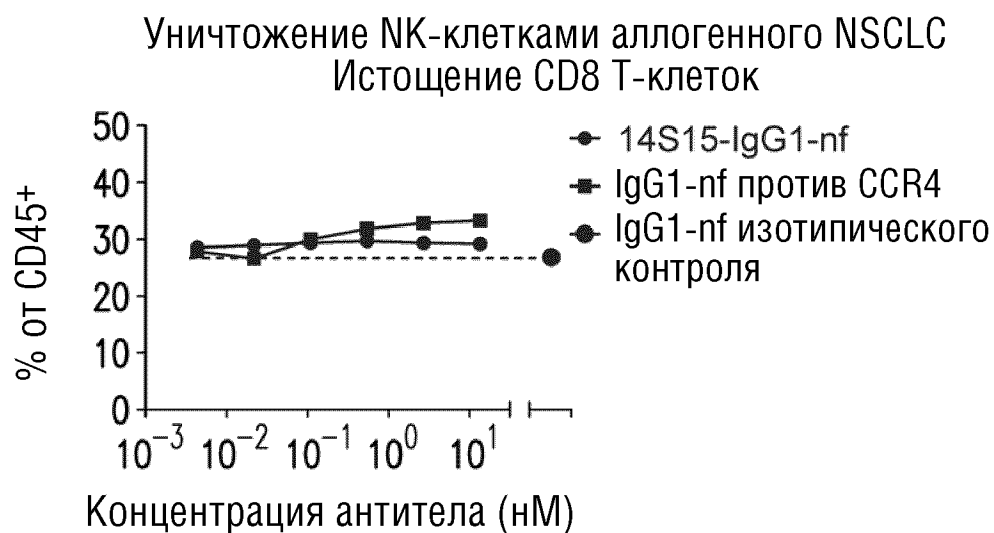
ФИГ.18D



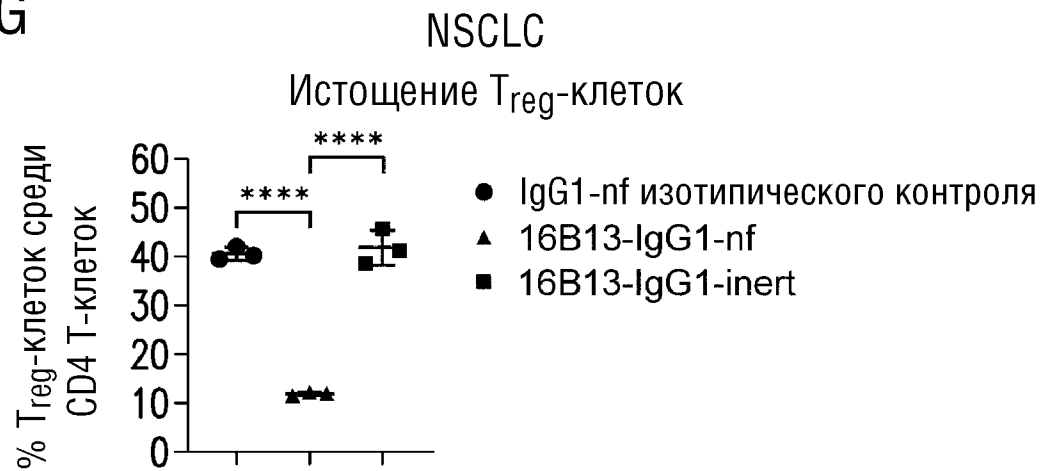
ФИГ.18E



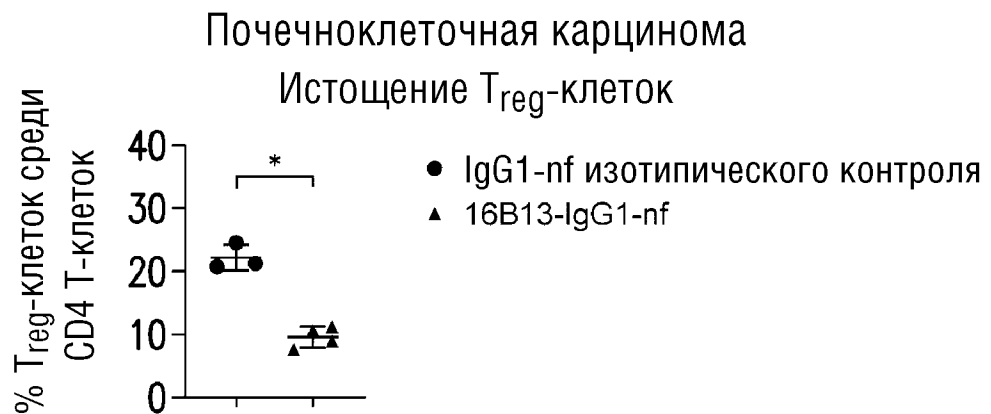
ФИГ.18F



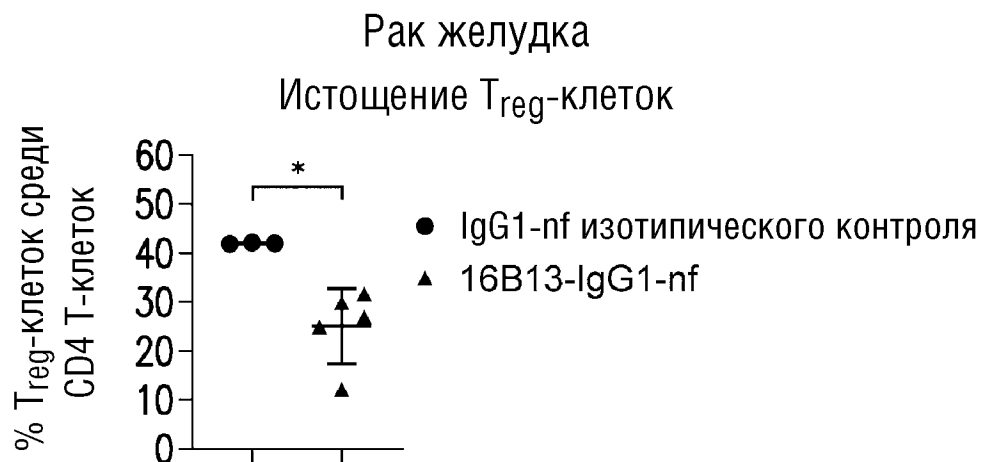
ФИГ.18G



ФИГ.18H

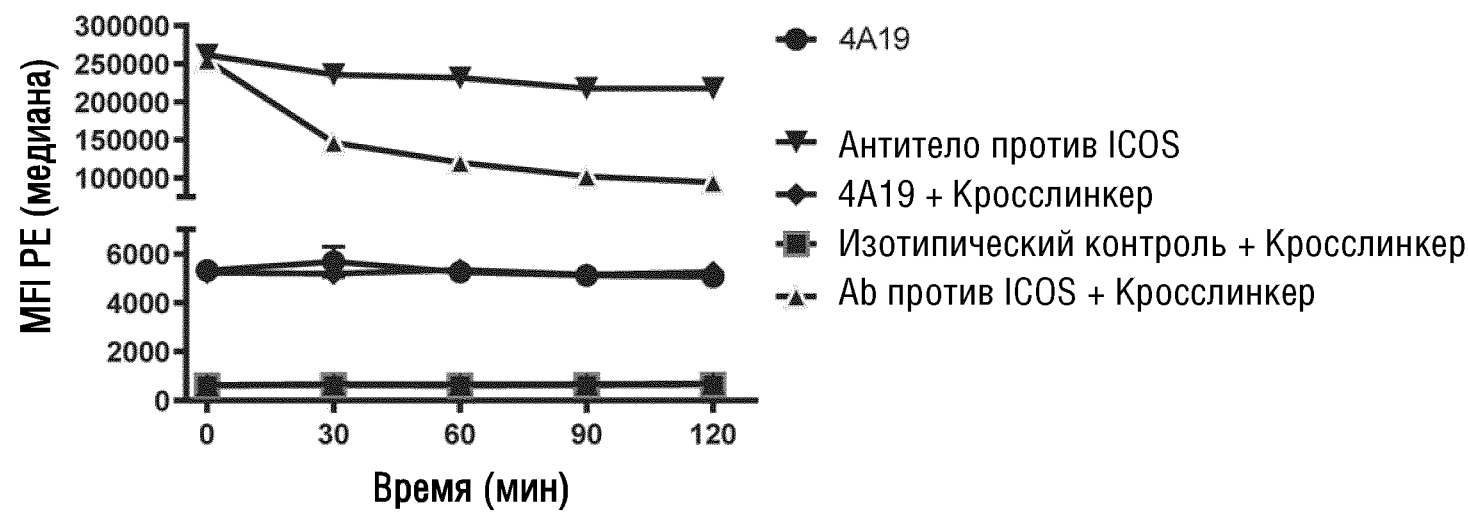


ФИГ.18I

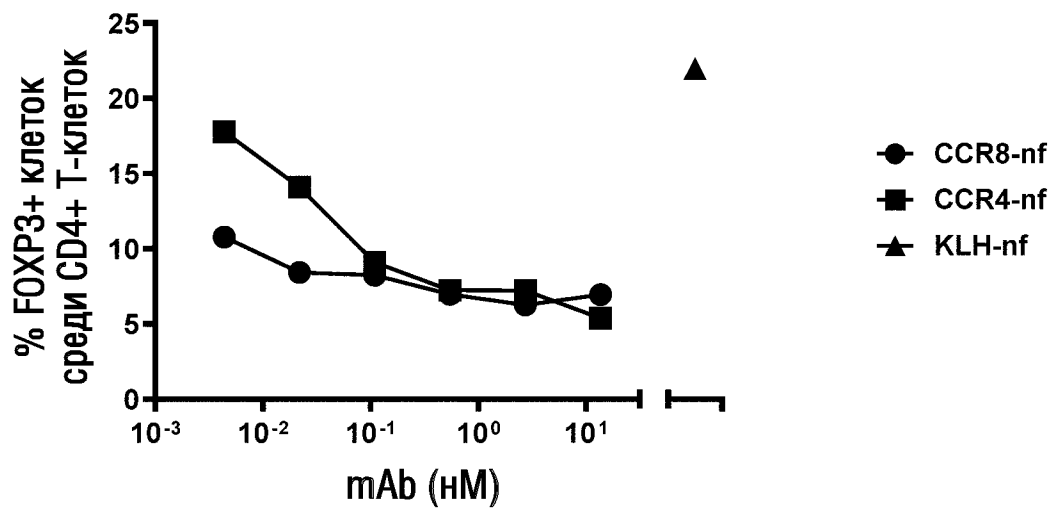




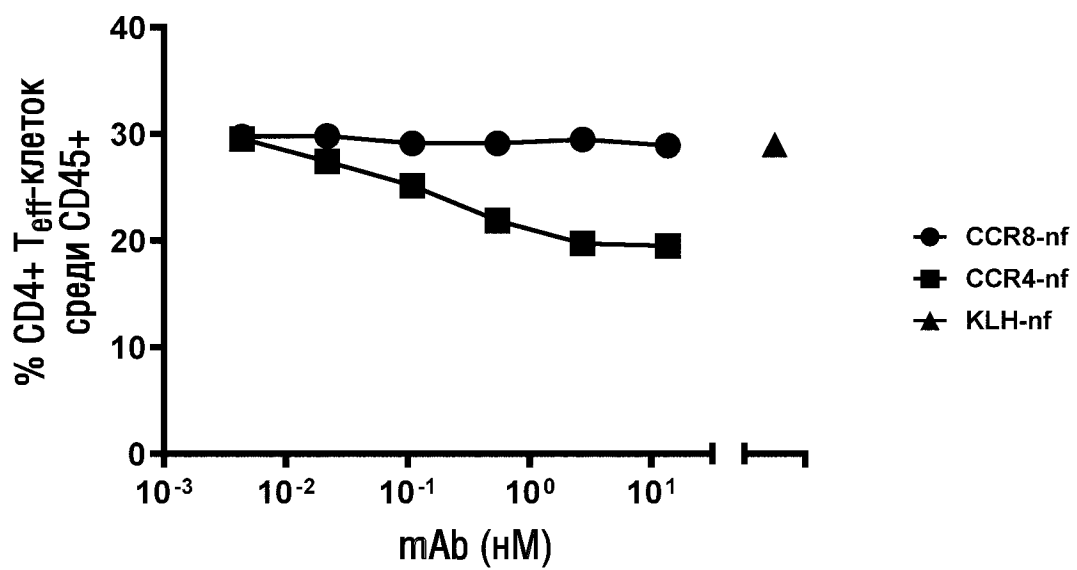
ФИГ.19



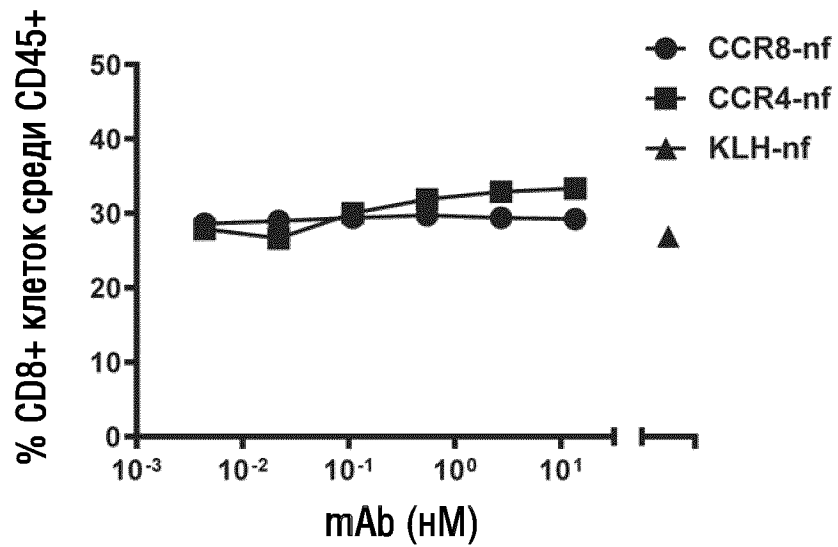
ФИГ.20А



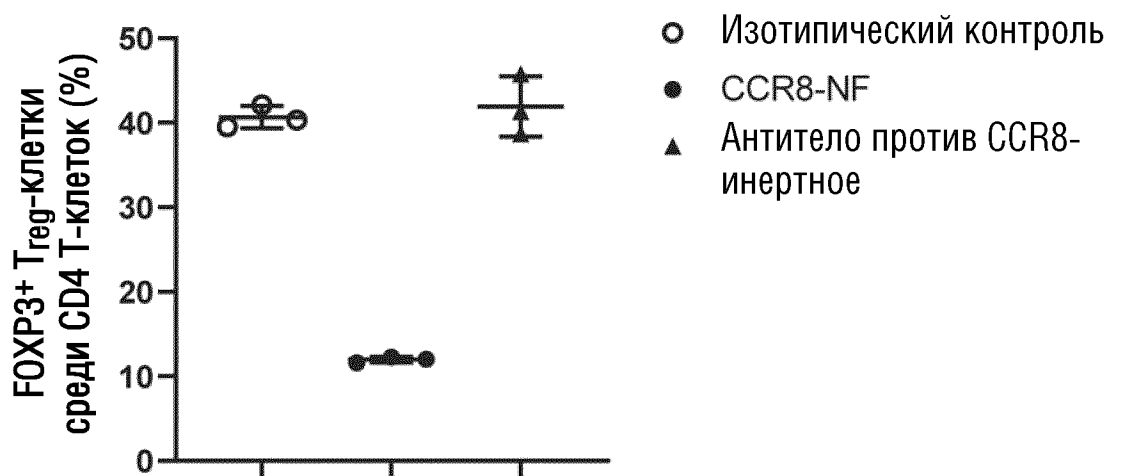
ФИГ.20В



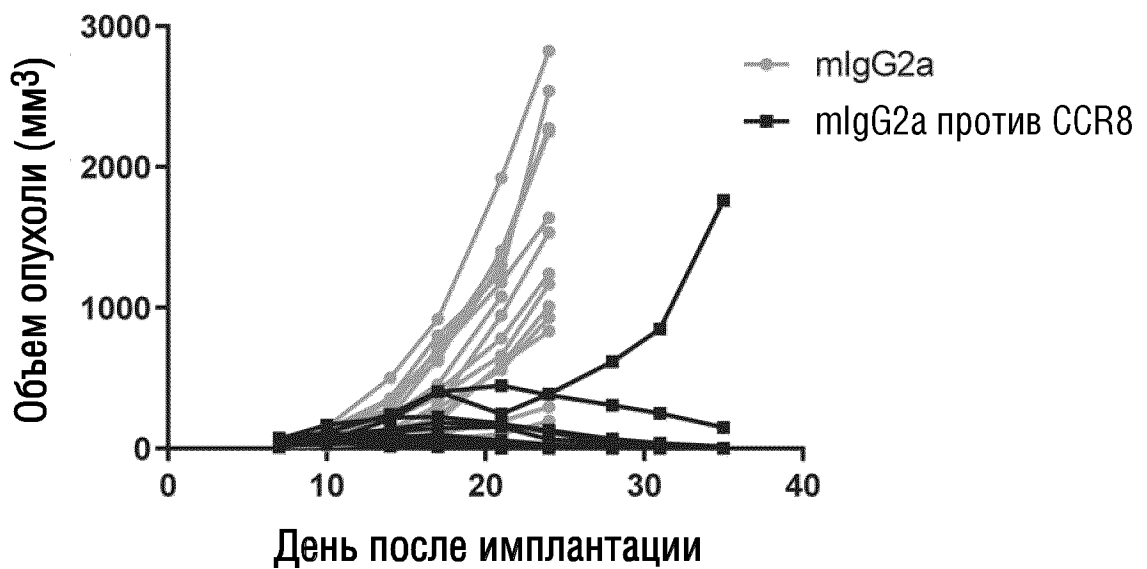
ФИГ.20С



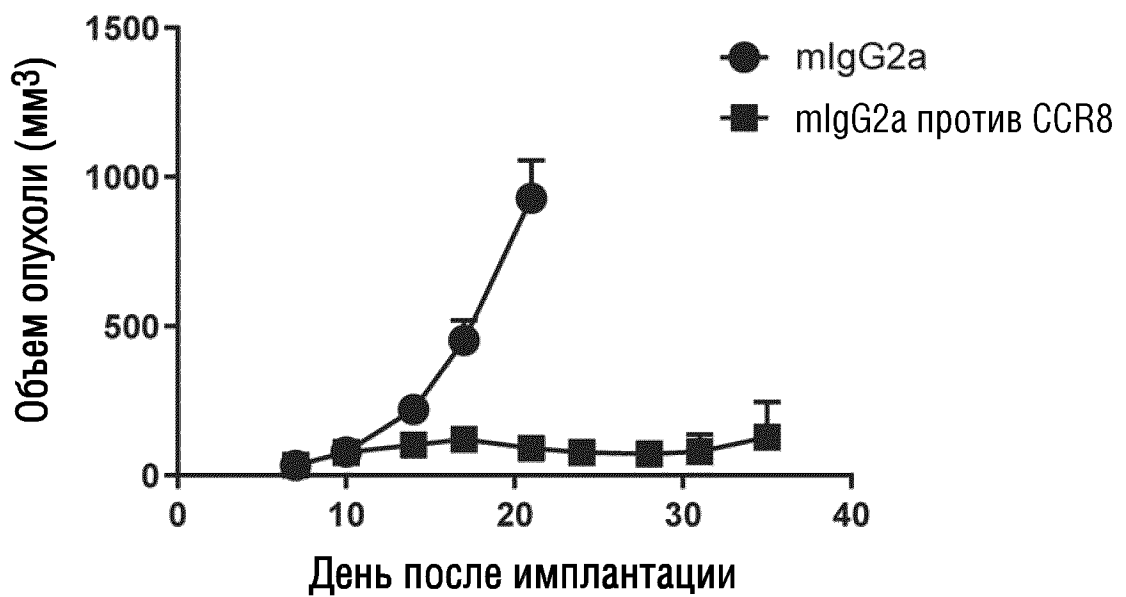
ФИГ.20D



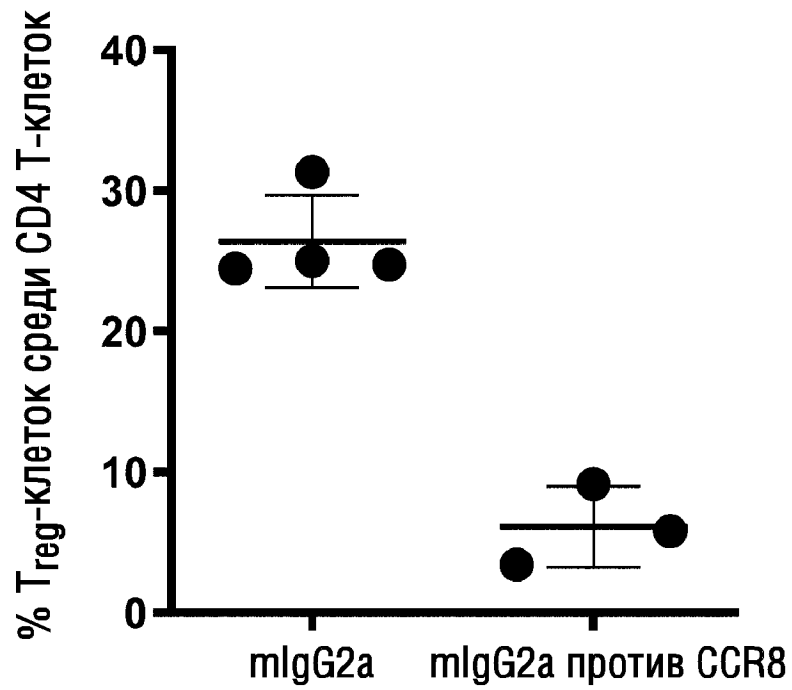
ФИГ.21А



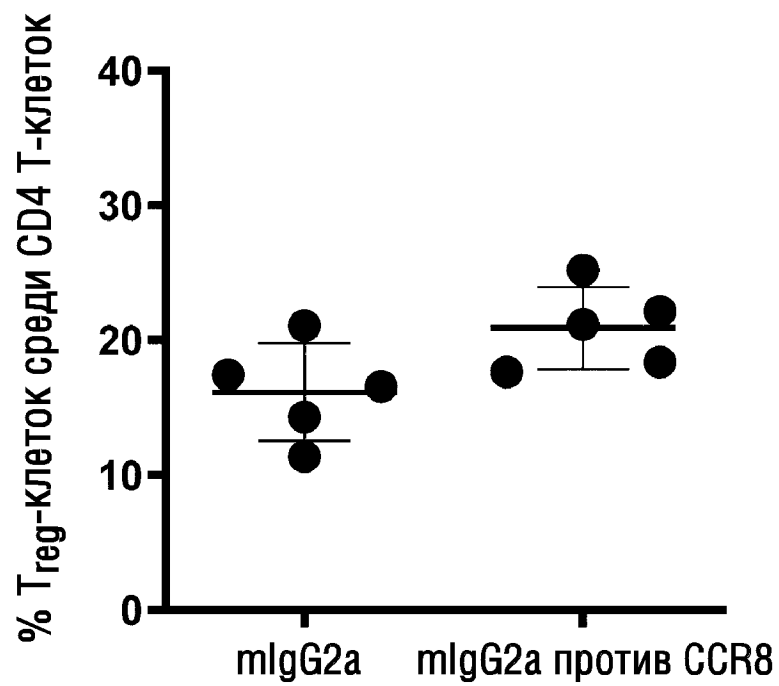
ФИГ.21В



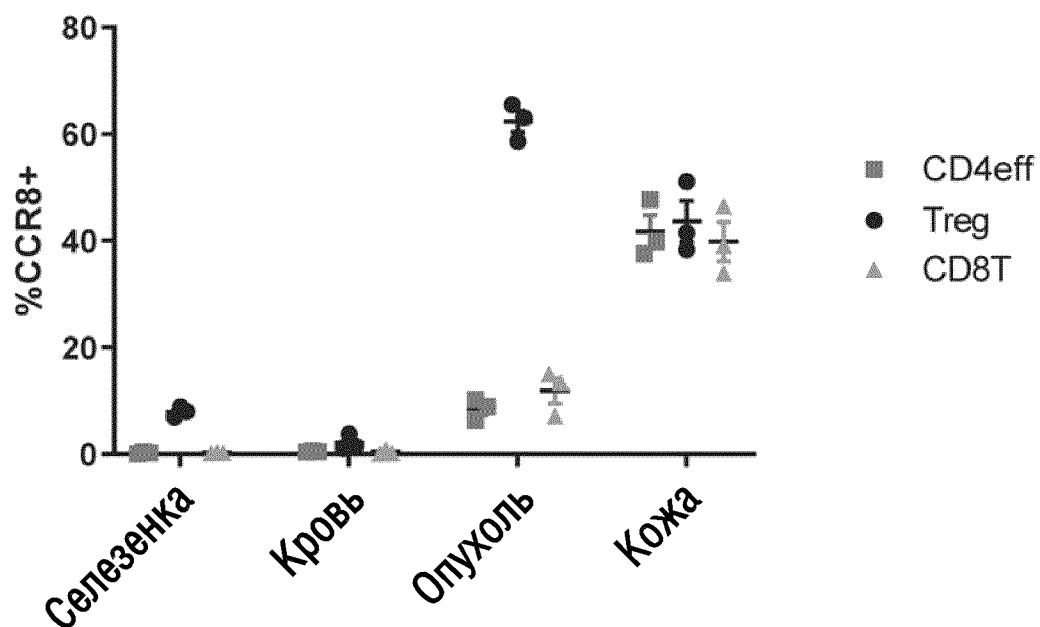
ФИГ.21С



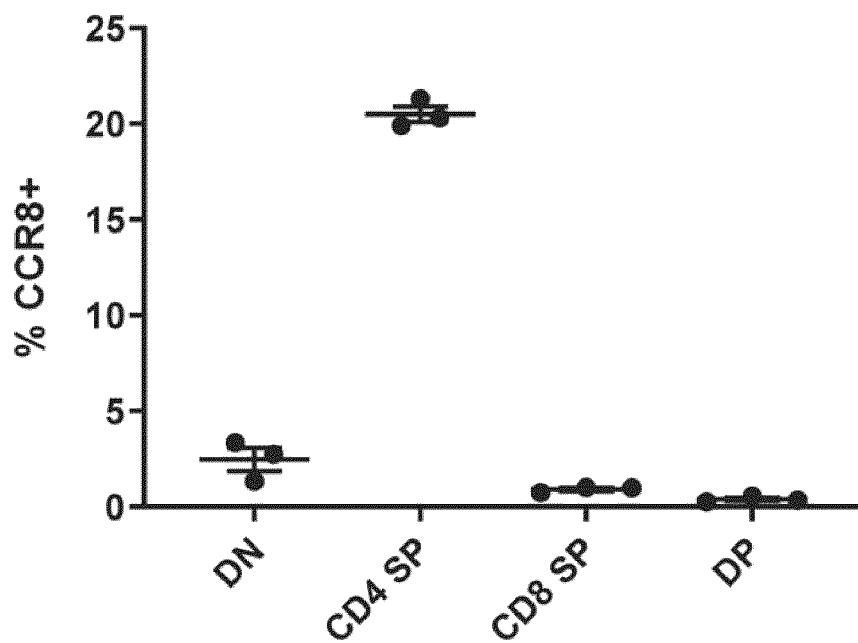
ФИГ.21D



ФИГ.22А



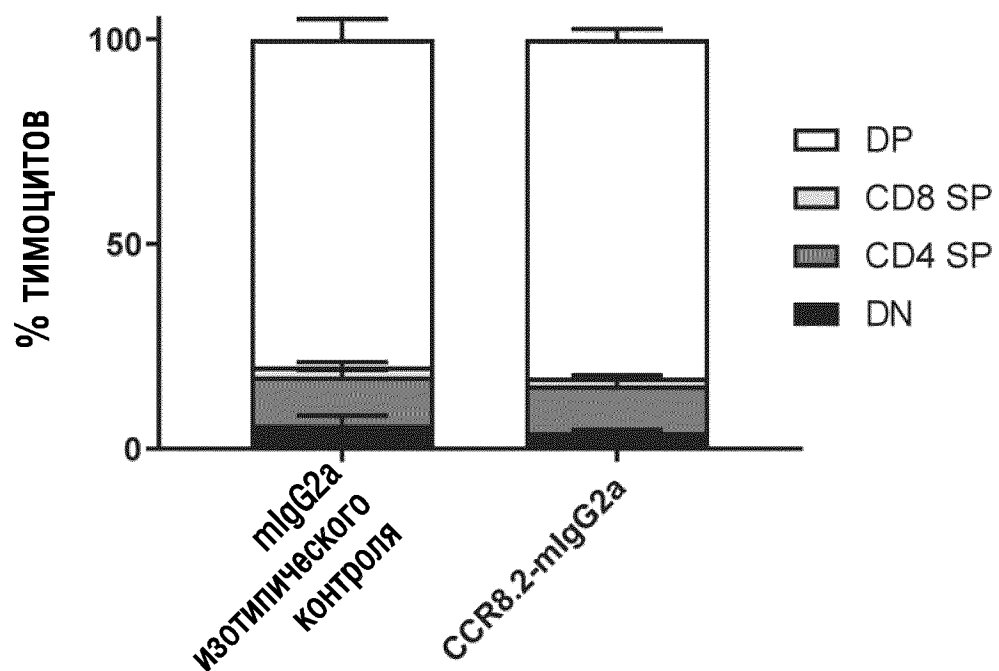
ФИГ.22В



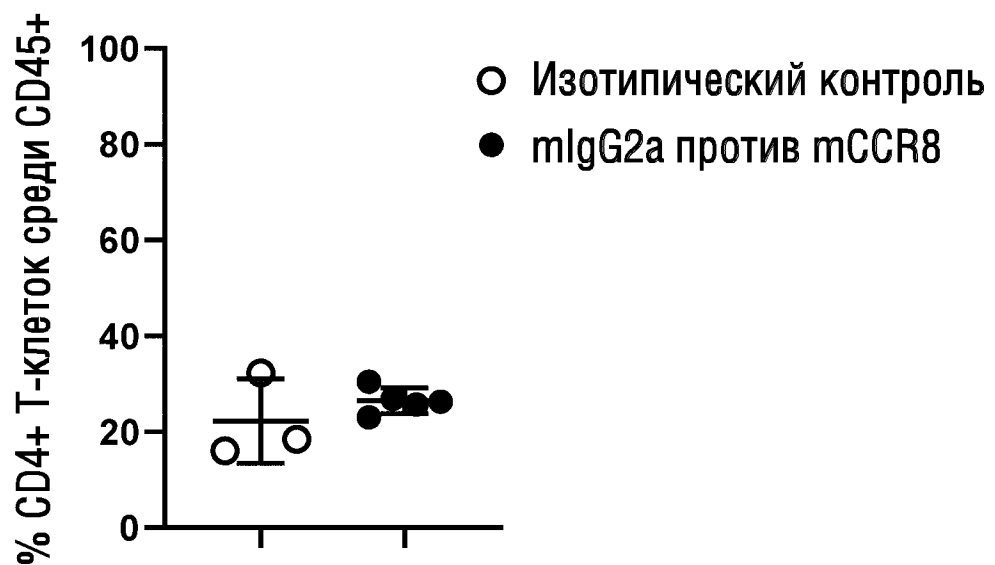
ФИГ.22С



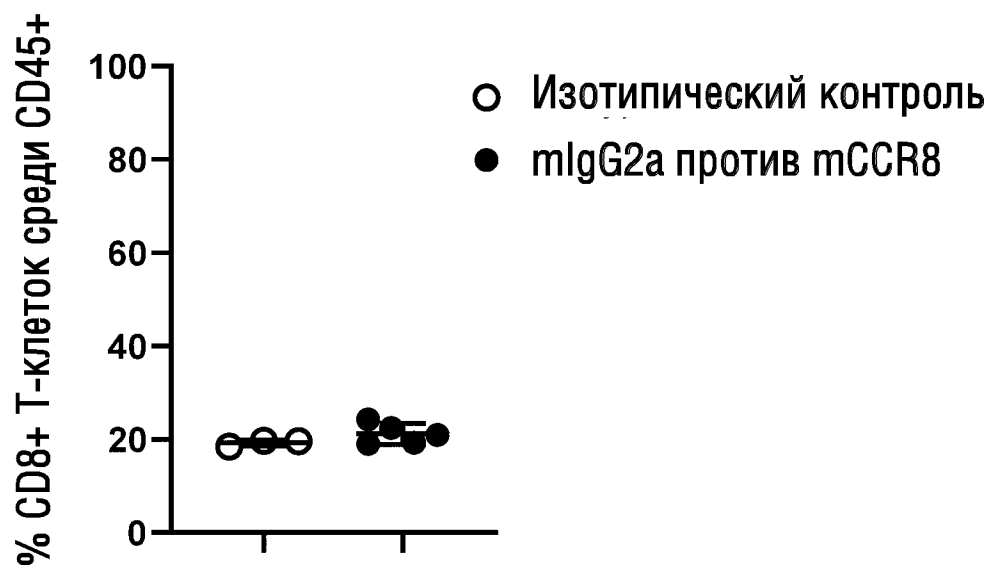
ФИГ.22D



ФИГ.22Е

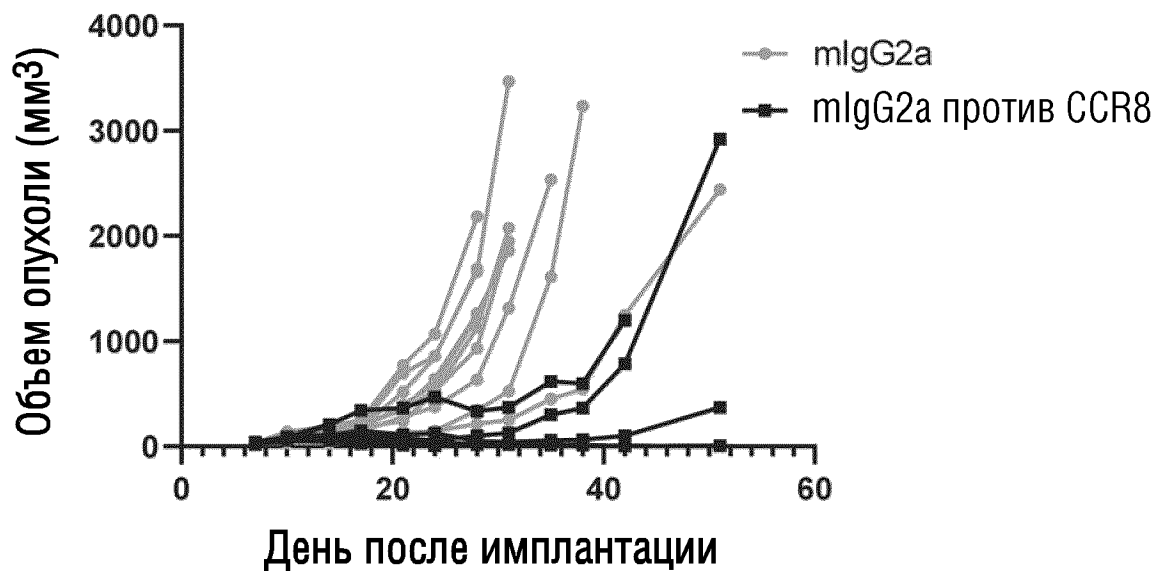


ФИГ.22F

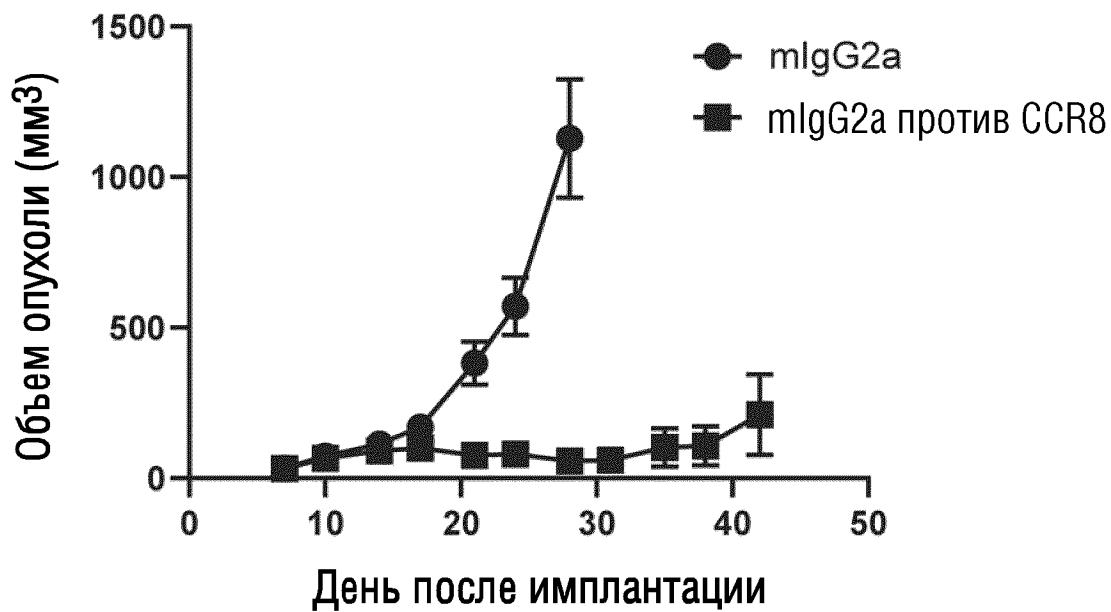




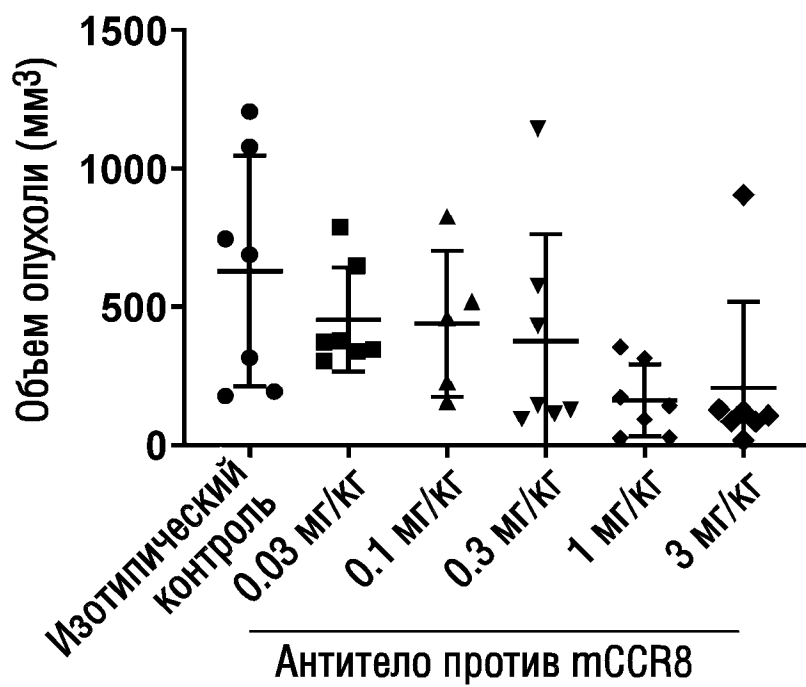
ФИГ.23А



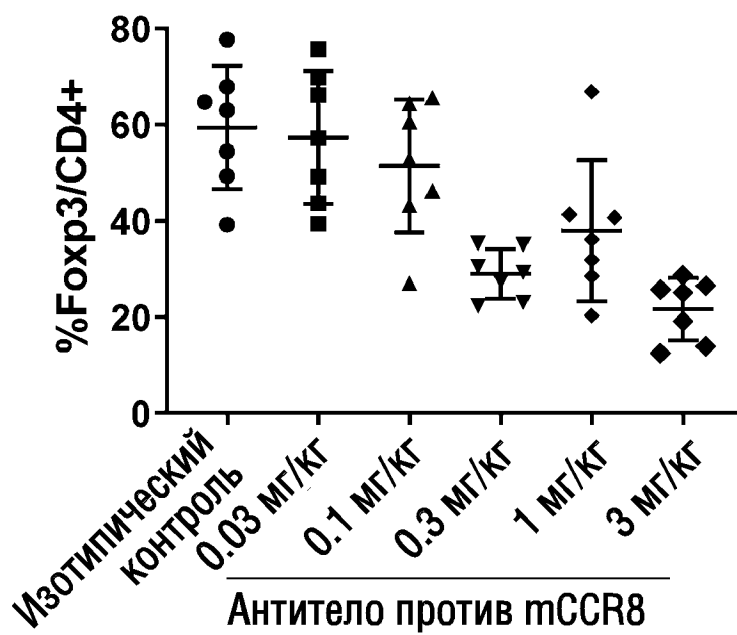
ФИГ.23В



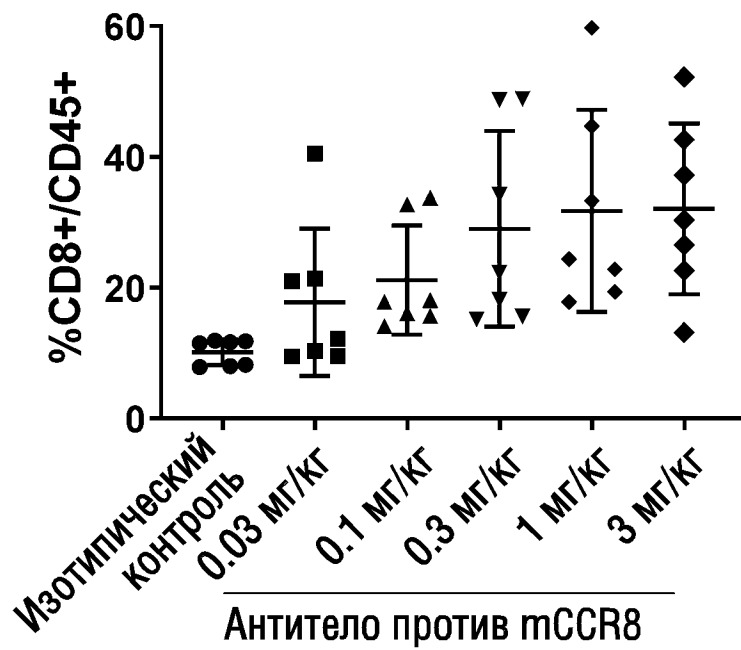
ФИГ.24А



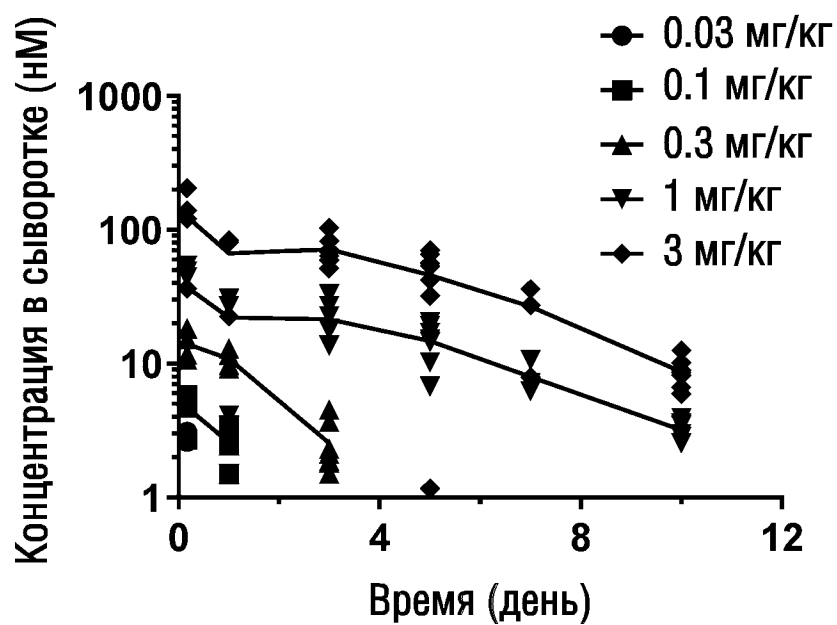
ФИГ.24В



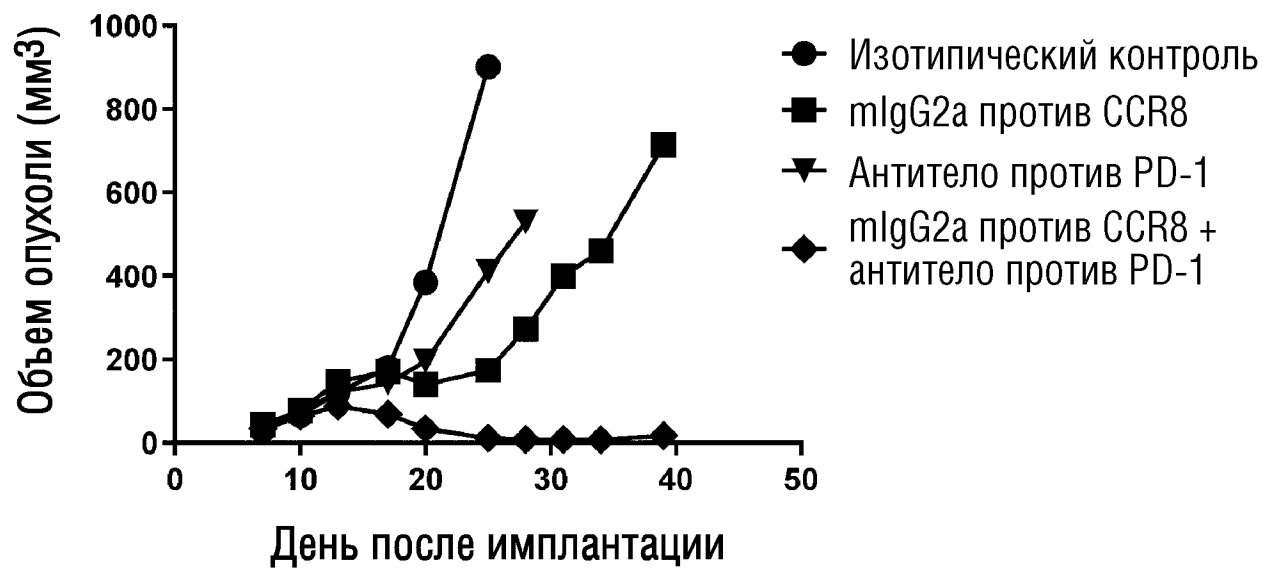
ФИГ.24С



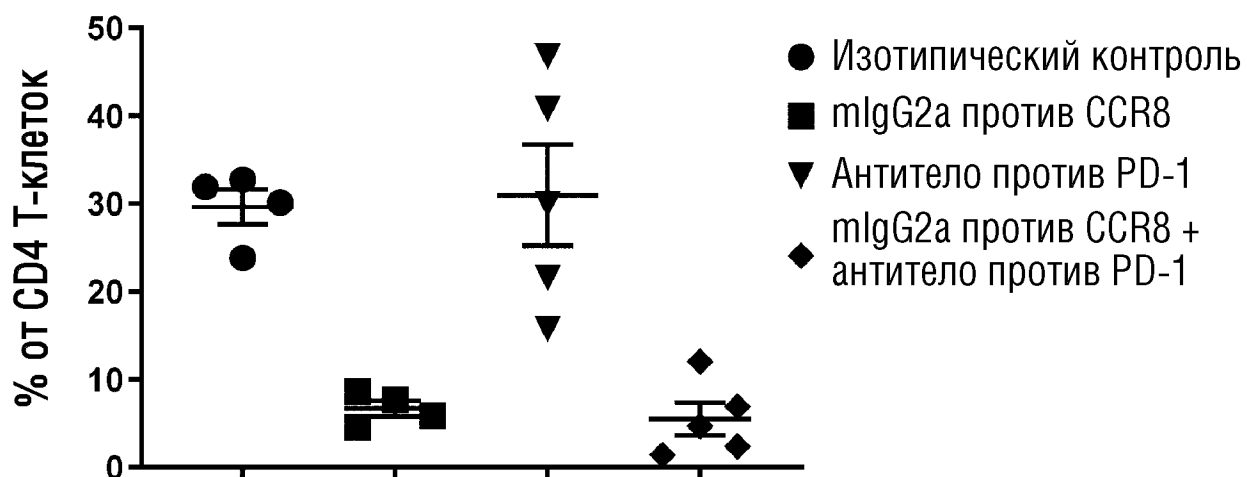
ФИГ.24D



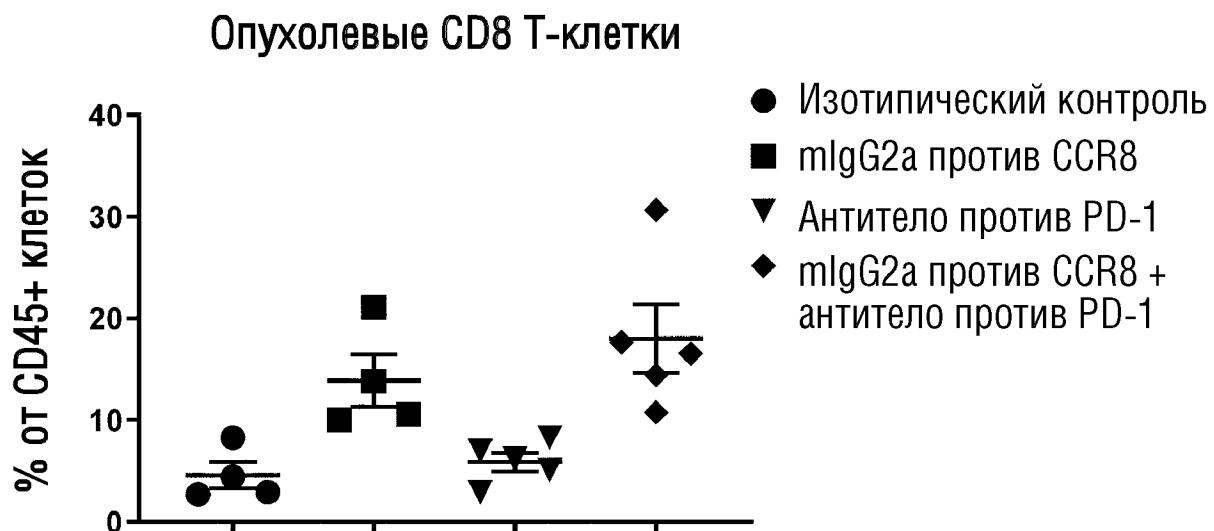
ФИГ.25А



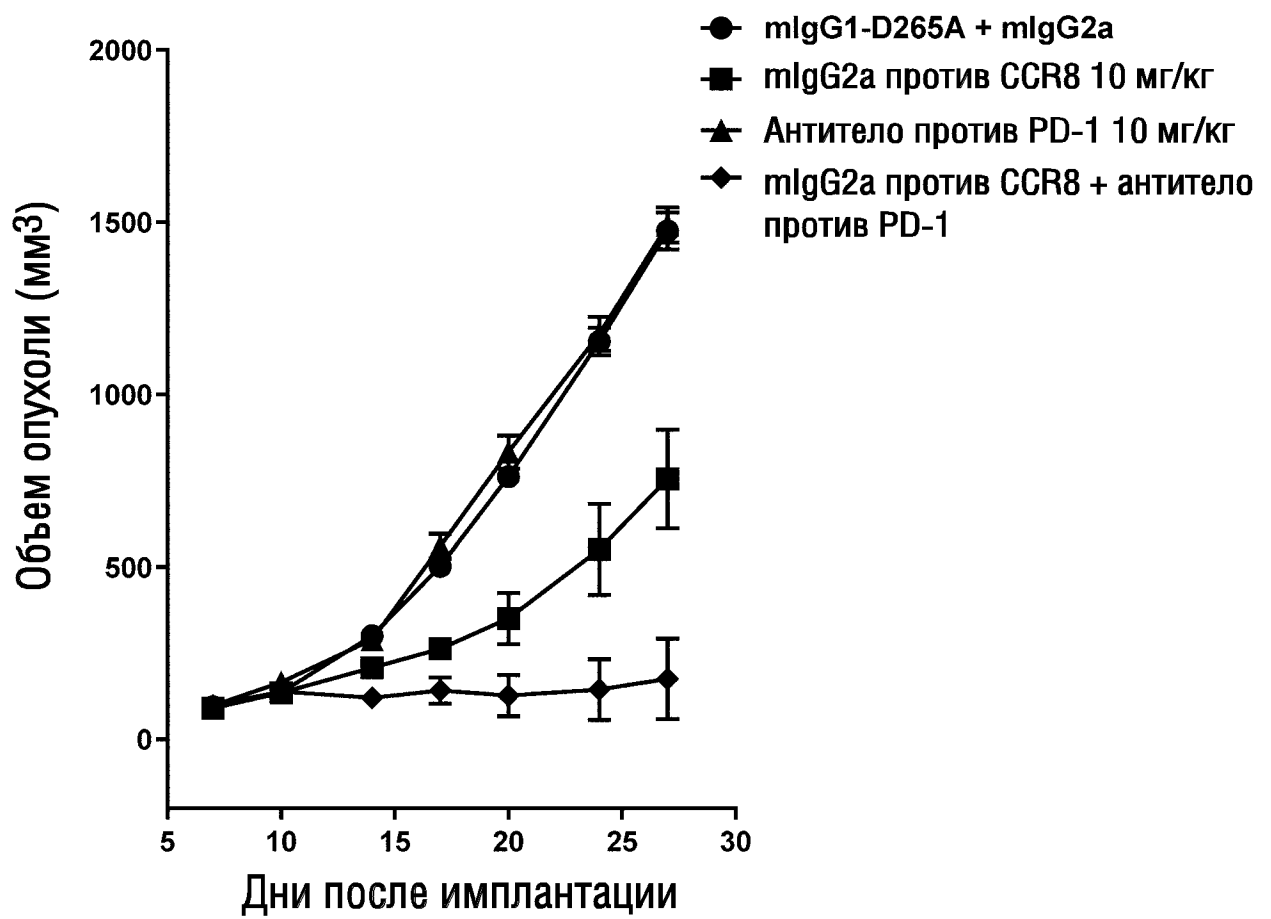
ФИГ.25В



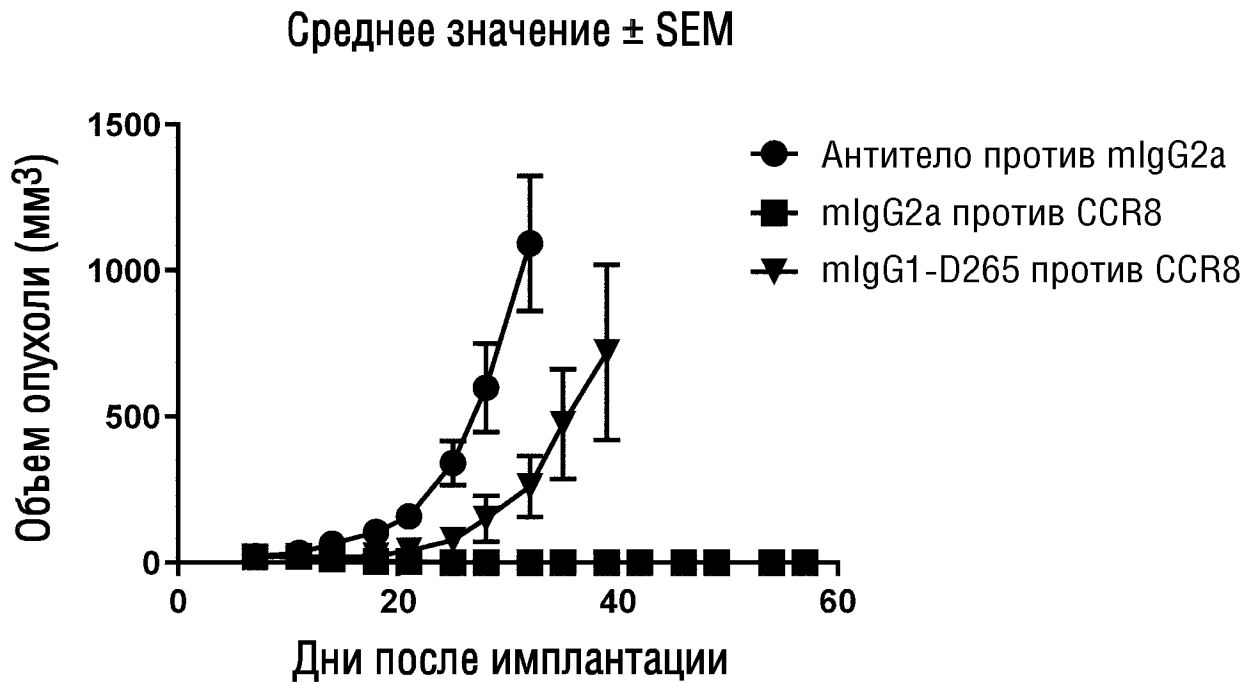
ФИГ.25С



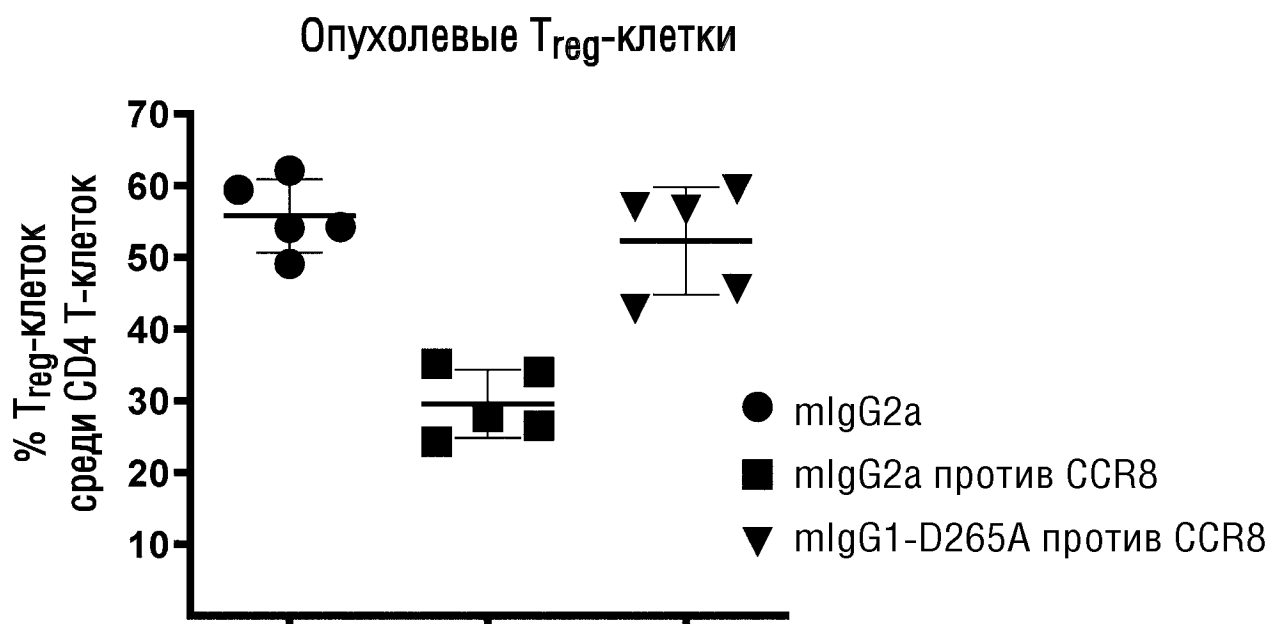
ФИГ.26



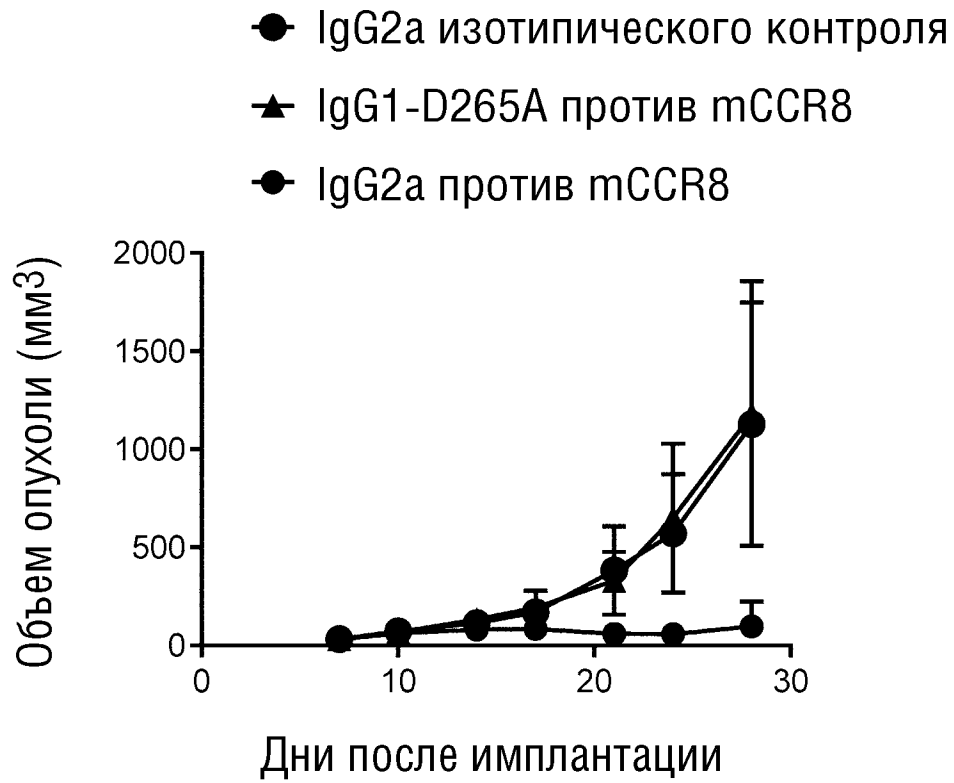
ФИГ.27А



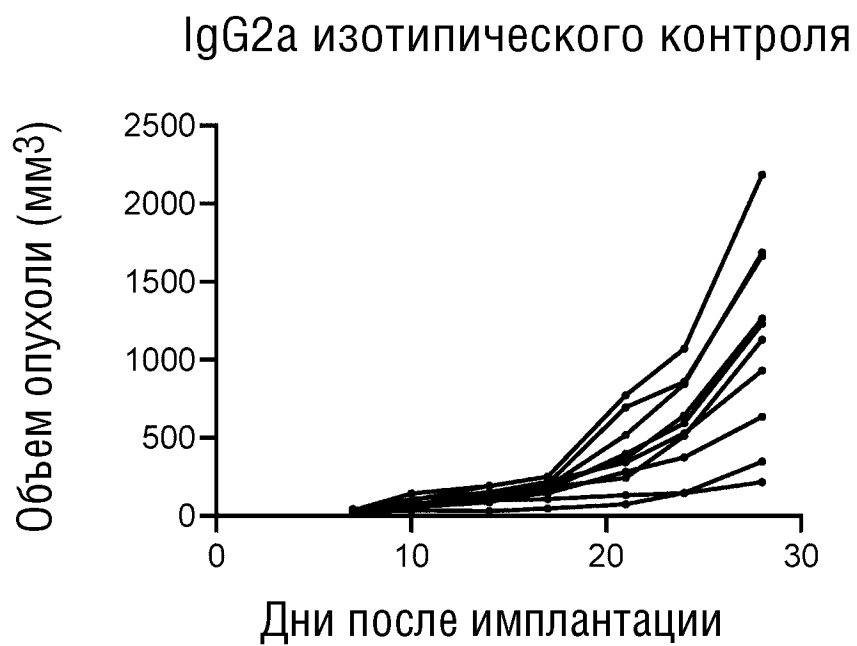
ФИГ.27В



ФИГ.28А



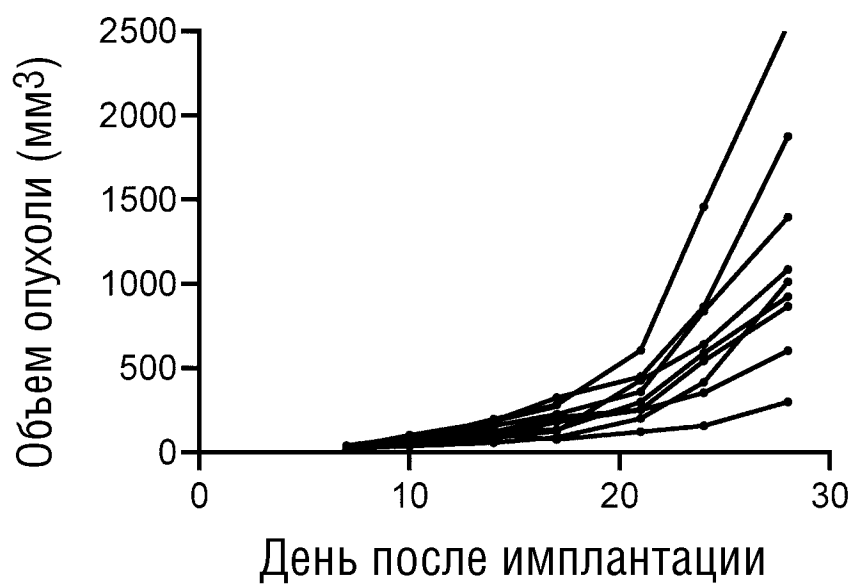
ФИГ.28В





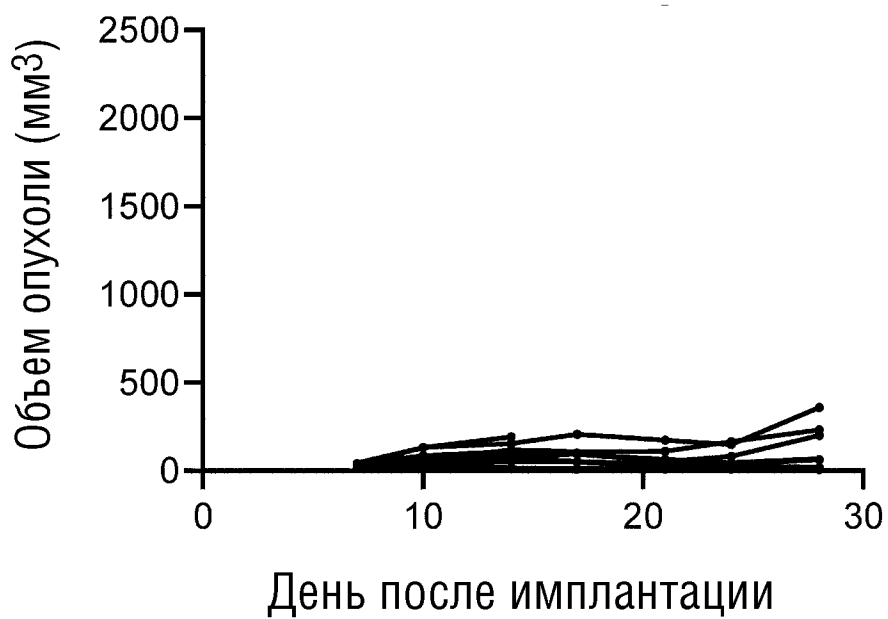
ФИГ.28С

IgG1-D265A против mCCR8

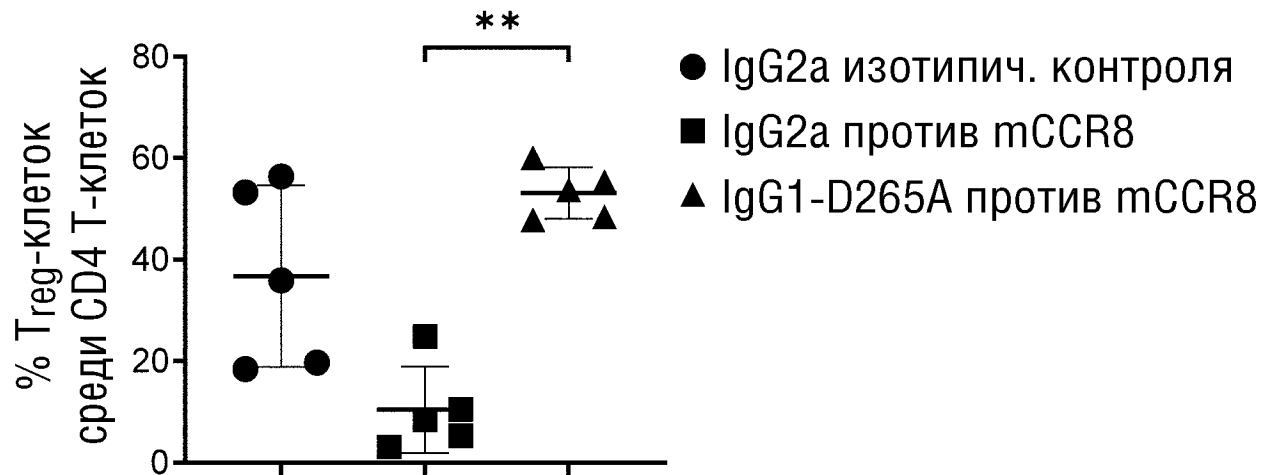


ФИГ.28D

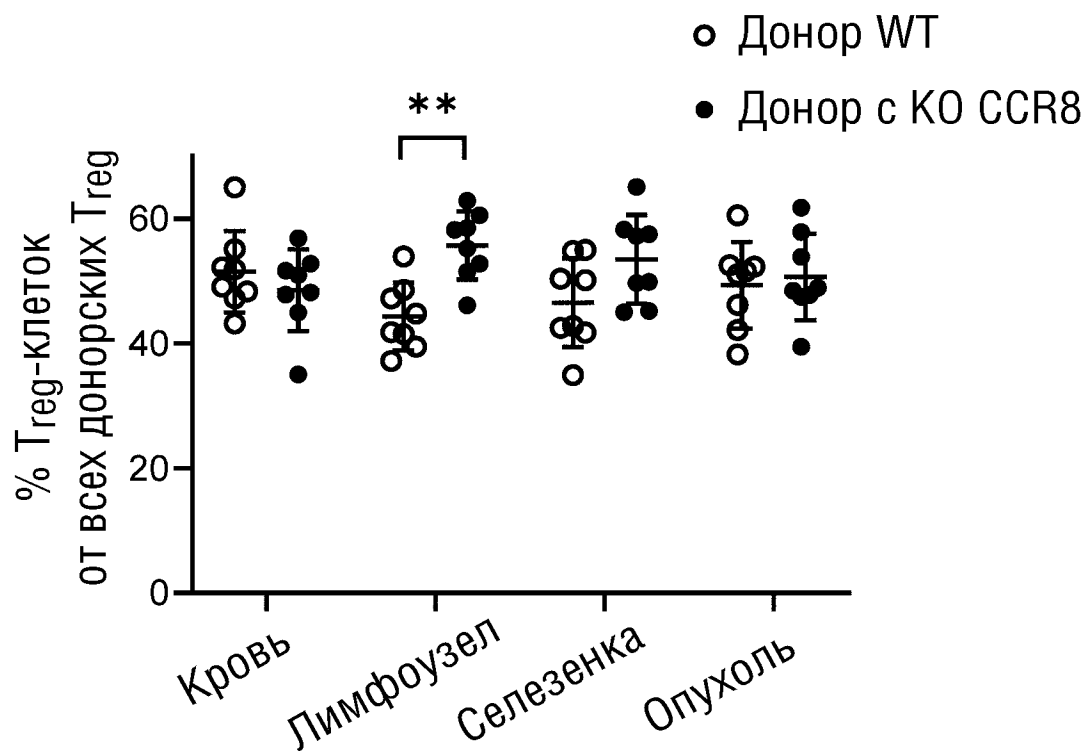
IgG2a против mCCR8



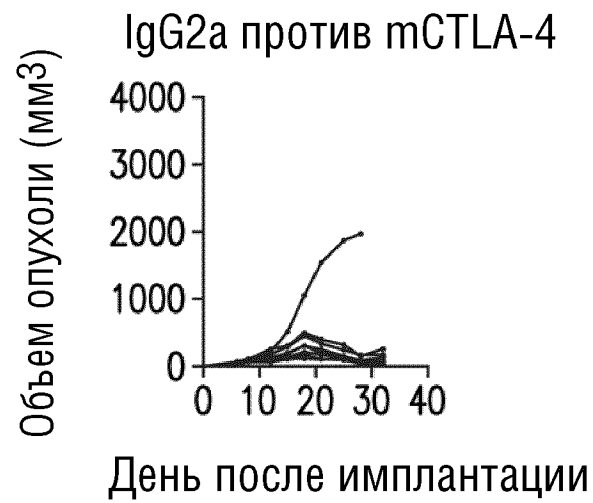
ФИГ.28Е



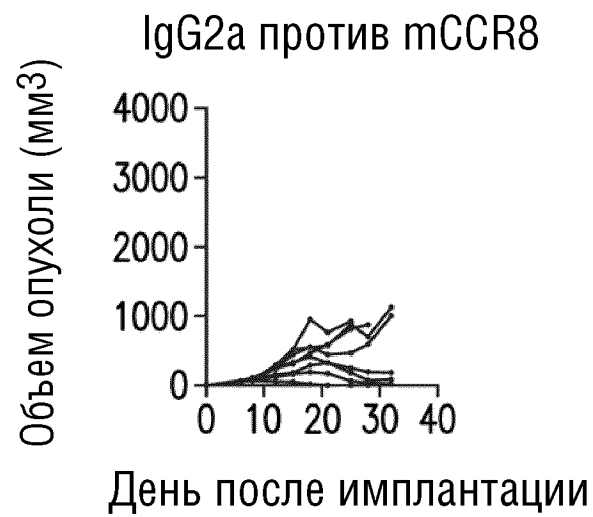
ФИГ.28F



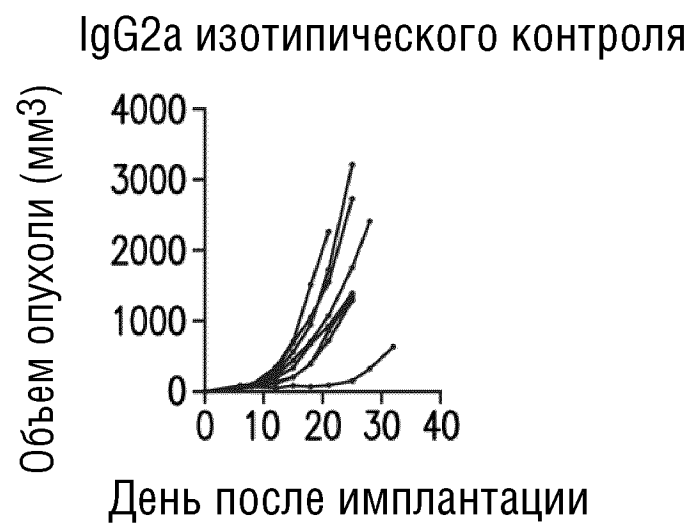
ФИГ.29А



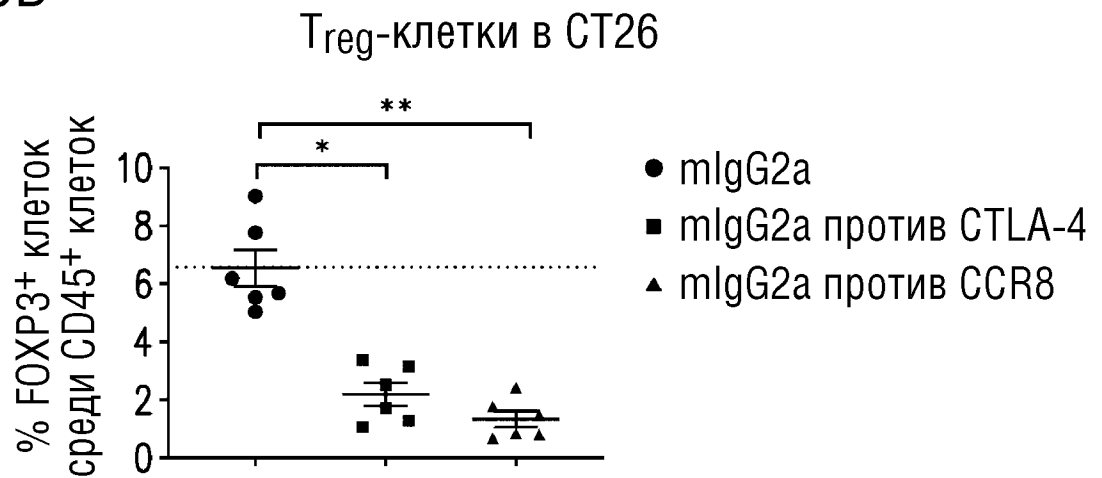
ФИГ.29В



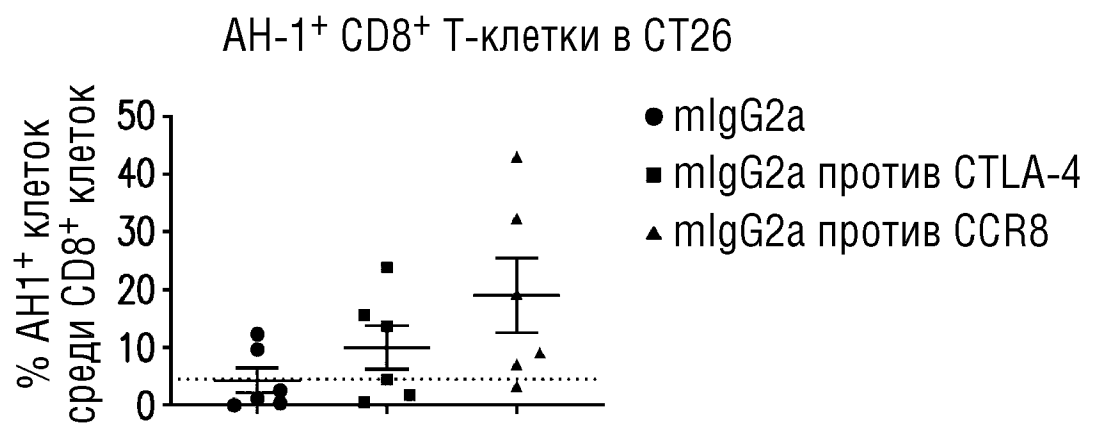
ФИГ.29С



ФИГ.29D



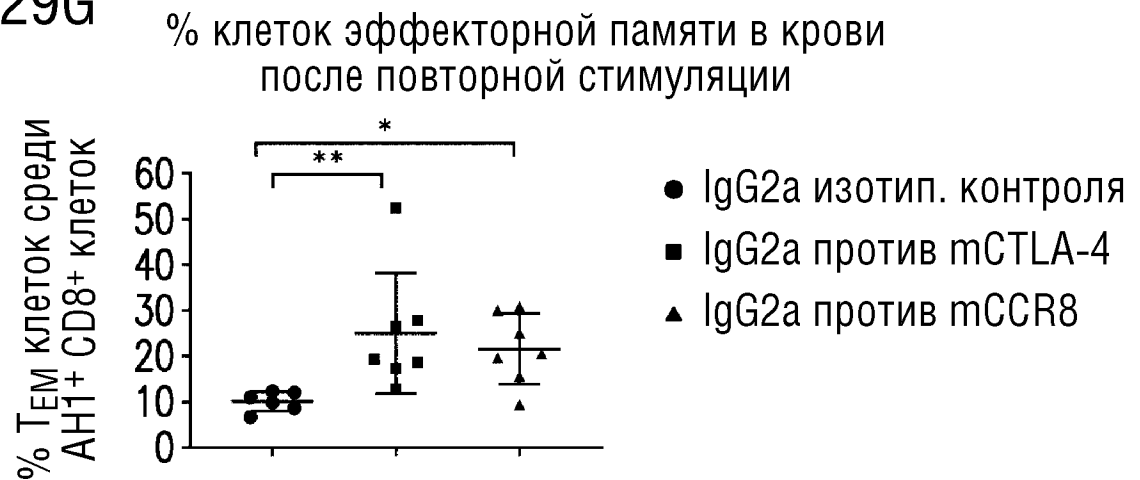
ФИГ.29E



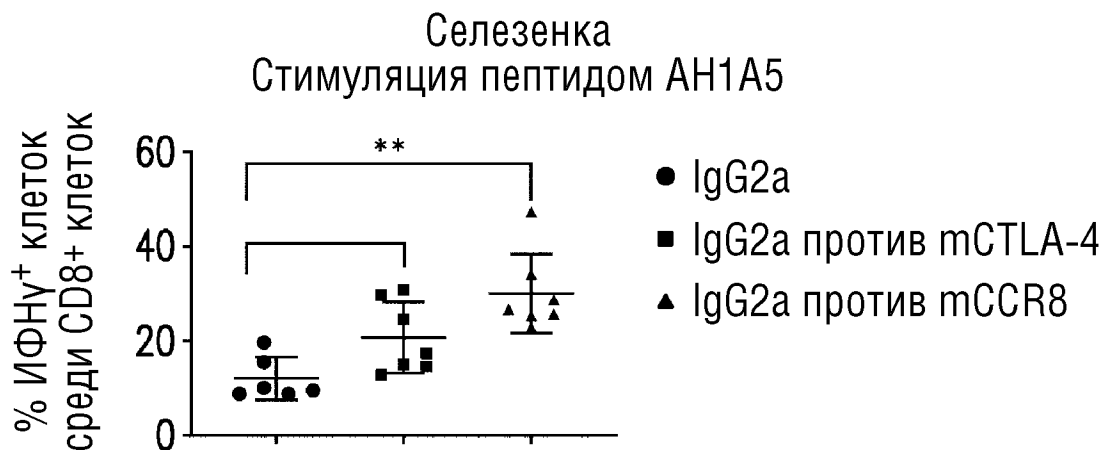
ФИГ.29F



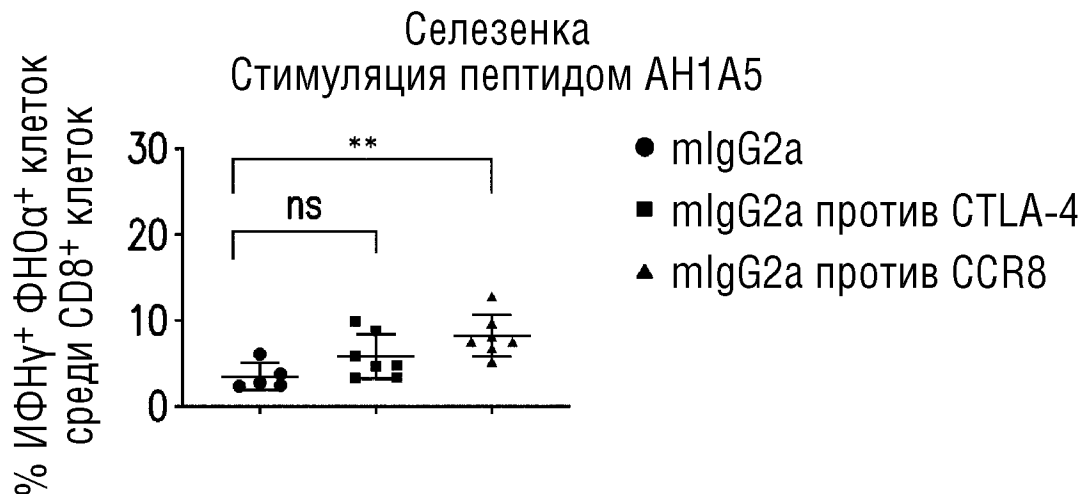
ФИГ.29G



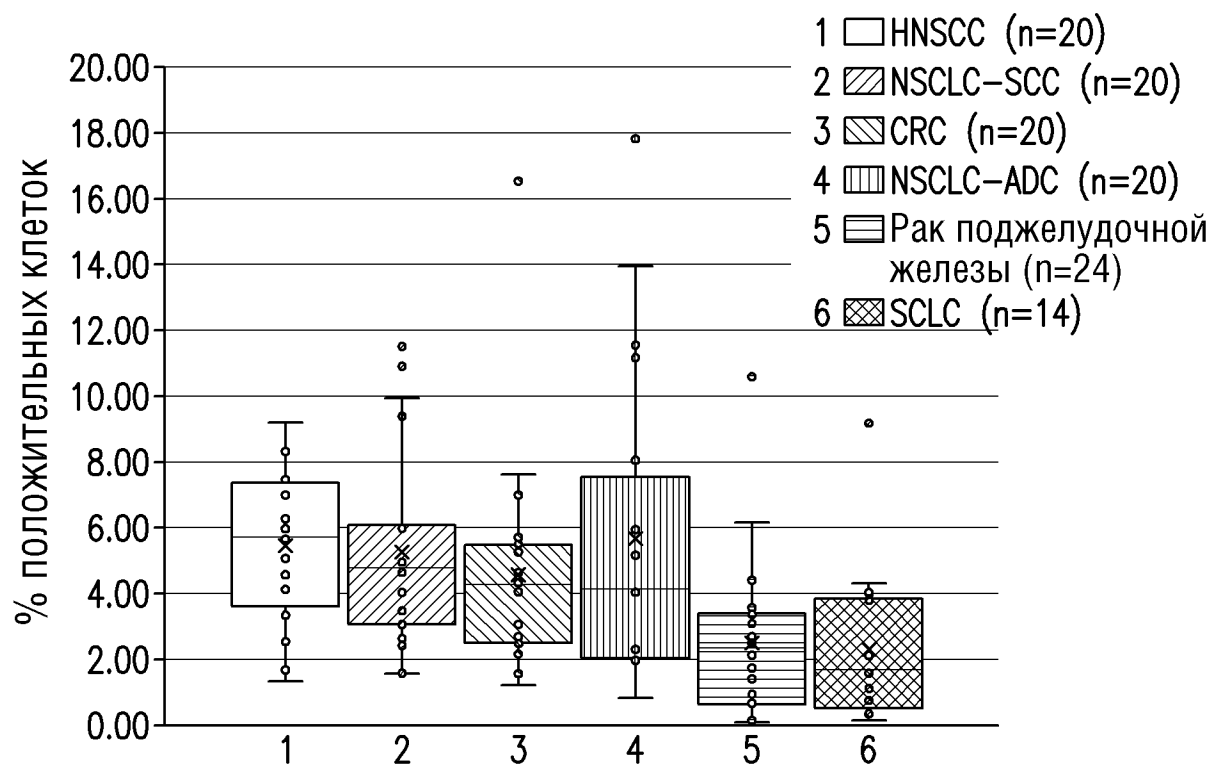
ФИГ.29H



ФИГ.29I



ФИГ.30А



ФИГ.30В

