

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044996**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.23**

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

**(21)** Номер заявки  
**202090061**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.06.18**

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD70, ARGX-110 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА**

---

**(31)** 1709677.7

**(32)** 2017.06.16

**(33)** GB

**(43)** 2020.04.13

**(86)** PCT/EP2018/066144

**(87)** WO 2018/229303 2018.12.20

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АРДЖЕНКС БВБА (ВЕ);**  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ БЕРН (СН)**

**(72)** Изобретатель:  
**Лепин Николая, Ван Ромпай Люк, Де**  
**Хард Ханс (ВЕ), Оксенбайн Адриан,**  
**Ритер Карстен (СН)**

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

**(56)** WO-A1-2012123586

DEMPKE WOLFRAM C. M. ET AL.:  
"Second- and third-generation drugs for immuno-  
oncology treatment-The more the better?",  
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, ELSEVIER,  
AMSTERDAM, NL, vol. 74, 10 February 2017  
(2017-02-10), pages 55-72, XP029933747, ISSN:  
0959-8049, DOI: 10.1016/J.EJCA.2017.01.001,  
paragraph [05.6]

J. JACOBS ET AL.: "CD70: An  
emerging target in cancer immunotherapy",  
PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS., vol.  
155, November 2015 (2015-11), pages 1-10,  
XP055289894, GB ISSN: 0163-7258, DOI: 10.1016/  
j.pharmthera.2015.07.007, See 4 "Targeting CD70"

---

**(57)** Изобретение относится к способам лечения острого миелоидного лейкоза (AML) или миелодиспластического синдрома (MDS) с применением антитела против CD70 (ARGX-110) индивидуально или вместе с гипометилирующим агентом.

---

**044996**  
**B1**

**044996**  
**B1**

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к способам лечения острого миелоидного лейкоза (AML) и миелодиспластического синдрома (MDS), а также к композициям и комбинациям, подходящим для использования в указанных способах.

### **Уровень техники**

Острый миелоидный лейкоз (AML) является гетерогенным заболеванием, характеризующимся неконтролируемой клональной экспансией гемопоэтических клеток-предшественников. AML является наиболее распространенным острым лейкозом, поражающим взрослых, с ежегодной заболеваемостью среди взрослых в Европе от 5 до 8 случаев на 100000 человек и резким увеличением популяции в возрасте старше 70 лет, где заболеваемость достигает 15-25/на 100000 в год.

Статистика выживания, опубликованная компанией Cancer Research UK для AML, диагностированного в Англии в период между 2008 и 2010 годами, для всех возрастов показывает, что приблизительно 20% пациентов выживают в течение 5 или более лет после постановки диагноза. Прогностические факторы неблагоприятного исхода включают возраст пациента, AML, индуцированный лечением, и миелодиспластический синдром в анамнезе или другое предшествующие гематологическое расстройство. Пятилетняя выживаемость среди людей в возрасте 65 лет и старше составляет приблизительно 5%.

Химиотерапия, либо как единственный агент или как комбинированное лечение, используется для лечения большинства типов лейкозов. При соответствующих условиях может также применяться химиотерапия в высоких дозах с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Приблизительно от 60% до 70% взрослых с AML получают статус полной ремиссии (CR) после соответствующей индукционной терапии, и можно ожидать, что около 45% тех, кто достигнет CR, выживут 3 или более лет и могут быть излечены (Американское онкологическое общество). Тем не менее, нежелательные явления химиотерапии могут наложить значительное бремя на пациента, и многим пациентам не подходит стандартная интенсивная химиотерапия. Поэтому желательны альтернативные методы лечения AML.

### **Сущность изобретения**

CD70 представляет собой антиген клеточной поверхности, который обычно экспрессируется в небольшом подмножестве активированных В- и Т-лимфоцитов, а также в зрелых дендритных клетках и участвует в дифференцировке лимфоцитов и передаче сигналов выживания при связывании с его родственным рецептором на клеточной поверхности, CD27. Индуцированная CD70 передача сигналов CD27 приводит к увеличению продукции и активации регуляторных Т-клеток, которые экспрессируют CD27.

CD70 экспрессируется на низком уровне или не экспрессируется в нормальных тканях, включая все жизненно важные органы. CD70 сверхэкспрессируется в нескольких типах опухолей, часто вместе с CD27 в гематологических злокачественных опухолях, предполагая его участие в пролиферации и выживание злокачественных клеток. CD70 также, по-видимому, играет роль в уклонении от иммунного надзора, индуцируя Treg, тем самым способствуя росту опухоли.

Считается, что ингибирование сигнального пути CD70-CD27 на регуляторных Т-клетках препятствует рекрутированию и/или активации регуляторных Т-клеток, тем самым потенциально восстанавливая иммунологический контроль пациента в микроокружении опухоли.

Настоящее изобретение впервые демонстрирует эффективное лечение AML и MDS у людей антителом против CD70. Лечение согласно изобретению эффективно даже после однократного введения антитела против CD70 и даже в неожиданно низкой дозе. Не только антитело против CD70, вводимое в качестве монотерапии, является удивительно эффективным, но в настоящем описании также продемонстрировано, что комбинированная терапия антитела против CD70 вместе с нуклеозидным метаболическим ингибитором (NMI) приводит к дополнительной эффективности. Используемая в настоящем описании комбинированная терапия согласно изобретению не требует одновременного введения двух или более активных агентов или того, чтобы два или более агентов были включены в одну композицию.

У пациентов с AML, получавших терапию, представленную в настоящем описании, частота ответа была выше чем 90%, причем у 2 из каждых 3 пациентов достигнута полная ремиссия. Эти результаты представляют собой значительный прогресс в лечении AML для всех пациентов.

Как показано в прилагаемых примерах, лечение согласно изобретению значительно снижает процент бластов костного мозга у пациента. Как уже отмечалось, лечение согласно изобретению значительно уменьшало количество бластов до такой степени, что у пациентов наступала полная ремиссия. Кроме того, существенное снижение процента бластов костного мозга у пациента важно, если пациент рассчитывает на успешную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), терапию, которая может привести к излечению. Важно отметить, что лечение согласно изобретению привело к прогрессированию пациента для трансплантации.

Примечательно, что лечение согласно изобретению эффективно лечит AML без какой-либо наблюдаемой повышенной токсичности по сравнению с той, о которой сообщалось при обычном лечении NMI.

Это важно для всех пациентов с AML. Стандартная интенсивная химиотерапия для AML сопровождается значительной токсичностью, и многие пациенты испытывают серьезные побочные эффекты. Ограниченная токсичность, связанная с эффективным лечением в соответствии с настоящим изобретением, демонстрирует потенциал описанных в настоящем документе способов лечения для обеспечения

улучшенного лечения AML для всех пациентов.

Удивительная эффективность лечения в соответствии с изобретением имеет дальнейшее значение с учетом особенностей пациентов, вовлеченных в исследование. Подвергаемым лечению пациентам не подходила стандартная химиотерапия, потому что они не были достаточно приспособлены, чтобы переносить токсичность, связанную с обычной интенсивной химиотерапией.

Поскольку считается, что стандартная интенсивная химиотерапия необходима для достаточного уменьшения количества бластов в костном мозге, HSCT в настоящее время недоступна для этих пациентов. Однако, как показано в настоящем документе, монотерапия и комбинированная терапия согласно настоящему изобретению значительно снижают бласты AML у пациентов, которые не могут получить стандартную интенсивную химиотерапию. Соответственно, методы лечения, предлагаемые в соответствии с изобретением, открывают перспективу успешной HSCT в популяции пациентов, для которых HSCT ранее не рекомендовали. Еще одним значительным преимуществом того факта, что антитела против CD70 могут эффективно лечить AML как в качестве монотерапии, так и в качестве мощной комбинированной терапии с нуклеозидным метаболическим ингибитором, является то, что они позволяют использовать целый ряд моделей лечения. Например, комбинированная терапия с нуклеозидным метаболическим ингибитором (NMI) обеспечивает мощную терапию, возникающую из-за эффектов антител CD70, усиливающихся за счет положительной регуляции CD70 на бластах в ответ на NMI (in vitro и in vivo (фиг. 1)). Это обеспечивает эффективную терапию с пониженной токсичностью по сравнению со стандартной интенсивной химиотерапией, что особенно важно для пациентов, которые недостаточно здоровы, чтобы переносить стандартную интенсивную химиотерапию. Монотерапия антителами против CD70 обеспечивает эффективное лечение без необходимости даже в NMI. Это дополнительно снижает токсичность, избегая влияния NMI на небластные клетки, что может привести к снижению риска развития цитопении у пациента. Снижая риск возникновения цитопении, пациент менее подвержен риску заражения и требует меньше переливаний крови.

Другой моделью лечения, доступной по настоящему изобретению, является "индукционная" и "поддерживающая" модель. Таким образом, индукционное лечение с использованием комбинации антител против CD70 вместе с нуклеозидным метаболическим ингибитором (с необязательной нагрузочной дозой антитела против CD70) может быть использовано для мощного снижения процента бластов AML в костном мозге. Затем пациент может перейти на поддерживающее лечение антителами против CD70 индивидуально или в комбинации с более низкими дозами NMI. Преимущество этой модели состоит в том, что уменьшение бластов может поддерживаться без необходимости подвергать пациента потенциальной накопленной токсичности при длительном введении нуклеозидного метаболического ингибитора.

Более того, такое поддерживающее лечение индивидуально антителом против CD70 специфически подавляет бластные клетки (которые экспрессируют CD70) с минимальным воздействием на другие типы клеток (которые имеют минимальный уровень CD70 или не экспрессируют его). Поскольку введение нуклеозидного метаболического ингибитора может быть прекращено или уменьшено, цитотоксическое давление на небластные типы клеток снижается, что позволяет этим клеткам пролиферировать. Преимущество этого заключается в снижении риска цитопении, возникающей в результате длительного лечения NMI, поскольку клетки других типов (например, тромбоциты, эритроциты, нейтрофилы) могут восстанавливаться, в то время как на бласты AML нацеливается антитело против CD70.

Кроме того, в настоящем описании продемонстрировано, что введение антитела против CD70, индивидуально или в комбинации с NMI, способствует дифференцировке LSC в миелоидные клетки. Стимулирование такой дифференцировки снижает популяцию LSC, способных к самообновлению. LSC вносят значительный вклад в распространение и поддержание заболевания, обеспечивая самообновление пула злокачественных клеток. Таким образом, индуцируя дифференцировку LSC, введение антитела против CD70, индивидуально или в комбинации с NMI, уменьшает популяцию LSC, тем самым увеличивая вероятность ремиссии и снижая риск рецидива.

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к способу лечения острого миелоидного лейкоза (AML) или миелодиспластического синдрома (MDS) у пациента, включающему: введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте предложен способ уменьшения процента бластов в костном мозге и/или периферической крови пациента с AML или MDS, причем способ включает введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте предложен способ подготовки пациента с AML или MDS для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), включающий введение пациенту одной или более терапевтически эффективных доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителу против CD70 или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в способе лечения острого миелоидного лейкоза (AML) или миелодиспластического синдрома (MDS) у пациента, включающем введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителу против CD70 или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в способе уменьшения количества бластных клеток AML у пациен-

та, причем способ включает введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителу против CD70 для применения в способе подготовки пациента с AML или MDS для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), включающем введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в способе лечения острого миелоидного лейкоза (AML) или миелодиспластического синдрома (MDS) у пациента, включающем введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента, причем фармацевтическая композиция содержит антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

В дополнительном аспекте предложена фармацевтическая композиция для применения в способе уменьшения бластных клеток AML у пациента, причем способ включает введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте предложена фармацевтическая композиция для применения в способе подготовки пациента с AML или MDS для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), включающая введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте предложено антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении AML, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с гипометилирующим агентом, предпочтительно азациитидином.

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 0,1 до 25 мг/кг на дозу, необязательно в дозе в диапазоне от 1 до 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления всех аспектов способов по изобретению способ дополнительно включает введение нуклеозидного метаболического ингибитора (NMI), например гипометилирующего агента (HMA). В некоторых вариантах осуществления NMI представляет собой азациитидин или децитабин.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению включают: (i) первую стадию, включающую введение антитела против CD70 и нуклеозидного метаболического ингибитора в качестве комбинированной терапии в соответствии со схемами дозирования, описанными в настоящем документе, и (ii) вторую стадию, включающую введение антитела против CD70 в соответствии со схемами дозирования, описанными в настоящем документе, и введение более низкой дозы нуклеозидного метаболического ингибитора, чем доза нуклеозидного метаболического ингибитора, вводимая на первой стадии.

В некоторых вариантах осуществления пациенту не подходит стандартная интенсивная химиотерапия до лечения согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают проведение трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет 60 лет или старше, необязательно 75 лет или старше.

В некоторых вариантах осуществления изобретение дополнительно включает введение одного или более из активных агентов, выбранных из антитела против CD33, антитела против CD123, ингибитора E-селектина, ингибитора FLT3, ингибитора циклин-зависимой киназы, ингибитора BCL-2, ингибитора аминопептидазы и ингибитора JAK/STAT как часть комбинированной терапии.

В дополнительном аспекте изобретение относится к комбинации, содержащей антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и NMI. В некоторых вариантах осуществления NMI представляет собой гипометилирующий агент. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления гипометилирующий агент представляет собой азациитидин или децитабин, предпочтительно азациитидин.

В дополнительном аспекте изобретение относится к комбинации, содержащей антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и NMI, для применения в способе лечения AML или MDS. В некоторых вариантах осуществления NMI представляет собой гипометилирующий агент. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления гипометилирующий агент представляет собой азациитидин или децитабин, предпочтительно азациитидин.

В дополнительном аспекте изобретение относится к комбинации, содержащей антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и NMI, для применения в способе согласно изобретению.

Во всех аспектах изобретения антитело против CD70 может ингибировать взаимодействие CD70 с его рецептором CD27. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсва-

звующий фрагмент могут ингибировать связывание CD70-CD27. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент могут ингибировать передачу сигналов, индуцированную CD70-CD27.

Во всех аспектах изобретения антитело против CD70 может обладать эффекторной функцией антитела, например антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) и/или антителозависимым клеточным фагоцитозом (ADCP). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент могут истощать экспрессирующие CD70 клетки, например, через эффекторную функцию антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 может представлять собой модифицированное антитело, например конъюгат лекарственное средство-антитело (ADC). Как описано в настоящем документе в другом месте, ADC представляют собой антитела, конъюгированные с активным агентом, таким как цитотоксический агент. ADC могут также обладать одной или более эффекторными функциями антитела в дополнение к доставке активного агента к мишени.

В некоторых вариантах осуществления всех аспектов изобретения антитело против CD70 содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат CDR:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (DAGYSNHHVPIFDS) HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (DINNEGTTYYADSVKG) HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1 (VYYMN) LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ALFISNPSVE) LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (NTNTRHS), и LCDR1, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 5 (GLKSGSVTSDNFPT). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 4 и/или содержат домен VL, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 8. Для вариантов осуществления, в которых домены антител или антигенсвязывающих фрагментов определяются по определенному проценту идентичности последовательности с эталонной последовательностью, домены VH и/или VL могут сохранять последовательности CDR, идентичные тем, которые присутствуют в эталонной последовательности, так что присутствует вариация только в каркасных областях.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 представляет собой антитело IgG1.

Во всех аспектах изобретения антитело против CD70 предпочтительно представляет собой ARGX-110.

Во всех аспектах изобретения предпочтительным вариантом осуществления является комбинация ARGX-110 и азацитидина.

Во всех аспектах изобретения пациентом является человек.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1:  $\alpha$ CD70/децитабин комбинированная терапия уничтожает человеческие CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML стволовые клетки/клетки-предшественники в мышинных ксенотрансплантатах. (a-i)  $5 \times 10^6$  очищенных FACS клеток CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>lo</sup> из BM вновь диагностированных пациентов с AML (пациент P10 и P21) инъецировали внутривенно в хвостовую вену мышей NSG, облученных сублетально. После приживления (день 32 (P10) и день 97 (P25) после трансплантации) мышей рандомизировали и подвергали обработке контрольным mAb и 10 мг/кг  $\alpha$ CD70 mAb (41D12-D) внутривенно (всего 3 инъекции) или децитабином и (1,5 мг/кг/день) в течение пяти дней подряд индивидуально или в комбинации. Через один день после последней обработки животных умерщвляли и анализировали кровь, селезенку и BM. (a) Экспериментальная установка. (b) экспрессия CD70 на стволовых клетках/клетках-предшественниках CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML. Изотип изображен серым цветом; окрашивание CD70 в черный (P10) и синий (P25). Сплошные линии представляют носитель и пунктирные линии - лечение децитабином на стволовых клетках/клетках-предшественниках AML.  $\Delta$ MFI: окрашивание MFI - изотип MFI (c) кратное изменение экспрессии CD70 на не-CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> суммарных и CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>стволовых клетках/клетках-предшественниках AML (Veh против D). (d) Типичные графики FACS приживления клеток CD45<sup>+</sup> AML человека в BM мышей PDX. (e) Частота клеток CD45<sup>+</sup> AML человека в BM мышей PDX AML. (f) Абсолютное количество CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>lo</sup>lin<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> стволовых клеток/клеток-предшественников AML в BM. (g) Репрезентативные графики FACS и (h) количественная оценка, указывающая частоту CD38<sup>-</sup> клеток AML в популяции CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>lo</sup>lin<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> AML стволовых/клеток-предшественников, (i) Частота клеток CD45RA<sup>+</sup> в популяции CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>lo</sup>lin<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML стволовых клеток/клеток-предшественников. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD Статистика: (b, c) t-критерий Стьюдента; (e, f, h, i) однофакторный ANOVA; Пост-тест Тьюки; P<0,05; \*\*, P<3,01; \*\*\*, P<0,001.

Фиг. 2: Обработка НМА индуцирует экспрессию CD70 в первичных стволовых клетках/клетках-предшественниках AML. (a) Репрезентативные графики FACS экспрессии CD70 на стволовых/клетках-предшественниках lin<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML после культивирования в присутствии или в отсутствие 0,5 mM децитабина (D) или носителя (Veh). Изотип: серый; CD70: черный. (b) жизнеспособность клеток,

(с) кратное изменение  $\Delta$ MFI CD70 и (d) экспрессия мРНК CD70 (AML: n=9-15; здоровые: n=3). (е) Репрезентативный график FACS и (f) кратное изменение MFI CD70 на стволовых клетках/клетках-предшественниках периферической крови пациентов с AML при диагностике и после 1 цикла лечения децитабином или азациитидином (D (5), 20 мг/кг, ежедневно для 5 дней; A (7), 75 мг/м<sup>2</sup>, ежедневно в течение 7 дней).

Фиг. 3: Совместная обработка  $\alpha$ -CD70/децитабином снижает способность к повторному посеву стволовых клеток-предшественников CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML человека, (ab) FACS-очищенные lin<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> стволовые клетки/клетки-предшественники из BM недавно диагностированных пациентов с AML (P6, P8, P11) культивировали в течение ночи в трех экземплярах в присутствии или в отсутствие 10 мг/мл анти-CD70 (CD70) mAb или 0,5 мМ децитабина индивидуально или в комбинации с последующим посевом в метилцеллюлозу, содержащую  $\alpha$ CD70 и децитабин или их оба. Колонии и клетки подсчитывали через 14 дней, (а) Колонии на  $1 \times 10^3$  посеянных клеток. (b) Клетки на колонию, (с) Эксперименты по серийному повторному посеву, (df) FACS-очищенные стволовые клетки/клетки-предшественники lin<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> из BM "здоровых" доноров культивировали и высевали в метилцеллюлозу, как описано в (ас), (d) Колонии на  $1 \times 10^3$  клеток покрытия, (d) Клетки на колонию, (f) Эксперименты серийного повторного посева. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SD Статистика: однофакторный-ANOVA. Пост-тест Даннетта (против aCD70/D); \*, P<0,05; \*\*, P<0,01; \*\*\*, P<0,001.

Фиг. 4: Схематическое изображение схемы лечения пациентов, включенных в открытое исследование с повышением дозы, с подтверждением концептуальной когорты ARGX-110 в комбинации с AZA.

Фиг. 5(a): Окончание лечения (ЕОТ): дата ЕОТ является последней датой, в которую вводят ARGX-110. Визит планируется в течение 7 дней после ЕОТ. (b) Временные интервалы следующие: - в момент времени до введения дозы: до 4 ч до инфузии ARGX-110 (день-14 и день 17 в каждом цикле) или введения AZA (дни 1, 3 и 7) - в 0 ч (в конце инфузии ARGX-110)  $\pm$ 30 мин и в 2 ч (после окончания инфузии ARGX-110):  $\pm$ 30 мин - в 24 ч:  $\pm$ 4 ч - в момент времени после введения дозы (день X): в течение 2 ч после окончания инфузии ARGX-110; (с) за 4 часа до инфузии ARGX-110 в день-14 и в день 3 и день 17 в циклах 1-4 и в цикле 8 (если применимо), а также в ЕОТ и последующих визитах; (d) Образец молекулярной генетики может быть использован для характеристики метилирования промоторов CD70 и CD11a и для анализа геномной ДНК эффекта лечения на заболевание и патологию-мишень. Начиная с цикла  $\geq$ 3, отбор проб следует проводить перед введением AZA в каждом нечетном цикле в день 1 (т.е. C3D1, C5D1,...) до полной ремиссии (CR, CRi); (е) Образец генной экспрессии будет использоваться для характеристики уровней мРНК CD70, маркеров болезни и лекарственного эффекта. Начиная с цикла  $\geq$ 3, отбор проб следует проводить перед введением AZA в каждом нечетном цикле в день 1 (т.е. C3D1, C5D1,...) до полной ремиссии (CR, CRi); (f) Образец проточной цитометрии (FACS) может использоваться для дополнительной характеристики минимального анализа остаточных заболеваний, экспрессии CD70 и CD27 и действия лекарственного средства (например, бласт, NK и Т-клетки). Начиная с цикла  $\geq$ 3, отбор проб следует проводить перед введением AZA в каждом нечетном цикле в день 1 (т.е. C3D1, C5D1,...) до полной ремиссии (CR, CRi); (g) Образец сыворотки может быть использован для дополнительной характеристики sCD27, маркеров болезни и лекарственного эффекта, анализа воспалительных цитокинов. Начиная с цикла  $\geq$ 3, отбор проб следует проводить перед введением AZA в каждом нечетном цикле в день 1 (т.е. C3D1, C5D1,...) до полной ремиссии (CR, CRi); (h) Определение стволовости будет проводиться на мононуклеарных клетках, очищенных из крови или костного мозга. В зависимости от количества собранных клеток, считывание данных может включать окрашивание Numb (определить соотношение асимметричного/симметричного деления), клеточные и in vivo исследования (оценить потенциал стволовых клеток, например, с помощью анализа колонии с CFU метилцеллюлозой или исследования выживания мышей NSG, которым инъецировали мононуклеарные клетки пациента); (i) Сроки отбора проб биопсии аспиратов для оценки реакции комбинированного лечения должны проводиться при каждом нечетном цикле в 1-й день (т.е. C3D1, C5D1,...) до полной ремиссии (CR, CRi) и в ЕОТ, если клинически не противопоказано. Для пациентов, достигших CR<sub>M RD</sub>-, дополнительная аспирация/биопсия BM будет собрана не ранее, чем через 4 недели после CR<sub>M RD</sub>-, чтобы подтвердить ответ. Дополнительные образцы аспирата/биопсии могут быть взяты, как указано лечащим врачом, и будут рассматриваться как связанные с исследованием образцы; (j) Если получены доказательства уменьшения воздействия ARGX-110 на сыворотку и/или увеличения ADA при длительном лечении, могут быть получены дополнительные образцы PK и/или ADA; (k) образец костного мозга, который необходимо взять, если это не противопоказано с медицинской точки зрения; (l) Образец супернатанта костного мозга можно использовать для оценки концентрации sCD27 и влияния лечения на заболевание и патологию-мишень.

Фиг. 6: Бластную нагрузку костного мозга (BM) оценивали с помощью цитоморфологии (A.) и проточной цитометрии с использованием связанного с лейкозом иммунофенотипа (LAIP), гейтинга (B.) и бласт-гейтинга (SSClow CD45dim; C). Последний метод был использован для определения измеримого/минимального остаточного заболевания (MRD) статуса пациента.

Фиг. 7: Бластную нагрузку периферической крови (PB) оценивали с помощью цитоморфологии (A.) и проточной цитометрии с использованием связанного с лейкозом иммунофенотипа (LAIP), гейтинга (B.)

и бласт-гейтинга (SSC<sup>low</sup> CD45 dim; C). Последний метод был использован для определения измеримого/минимального остаточного заболевания (MRD) статуса пациента.

Фиг. 8: Очищенные бласты AML (FACS гейтинг: CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>low</sup>AV<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>) фиксировали, пермеабилizовали и клетки инкубировали в течение ночи с антителом  $\alpha$ -Numb с последующим окрашиванием флуоресцентно меченным вторичным антителом. DAPI использовали для контрастного окрашивания ДНК. Образцы собирали на проточном цитометре ImageStreamX<sup>®</sup> Mark II (Amnis/EMD Millipore) и анализировали с использованием программ INSPIRE<sup>™</sup> и IDEAS<sup>®</sup> (Amnis/EMD Millipore). Суммарную экспрессию Numb (Средняя интенсивность флуоресценции) определяли через препарат для образцов костного мозга одного пациента, собранных на исходном уровне ("скрининг"), после монотерапии ARGX-110 (C1D1) и после комбинированного лечения (C4D1). В. Симметрично (SD) и асимметрично делящиеся (AD) клетки оценивали для образца пациента с костным мозгом в начале исследования ("до") и после монотерапии ARGX-110 (после aCD70).

Фиг. 9: Обработка  $\alpha$ CD70 mAb уменьшает CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> AML частоту встречаемости стволовых клеток/клеток-предшественников у пациентов с AML. (а) Формирование колонии P2. 10<sup>4</sup> BM MNC пациента P002 при диагностике (SCR) и через 14 дней после введения ARGX110 (1 мг/кг внутривенно, момент времени 0 или C1D1) высевали в метилцеллюлозу, и образование колоний оценивали через 2 недели. (b) кратное изменение формирования колоний у разных пациентов, получавших указанные дозы ARGX110. (c) Образование колоний при лимитированном разведении из P2. (d) Частоты встречаемости стволовых клеток в SCR и момент времени 0, определенные в экспериментах с усиленным лимитированным разведением для P2 и разных пациентов, получавших указанные дозы ARGX110. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD Статистика: (a, b, e) t-критерий Стьюдента; (г):  $\chi^2$  теста; \*\*, P<0,01; \*\*\*, P<0,001. (f) Формирование колоний P2. 10<sup>4</sup>, 5 $\pm$ 10<sup>3</sup>, 10<sup>3</sup> и 10<sup>2</sup> BM MNC пациента P002 при диагностике (SCR), через 14 дней после введения ARGX110 (1 мг/кг внутривенно, момент времени 0 или C1D1) и после комбинированного лечения ("комбинированная терапия") высевали на метилцеллюлозу, и образование колоний оценивали через 2 недели.

Фиг. 10: Образцы сыворотки анализировали с использованием ИФА (Duoset ELISA, CD27/TNFRSF7 человека (кат: DY382-05, R & D Systems). Концентрация растворимого CD27 в образце рассчитывается по калибровочной кривой. Метод позволяет измерять сывороточную концентрацию человеческого растворимого CD27 с помощью метода сэндвич-ИФА. Козье антитело захвата против человеческого CD27 наносят на микропланшет, и сайты неспецифического связывания блокируются. Образцы человеческой сыворотки наносят, и связанный человеческий растворимый CD27 выявляют и визуализируют последующими добавлениями биотинилированного козьего детектирующего антитела против человеческого CD27, стрептавидина-HRP и смеси окрашивающего реагента H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и хромогенного субстрата тетраметилбензидина (TMB),

Фиг. 11: Концентрацию ARGX-110 в сыворотке крови анализировали с использованием проверенного метода иммуоферментного анализа (ИФА). PK графики индивидуальных пациентов предоставляются для 10 мг/кг когорты. График PK представляет данные для цикла 1 ARGX-110 (предварительная доза D-14 до предварительной дозы 1 цикла D1).

### Подробное описание изобретения

Традиционное лечение AML с использованием так называемой стандартной интенсивной химиотерапии "7+3" (т.е. интенсивные дозы цитарабина в течение 7 дней плюс 3 дня антрациклина, обычно сопровождаемые консолидационной химиотерапией или трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT)) является стандартной терапией в течение многих лет. Однако при этой схеме большинство пациентов с AML в возрасте до 60 лет не выживают более 5 лет. У пожилых людей, которым не подходит стандартная интенсивная химиотерапия, результаты лечения с меньшей интенсивностью не являются лечебными, HSCT, как правило, не подходит, и медиана общей выживаемости составляет менее года. AML является гетерогенным заболеванием, и рецидив заболевания часто происходит из-за одного или более клонов лейкозных стволовых клеток (LSC), которые были устойчивы к терапии. Несмотря на многочисленные доклинические исследования альтернативных методов лечения, очень немногие из них переведены на клинический уровень. Таким образом, существует потребность в новых эффективных методах лечения AML, особенно тех, которые подходят для пациентов, не подходящих для стандартной интенсивной химиотерапии. В идеале, новые методы лечения не только снимают заболевание, уменьшая бластную нагрузку в костном мозге и крови, но также уменьшают или даже уничтожают гетерогенные популяции LSC.

Как впервые продемонстрировано в настоящем документе, людей, имеющих AML или MDS, эффективно лечат путем введения антитела против CD70. Такое лечение пациентов с AML или MDS особенно желательно, так как обычное лечение стандартной интенсивной химиотерапией связано со значительной токсичностью и побочными эффектами. Кроме того, многие пациенты (например, пожилые пациенты) имеют сопутствующие заболевания, так что они не переносят стандартную интенсивную химиотерапию, а это означает, что им доступны только менее эффективные методы лечения. В настоящем документе представлены способы лечения AML, которые эффективны даже в низких дозах и с ограничен-

ными побочными эффектами и токсичностью, что означает, что они подходят для введения всем пациентам. Это особенно полезно для лечения пациентов, которые в противном случае не имели бы возможности для стандартной интенсивной химиотерапии.

Следовательно, лечение AML в соответствии с изобретением обеспечивает удивительные и значительные преимущества по сравнению с доступными в настоящее время методами лечения. Аспекты и варианты осуществления изобретения теперь будут дополнительно описаны. Если не указано иное или это технически несовместимо, каждый вариант осуществления изобретения может быть взят в комбинации с любым другим вариантом осуществления изобретения.

#### Определения

Острый миелоидный лейкоз (AML) относится к гемопозитическим новообразованиям с участием миелоидных клеток. AML характеризуется клональной пролиферацией миелоидных предшественников со сниженной способностью к дифференцировке. У пациентов с AML наблюдается скопление бластных клеток в костном мозге. Бластные клетки обычно также накапливаются в периферической крови пациентов с AML. Обычно AML диагностируется, если у пациента обнаруживается 20% или более бластных клеток в костном мозге или периферической крови.

Термины "бластные клетки" или просто "бласты" в контексте настоящего описания относятся к клональным миелоидным клеткам-предшественникам, проявляющим нарушенный потенциал дифференцировки. Подмножество бластных клеток представляет собой лейкозные стволовые клетки (LSC). Это бластные клетки, обладающие свойствами стволовых клеток, так что при трансплантации иммунодефицитному реципиенту способны вызывать лейкоз. LSC могут самообновляться, вызывая лейкоз, а также частично дифференцироваться в обычные бластные клетки, не являющиеся LSC, что напоминает исходное заболевание, но они не способны к самообновлению. LSC встречаются с частотой в диапазоне от 1 на 10000 до 1 на 1 млн в виде доли первичных бластных клеток AML (Pollyea and Jordan, Blood 2017 129: 1627-1635, включено в настоящий документ в качестве ссылки). LSC могут быть охарактеризованы как клетки, которые являются CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, необязательно также CD45<sup>-</sup> и/или CD123<sup>+</sup>. LSC также могут быть охарактеризованы как CD45<sup>dim</sup>, SSC<sup>lo</sup>, CD90<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> клетки.

AML можно классифицировать и диагностировать в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 года в сочетании с обновлением этой классификации в 2016 г. (Arber et al. Blood, 19 May 2016 vol. 127, no. 20, включено в настоящее описание в качестве ссылки). Согласно классификации ВОЗ AML в целом охватывает следующие подтипы: острый миелоидный лейкоз с рецидивирующими генетическими аномалиями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; связанные с терапией миелоидные новообразования; миелоидная саркома; миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна; бластное плазмцитомное новообразование дендритных клеток; и AML, не отнесенные к другим категориям (например, острый мегакариобластный лейкоз, острый базофильный лейкоз).

AML также можно классифицировать в соответствии с франко-американо-британской (FAB) классификацией, охватывающей подтипы: M0 (острый миелобластный лейкоз, минимально дифференцированный); M1 (острый миелобластный лейкоз, без созревания); M2 (острый миелобластный лейкоз, с гранулоцитарным созреванием); M3 (промиелоцитарный или острый промиелоцитарный лейкоз (APL)); M4 (острый миеломоноцитарный лейкоз); M4eo (миеломоноцит вместе с эозинофилией костного мозга); M5 (острый монобластный лейкоз (M5a) или острый моноцитарный лейкоз (M5b)); M6 (острая эритроидная лейкемия, включая эритролейкемию (M6a) и очень редкий чистый эритроидный лейкоз (M6b)); или M7 (острый мегакариобластный лейкоз).

Используемый в настоящем описании термин "AML" относится к любому из состояний, охватываемых классификациями ВОЗ и/или FAB, если не указано иное. Считается, что некоторые подтипы AML имеют более благоприятный прогноз, некоторые - промежуточный прогноз, а некоторые - плохой или неблагоприятный прогноз. Специалисту известно, какие подтипы попадают в какую категорию риска.

Миелодиспластический синдром (MDS) характеризуется дисплазией, цитопенией и/или аномальными изменениями в насыщенности клетками костного мозга и/или миелоидной дифференцировкой, например усиленной инфильтрацией бластных клеток. MDS можно классифицировать и диагностировать в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. Согласно классификации ВОЗ, MDS в целом включает следующие подтипы: MDS с дисплазией одной линии (ранее называемой "рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией", которая включает рефрактерную анемию, рефрактерную нейтропению и рефрактерную тромбоцитопению), MDS с кольцевыми сидеробластами, которые включают подгруппы с односторонней дисплазией и мультилинейной дисплазией (ранее называемой "рефрактерная anemia с кольцевыми сидеробластами"); MDS с мультилинейной дисплазией (ранее называемой "рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией"); MDS с избытком бластов (MDS-EB, ранее называемый "рефрактерная anemia с избытком бластов"), который может быть в дальнейшем подразделен на MDS-EB-1 и MDS-EB-2 на основе процента бластов; MDS с выделенной del(5q); и MDS, не классифицированный.

MDS также можно классифицировать в соответствии с франко-американо-британской (FAB) классификацией, включающей подтипы: M9980/3 (рефрактерная anemia (RA)); M9982/3 (рефрактерная anemia с кольцевыми сидеробластами (RARS)); M9983/3 (рефрактерная anemia с избытком бластов

(RAEB)); M9984/3 (рефрактерная анемия с избытком бластов в процессе трансформации (RAEB-T)); и M9945/3 (хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML)).

Используемый в настоящем описании термин "MDS" относится к любому из состояний, охватываемых классификациями ВОЗ и/или FAB, если не указано иное. Как для AML, так и для MDS, в настоящем описании предпочтительна классификация ВОЗ.

Особенно желательно лечить пациентов с MDS "высокого риска", то есть пациентов с MDS с высоким риском развития AML и плохим прогнозом выживаемости. Вопрос о том, является ли пациент с MDS пациентом "высокого риска", можно определить с помощью пересмотренной Международной системы оценки прогностических показателей для MDS или IPSS-R (Greenberg et al., Blood. 2012 Sep 20; 120 (12): 2454-2465, включено в настоящее описание в качестве ссылки). IPSS-R учитывает процент бластов костного мозга пациента, цитогенетические аномалии, количество и степень цитопении, чтобы поместить пациента в прогностическую категорию. Пациент с оценкой IPSS-R выше 4,5 считается пациентом с MDS "высокого риска".

Ответ пациента на терапию AML может быть клинически охарактеризован в соответствии с критериями табл. 1.

Таблица 1

Критерии ответа	Определение
Полная ремиссия (CR)*	Бласты костного мозга < 5%; отсутствие бластов с тельцами Ауэра; отсутствие экстрамедуллярного заболевания; абсолютное количество нейтрофилов > $1 \times 10^9/L$ (1000/мкл); количество тромбоцитов > $100 \times 10^9/l$ (100000/мкл); независимость переливания эритроцитов
CR с неполным восстановлением (CRi)	Все критерии CR за исключением остаточной нейтропении (< $1 \times 10^9/l$ [1000/мкл]) или тромбоцитопении (< $100 \times 10^9/l$ [100000/мкл])
Морфологическое состояние без лейкоза (MLFS)	Бласты костного мозга < 5%; отсутствие бластов с тельцами Ауэра; отсутствие экстрамедуллярного заболевания; нет требуемого гематологического восстановления
Частичная ремиссия (PR)	Все гематологические критерии CR; снижение процента бластов костного мозга до 5% – 25%; и снижение процента бластов костного мозга до лечения по меньшей мере на 50%

Используемый в настоящем описании термин "доза" означает эффективное количество активного агента. Введение дозы пациенту представляет собой введение эффективного количества конкретного активного агента в день. "Доза" может быть введена в виде одного введения или в виде многократного введения в день, при условии, что пациенту вводится указанное эффективное количество дозы. Например, доза 1 мг/кг может быть введена в виде одного ежедневного введения 1 мг/кг или двух приемов в день, причем общее количество двух введений достигает 1 мг/кг.

Используемые в настоящем описании термины "белок CD70" или "антиген CD70", или "CD70", или "TNFSF7", или "CD27L" используются взаимозаменяемо и относятся к члену семейства человеческих лигандов TNF, который является лигандом для TNFRSF27/CD27. Конкретные примеры CD70 человека включают в себя полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную под номером доступа эталонной последовательности NCBI № NP\_001243, или его внеклеточный домен.

Используемый здесь термин "антитело" включает иммуноглобулин, имеющий комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, которые обладают значительной специфической иммунореактивной активностью в отношении антигена, представляющего интерес (например, CD70 человека). Термин "антитела к CD70" используется в настоящем описании для обозначения антител, которые проявляют иммунологическую специфичность к белку CD70 человека. "Специфичность" для человеческого CD70 не включает перекрестной реактивности с видовыми гомологами CD70. Антитела содержат легкие и тяже-

лые цепи с ковалентной связью между ними или без нее. Антигенсвязывающий фрагмент антитела включает пептидные фрагменты, которые проявляют специфическую иммунореактивную активность к тому же антигену, что и антитело (например, CD70). Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: переменный домен легкой цепи антитела (VL); переменный домен тяжелой цепи антитела; одноцепочечный переменный фрагмент или одноцепочечное антитело (scFv); Fab-фрагмент; фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; фрагмент Fd; фрагмент Fv; (моновалентное) антитело с одним плечом; димеры; триатела; тетра-тела; или любую антигенсвязывающую молекулу, образованную комбинацией, сборкой или конъюгацией таких антигенсвязывающих фрагментов. Фрагменты могут быть получены, например, химической или ферментативной обработкой интактного или полного антитела или цепи антитела или рекомбинантными способами.

Используемый в настоящем описании термин "нуклеозидные метаболические ингибиторы" (NMI) относится к молекулам, которые препятствуют эпигенетической модификации (например, метилированию, деметилированию, ацетилированию или деацетилированию) нуклеотидов (ДНК и/или РНК). Примеры нуклеозидных метаболических ингибиторов включают гипометилирующие агенты (HMA), ингибиторы изоцитратдегидрогеназы (IDH), ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC) и бромодомен и экстра-терминальный (BET) ингибитор. Предпочтительными нуклеозидными метаболическими ингибиторами являются гипометилирующие агенты. Гипометилирующие агенты ингибируют нормальное метилирование ДНК и/или РНК. Примерами гипометилирующих агентов являются азацитидин, децитабин и гуаде-цитабин.

При использовании в настоящем описании, когда два или более активных агента вводят в виде "комбинированной терапии", это не требует или не исключает того, что активные агенты вводятся одновременно или включены в одну композицию. Комбинированная терапия имеет общепринятую интерпретацию двух или более активных агентов, вводимых таким образом, что пациент может извлечь пользу от каждого агента. Во избежание сомнений, "комбинированная терапия" не требует совместного введения, одновременного введения или фиксированной дозы препарата.

Используемый в настоящем описании термин "стандартная интенсивная химиотерапия" относится к так называемой индукционной химиотерапии "7+3", характеризующейся 7-дневной высокой дозой цитарабина и 3-дневным введением антрациклина (например, даунорубицина или идарубицина). Интенсивная химиотерапия проводится с целью вызвать полную ремиссию AML, обычно в отношении пациента, перенесшего трансплантацию стволовых клеток после успешной химиотерапии.

Стандартная интенсивная химиотерапия связана со значительной токсичностью и побочными эффектами, что означает, что она не подходит для пациентов, неспособных переносить эти эффекты. При использовании в настоящем описании, эти пациенты называются "не подходящими для стандартной интенсивной химиотерапии". Пациент может не подходить для стандартной интенсивной химиотерапии, потому что, например, у него проявляется одно или более сопутствующих заболеваний, указывающих, что он не переносит токсичность, или прогностические факторы, характеризующие его заболевание, указывают на неблагоприятный исход стандартной интенсивной химиотерапии. Определение права отдельного пациента на стандартную интенсивную химиотерапию будет осуществляться клиницистом с учетом истории болезни пациента и клинических руководств (например, руководящих принципов Национальной комплексной онкологической сети (NCCN), включенных в настоящий документ в качестве ссылки). Пациенты с AML в возрасте старше 60 лет часто оцениваются как не подходящие для стандартной интенсивной химиотерапии, при этом следует учитывать и другие факторы, включая цитогенетику и/или молекулярные аномалии AML, подвергаемого лечению.

Пациент, которому не подходит стандартная интенсивная химиотерапия, может вместо этого получить химиотерапию пониженной интенсивности, такую как цитарабин в низкой дозе (LDAC). Пациенты, которым не подходит стандартная интенсивная химиотерапия и для которых не подходит LDAC, могут получить наилучшую поддерживающую помощь (BSC), включая гидроксимочевину (HU) и поддержку в виде переливания крови.

Используемые в настоящем описании термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо для обозначения человека.

### **Подробное описание**

Как показано в настоящем описании, пациенты, страдающие от миелоидных новообразований, таких как AML и MDS, могут подвергаться лечению антителом против CD70. После однократного введения антитела против CD70 количество лейкозных стволовых клеток, которые можно выделить из костного мозга пациентов, значительно снижалось, равно как и количество бластных клеток, обнаруженных в костном мозге и периферической крови. Этот результат наблюдался даже при неожиданно низких дозах антитела.

Следовательно, в первом аспекте изобретение относится к способу лечения острого миелоидного лейкоза (AML) или миелодиспластического синдрома (MDS) у пациента, включающему введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента. Изобретение относится к способу лечения острого миелоидного лейкоза (AML) или миелодиспластического синдрома (MDS) у пациента, включающему введение пациенту одной или более терапевтически эффективных доз

антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте предложен способ снижения процента бластов в костном мозге и/или периферической крови пациента с AML или MDS, причем способ включает введение пациенту одной или более терапевтически эффективных доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В дополнительном аспекте предложено антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, представленных в настоящем документе.

Монотерапия антителами против CD70 и комбинированная терапия aCD70+NMI уменьшают количество бластных клеток костного мозга и периферической крови

Как описано в настоящем документе, способы по изобретению уменьшают количество и/или долю бластных клеток в костном мозге и/или в периферической крови, предпочтительно как в костном мозге, так и в периферической крови.

Доля бластных клеток в костном мозге или периферической крови может быть оценена способами, известными в данной области техники и описанными в настоящем документе, например, проточной цитометрикой или клеточной морфологической оценкой клеток, полученных из биопсии костного мозга пациента, или мазка периферической крови. Доля бластов определяется по отношению к общему количеству клеток в образце. Например, проточная цитометрия может быть использована для определения доли бластных клеток, используя количество CD45<sup>dim</sup>, SSC<sup>low</sup> клеток по отношению к общему количеству клеток. В качестве дополнительного примера, морфологическая оценка клеток может быть использована для определения количества морфологически идентифицированных бластов относительно общего количества клеток в исследуемой зоне визуализации.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы уменьшения доли бластных клеток в костном мозге по меньшей мере на 5% в абсолютном выражении, то есть снижения доли бластных клеток в костном мозге, например, с 30 до 25% или менее. В некоторых вариантах осуществления лечение можно охарактеризовать как уменьшение доли бластных клеток в костном мозге, по меньшей мере на 10% в абсолютном выражении, предпочтительно, по меньшей мере на 15%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 25%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 40%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 55%, предпочтительно по меньшей мере на 60% в абсолютном выражении. В некоторых вариантах осуществления доля бластных клеток в костном мозге снижается по меньшей мере на 50% по сравнению с моментом до лечения.

В некоторых вариантах осуществления доля бластов в костном мозге измеряется путем морфологической оценки клеток. В некоторых вариантах осуществления доля бластов в костном мозге измеряется с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления доля бластов в костном мозге измеряется в соответствии с оценкой минимального остаточного заболевания (MRD).

В некоторых вариантах осуществления предложены способы уменьшения доли бластных клеток в периферической крови по меньшей мере на 5% в абсолютном выражении, то есть снижения доли бластных клеток в периферической крови, например, с 30 до 25% или менее. В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения для уменьшения доли бластных клеток в периферической крови по меньшей мере на 5% в абсолютных показателях, необязательно по меньшей мере на 10% в абсолютном выражении, предпочтительно по меньшей мере на 15%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере 25% в абсолютном выражении. В некоторых вариантах осуществления доля бластов периферической крови (PB) измеряется путем морфологической оценки клеток. В некоторых вариантах осуществления доля PB-бластов измеряется с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления доля PB-бластов измеряется в соответствии с оценкой минимального остаточного заболевания (MRD).

В некоторых вариантах осуществления предложены способы снижения доли бластных клеток в костном мозге до менее чем 40%, необязательно до менее чем 20%, например, менее чем на 10%. В некоторых вариантах осуществления предоставлены способы снижения доли бластных клеток в костном мозге до менее чем 5%.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы снижения доли бластных клеток в периферической крови до менее чем 40%, необязательно менее чем 20%, например менее чем 10%. В некоторых вариантах осуществления предложены способы снижения доли бластных клеток в периферической крови до менее чем 5%.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет процент бластов костного мозга, по меньшей мере 20%, необязательно по меньшей мере 40%, необязательно по меньшей мере 60%, необязательно по меньшей мере 70%, до лечения.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет процент бластов периферической крови, по меньшей мере 5% до лечения, необязательно по меньшей мере 8%, необязательно по меньшей мере 10%, необязательно по меньшей мере 15%, необязательно по меньшей мере 20%, необязательно по меньшей мере 30%, необязательно по меньшей мере 40%, необязательно по меньшей мере 50%, необязательно по меньшей мере 60% до лечения.

Для клинического определения процента бластных клеток обычно предпочтительна морфологическая оценка клеток (также известная как цитоморфология).

Монотерапия антителами против CD70 и комбинированная терапия aCD70+NMI снижают уровень лейкозных стволовых клеток и способствуют дифференцировке

Важным подмножеством бластов при AML являются лейкозные стволовые клетки (LSC). LSC представляют собой опухолевые стволовые клетки, способные инициировать лейкоз. LSC могут самообновляться, вызывая лейкоз, а также частично дифференцироваться в обычные бластные клетки, не являющиеся LSC, которые напоминают исходное заболевание, но не способны самообновляться. LSC могут быть охарактеризованы как клетки, которые являются CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, необязательно также CD45<sup>-</sup> и/или CD123<sup>+</sup>. LSC также могут быть охарактеризованы как CD45<sup>dim</sup>, SSC<sup>lo</sup>, lin-CD90<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> клетки. Уменьшение количества LSC у пациента с AML должно значительно улучшить перспективу ремиссии и снизить вероятность рецидива.

Как показано в настоящем описании, монотерапия и комбинированное лечение согласно изобретению снижают долю LSC у пациента по меньшей мере в 2 раза, а в некоторых случаях в гораздо большей степени. Поэтому ожидается, что лечение согласно изобретению не только уменьшит общий процент бластов у пациента, но также уменьшит вероятность последующего рецидива заболевания.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления способы по изобретению уменьшают количество LSC в виде доли моноклеарных клеток (также упоминается как уменьшение частоты LSC). В некоторых вариантах осуществления предложены способы снижения частоты LSC по меньшей мере в 2 раза.

В некоторых вариантах осуществления оценка доли LSC в костном мозге может быть определена путем посева последовательных разведений, например, на метилцеллюлозу.

Монотерапия и комбинированное лечение согласно изобретению также способствуют дифференцировке LSC в миелоидные клетки. Стимулирование такой дифференцировки снижает популяцию LSC, способных к самообновлению, тем самым увеличивая вероятность ремиссии и снижая риск рецидива.

Миелоидная дифференцировка LSC характеризуется асимметричным делением клеток, в отличие от симметричного деления клеток, которое приводит к двум дочерним стволовым клеткам. Асимметричное деление может оцениваться с помощью методов микроскопии или путем измерения маркеров предопределения клеток, таких как белок Numb. Как показано в настоящем описании, LSC от пациентов, которые получали монотерапию антителом против CD70, проявляют повышенную экспрессию Numb (и, следовательно, повышенную дифференцировку) по сравнению с предшествующим лечением. Экспрессия Numb (и, следовательно, дифференцировка) дополнительно увеличивается, когда пациентов лечат антителом против CD70 в комбинации с NMI. Эти данные представляют собой первую клиническую демонстрацию увеличения дифференцировки LSC антителом против CD70 *in vivo* и, таким образом, опережают данные *in vitro*, представленные Riether et al. J. Exp. Med. 2017 Feb;214(2):359-380.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению способствуют дифференцировке лейкозных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению способствуют асимметричному делению лейкозных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению способствуют экспрессии Numb на лейкозных стволовых клетках.

AML эффективно подвергается лечению даже при низких дозах антитела против CD70

Данные клинического испытания, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что процентное содержание бластных клеток было снижено у пациентов, которых лечат антителами против CD70, даже в самой низкой дозе. Целью введения пациентам антител в этой дозе было просто подтвердить безопасность лечения антителами и определить дозолIMITирующую токсичность (DLT). Поэтому было очень удивительно, что даже после однократного введения самой низкой дозы антитела процент бластных клеток значительно снижался.

Таким образом, данные, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что AML или MDS можно лечить всеми протестированными дозами антитела против CD70, включая неожиданно низкие дозы.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления всех способов по изобретению антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 0,1 до 25 мг/кг на дозу, например в диапазоне от 0,1 до 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 1 до 20 мг/кг на дозу. Описанные в настоящем документе диапазоны включают конечные точки диапазона, если не указано иное, например введение в дозе в диапазоне 0,1-25 мг/кг включает введение в дозе 0,1 мг/кг и введение в дозе 25 мг/кг, а также все дозы между двумя конечными точками.

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 0,1 до 15 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 0,5 до 2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг. В некоторых предпочтительных

вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 1 мг/кг. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления вводят множественные дозы антитела против CD70 или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых таких вариантах осуществления каждая доза антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента отстоит на 10-20 дней, необязательно на 12-18 дней. В некоторых вариантах осуществления каждая доза антитела против CD70 отстоит на 14-17 дней.

В некоторых вариантах осуществления лечение согласно изобретению приводит по меньшей мере к частичной ремиссии. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к тому, что у пациента наблюдается состояние без лейкоза. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит по меньшей мере к полной ремиссии с неполным выздоровлением (CRi). В некоторых вариантах осуществления лечение приводит по меньшей мере к полной ремиссии.

Таким образом, лечение согласно изобретению позволяет лечить AML или MDS путем уменьшения количества бластных клеток (включая лейкозные стволовые клетки) в костном мозге и в периферической крови. Лечение также особенно эффективно при снижении уровня LSC.

#### **Характеристики пациента**

Лечение в соответствии с изобретением особенно выгодно, поскольку оно обеспечивает эффективные средства индукции ремиссии (частичной или полной) AML без значительной токсичности и заболеваемости, связанных со стандартной интенсивной химиотерапией. Обеспечение терапии без этих побочных эффектов является существенным преимуществом изобретения.

Уменьшение побочных эффектов терапии AML явно желательно для лечения пациентов с AML в целом. Кроме того, это особенно выгодно для пациентов, которые обычно не могли бы получить более мощное лечение AML. Существует необходимость в эффективной терапии для пациентов, которым не подходит стандартная интенсивная химиотерапия из-за сопутствующих заболеваний пациента, например, в возрасте 60 лет или старше. Хотя для этих пациентов доступны альтернативные методы лечения (например, низкодозированный цитарабин (LDAC)), они снижают вероятность достижения ремиссии и по-прежнему связаны со значительными побочными эффектами. Напротив, лечение согласно изобретению обеспечивает эффективную терапию AML, которую могут переносить пациенты, которые при этом не могут переносить токсичность стандартной интенсивной химиотерапии.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту не подходит стандартная интенсивная химиотерапия перед лечением. В некоторых таких вариантах осуществления пациенту по меньшей мере 60 лет, необязательно по меньшей мере 70 лет.

Еще одной традиционной терапией для AML является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) с использованием аллогенных или аутологичных стволовых клеток. Пациенты, которым не подходит стандартная интенсивная химиотерапия, обычно не могут получать HSCT. Это связано с тем, что вероятность успешной трансплантации снижается у пациентов, получающих химиотерапию только в низких дозах, поскольку они не могут получить стандартную интенсивную химиотерапию, предназначенную для удаления бластов костного мозга при подготовке к получению трансплантата. В то время как HSCT может проводиться с использованием химиотерапии с пониженной интенсивностью, вероятность успеха ниже из-за большей вероятности остаточных бластов, остающихся в костном мозге.

Пригодность отдельного пациента для HSCT будет зависеть от индивидуальной оценки клинициста с учетом вероятности успешной трансплантации и других факторов, таких как оставшиеся варианты лечения и качество жизни. Примером, но важным фактором, который следует учитывать, является процент бластов костного мозга, демонстрируемых пациентом.

Как показано здесь, лечение согласно изобретению способно значительно снизить процент бластов костного мозга. Обеспечивая средства для снижения процента бластов в костном мозге у пациентов, которым не подходит стандартная интенсивная химиотерапия, способы по изобретению открывают перспективу успешного HSCT в популяции пациентов, для которых HSCT ранее не рекомендовался.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления всех аспектов изобретения пациенту не подходит стандартная интенсивная химиотерапия перед лечением, а лечение снижает процент бластов костного мозга, так что пациент имеет право на HSCT. В некоторых вариантах осуществления лечение дополнительно включает проведение трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

В настоящем описании предложен способ подготовки пациента с AML или MDS для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), включающий введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления и как описано в другом месте в настоящем документе, способ может дополнительно включать введение NMI (например, HMA, такого как азациитидин) пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение HSCT пациенту.

Ожидается, что лечение согласно изобретению будет особенно эффективным при лечении пациентов с аномально высокими уровнями растворимого CD27 в сыворотке.

Не желая быть связанными теорией, считается, что связывание CD27-CD70 приводит к высвобождению

дению растворимого CD27 (sCD27) путем шеддинга. Следовательно, растворимый CD27 может служить биомаркером для степени взаимодействия CD70/CD27 (Riether et al. J. Exp. Med. 2017 Feb;214(2):359-380, включено в настоящее описание в качестве ссылки). В частности, sCD27, как полагают, коррелирует с процентом бластных клеток в костном мозге, а также служит в качестве маркера для стволовости бластов пациента, при этом повышенный уровень sCD27 указывает на повышенный уровень стволовости (Riether et al. J. Exp. Med. 2017 Feb;214(2):359-380).

Считается, что опосредованная CD70/CD27 передача сигналов способствует aberrантному делению клеток, а высокий уровень sCD27 в сыворотке коррелирует с плохим прогнозом у пациентов с AML. Использование антитела против CD70 в соответствии с изобретением снижает процент бластных клеток в костном мозге (см. Примеры) и блокирует взаимодействия CD27/CD70, тем самым снижая уровни бластной стволовости и способствуя дифференцировке. Соответственно, ожидается, что пациенты с AML, имеющие повышенный sCD27, получают особую пользу от лечения антителом против CD70 согласно изобретению.

Образцы здоровых людей демонстрируют уровни sCD27 в сыворотке от 10 до 200 ед/мл, а у пациентов с AML - повышенный уровень sCD27 в сыворотке (Riether et al. J. Exp. Med. 2017 Feb;214(2):359-380). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента, подлежащего лечению, концентрация sCD27 в сыворотке превышает до более чем 200 ед/мл. Также было установлено, что для всех пациентов с AML в возрасте и по категориям риска подтипа AML (то есть среди пациентов с благоприятной, промежуточной и высокого риска/неблагоприятной цитогенетической классификацией) пациенты с уровнем sCD27 в сыворотке, превышающим порог 577 Ед/мл имеют худший прогноз, чем пациенты с уровнями sCD27 ниже этого порога. Поэтому в некоторых вариантах осуществления пациент, подлежащий лечению, имеет концентрацию sCD27 в сыворотке, превышающую 577 Ед/мл.

Когда уровни sCD27 в сыворотке были проанализированы в категориях риска подтипа AML, было выявлено, что у пациентов с AML подходящего подтипа с уровнем sCD27 в сыворотке, превышающим порог в 470 Ед/мл, прогноз хуже, чем у пациентов с AML подходящего подтипа и с sCD27 с уровнем ниже этого порога. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления пациент, подлежащий лечению, имеет подтип AML благоприятного или низкого риска и имеет концентрацию sCD27 в сыворотке, превышающую 470 Ед/мл.

У пациентов с AML подтипа промежуточного риска с уровнем sCD27 в сыворотке, превышающим порог 586 Ед/мл, прогноз хуже, чем у пациентов с AML промежуточного подтипа и уровнем sCD27 ниже этого порога. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления пациент, подлежащий лечению, имеет подтип AML промежуточного риска и имеет концентрацию sCD27 в сыворотке, превышающую 586 Ед/мл.

У пациентов с AML подтипа высокого риска с уровнем sCD27 в сыворотке, превышающим порог 714 Ед/мл, прогноз хуже, чем у пациентов с AML подтипа высокого риска и уровнями sCD27 ниже этого порога. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления пациент, подлежащий лечению, имеет подтип AML высокого риска и имеет концентрацию sCD27 в сыворотке, превышающую 714 Ед/мл.

Очевидно, что у пациента, подлежащего лечению в соответствии с изобретением, концентрация sCD27 в сыворотке может быть предварительно определена как превышающая или как являющаяся ниже любого из описанных пороговых значений. Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления лечение и способы по изобретению дополнительно включают стадию измерения концентрации CD27 в сыворотке пациента.

Как уже описано в настоящем документе, введение антитела против CD70 в соответствии с изобретением уменьшает количество бластов костного мозга и может блокировать взаимодействие CD27 и CD70. Сокращение бластных клеток наряду с ингибированием взаимодействия CD27/CD70 значительно снижает уровень шеддинга sCD27, как показано в примерах.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению (например, монотерапия антителом против CD70 или комбинированная терапия антителом против CD70+NMI) снижают уровень sCD27 в сыворотке по сравнению с предшествующим лечением. В некоторых вариантах осуществления уровень sCD27 в сыворотке снижается, по меньшей мере, на 200 пг/мл, необязательно по меньшей мере на 500 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления уровень CD27 в сыворотке снижается по меньшей мере на 1000 пг/мл, по меньшей мере на 1500 пг/мл или по меньшей мере на 10000 пг/мл по сравнению с предшествующим лечением.

Далее в примерах, приведенных в настоящем описании, продемонстрировано, что уровень sCD27 может быть использован в качестве коррелята взаимодействия антитела против CD70 с его антигеном-мишенью. Уровень растворимого CD27 может уменьшаться в ответ на введение антитела против CD70, а затем увеличиваться после прекращения терапии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают мониторинг эффективности лечения путем детектирования сывороточного sCD27.

Введение антитела против CD70 в соответствии с изобретением не только уменьшает процент бластов, но предпочтительно уменьшает количество бластных клеток, которые экспрессируют CD70 (CD70<sup>+</sup> бластов). Понятно, что aberrантные бластные клетки AML сверхэкспрессируют CD70 относительно здо-

ровых клеток-предшественников. Таким образом, нацеливание на бластные клетки, экспрессирующие CD70, уменьшает количество патогенных бластов, но оказывает незначительное влияние на здоровые клетки-предшественники, тем самым снижая риск развития цитопении у пациента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения процент CD70<sup>+</sup> бластов снижается. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание бластов CD70<sup>+</sup> уменьшается по меньшей мере на 5%, необязательно по меньшей мере на 10% в абсолютном выражении. В некоторых вариантах осуществления процент клеток CD70<sup>+</sup> уменьшается до менее чем 20%, необязательно менее чем до 10%. В некоторых вариантах осуществления процент бластных клеток CD70<sup>+</sup> снижается до менее чем 5%. Процент бластов CD70<sup>+</sup> может быть уменьшен до указанного количества в костном мозге и/или периферической крови.

Что касается лечения MDS, особенно желательно лечить пациентов с MDS "высокого риска", то есть пациентов с MDS с плохим прогнозом выживаемости, более быстрым прогрессированием заболевания и более высокой вероятностью прогрессирования до AML. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления пациент является пациентом с MDS "высокого риска". В некоторых вариантах осуществления пациент имеет оценку IPSS-R более 4,5.

#### **Терапия антителом против CD70 в комбинации с нуклеозидным метаболическим ингибитором (NMI)**

Как уже описано в настоящем документе, монотерапия антителом против CD70 обеспечивает эффективное лечение AML или MDS, что приводит к значительному снижению процента бластных клеток. Также как обеспечение эффективной монотерапии, данные настоящего описания демонстрируют дальнейшую терапевтическую эффективность антитела против CD70 при введении в качестве части комбинированной терапии с нуклеозидным метаболическим ингибитором (NMI), например гипометилирующим агентом (HMA), таким как азацитидин (также называемый здесь азацитидин, AZA или аза) или децитабин.

Таким образом, в дополнительном аспекте предложена комбинация, содержащая антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и NMI. В некоторых вариантах осуществления NMI представляет собой гипометилирующий агент, предпочтительно азацитидин.

В дополнительном аспекте предложена комбинация, содержащая антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и NMI для применения в способе лечения AML или MDS. В некоторых вариантах осуществления NMI представляет собой гипометилирующий агент, предпочтительно азацитидин.

В дополнительном аспекте предложена комбинация, содержащая антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и NMI для применения в способе по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления NMI представляет собой гипометилирующий агент, предпочтительно азацитидин.

Следующие варианты осуществления применимы ко всем аспектам и способам изобретения, представленным в данном документе, если не указано иное.

Азацитидин является аналогом цитидина, а децитабин - его дезоксипроизводным. AZA и децитабин являются ингибиторами ДНК-метилтрансфераз (DNMT), которые, как известно, активируют экспрессию генов посредством гипометилирования промотора. Такое гипометилирование нарушает функцию клеток, что приводит к цитотоксическим эффектам.

Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что терапевтический эффект, возникающий при лечении антителом к CD70 и нуклеозидным метаболическим ингибитором, таким как AZA, обусловлен усилением эффекта от объединения двух активных агентов. Как уже было описано, одно только антитело против CD70 истощает бласты костного мозга и циркулирующие бласты (т. е. в костном мозге, периферической крови или в обоих), а нуклеозидный метаболический ингибитор (такой как AZA) индивидуально нарушает клеточную активность.

Кроме того, активация CD70 на поверхности бластов AML и LSC индуцируется лечением нуклеозидным метаболическим ингибитором (азацитидин или децитабин) (см. примеры и фиг. 1). Этот эффект активации антигена коррелирует с увеличением эффективности антитела против CD70 при использовании в комбинации с нуклеозидным метаболическим ингибитором, таким как азацитидин, как показано в прилагаемых примерах. Это приводит к тому, что количество бластных клеток уменьшается в большей степени, чем после введения одного активного агента, и может объяснить удивительную эффективность комбинированного лечения, когда антитело против CD70 вводят в виде низкой дозы.

Следовательно, в определенных предпочтительных вариантах осуществления способы лечения и способы по изобретению дополнительно включают введение пациенту метаболического нуклеозидного ингибитора. В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор представляет собой гипометилирующий агент. В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор представляет собой азацитидин или децитабин. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор представляет собой азацитидин.

В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор (например, азацитидин) вводят в дозе в диапазоне 50-100 мг/м<sup>2</sup> в день. Как уже отмечалось, диапазоны, описанные в

настоящем документе, включают конечные точки диапазона, если не указано иное - например, введение в дозе в диапазоне 50-100 мг/м в день включает введение в дозе 50 мг/м в день и введение в дозе 100 мг/м в день, а также все дозы между двумя конечными точками. В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в дозе в диапазоне 70-80 мг/м в день. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в дозе 75 мг/м в день.

В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в течение периода дозирования суточной дозы в течение 5-9 дней. То есть дозу нуклеозидного ингибитора вводят каждый день в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в течение периода дозирования суточной дозы в течение 7 дней.

В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в соответствии с режимом дозирования повторяющихся периодов дозирования, при этом конец одного периода дозирования и начало следующего периода дозирования отстоят друг от друга на 18-25 дней. То есть режим дозирования включает по меньшей мере 2 периода дозирования, в которых дозу нуклеозидного ингибитора вводят каждый день (например, в течение периода 5, 6, 7, 8 или 9 дней), где конец одного периода дозирования и начало следующего периода дозирования отстоят друг от друга на 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней. В некоторых вариантах осуществления конец одного периода дозирования и начало следующего периода дозирования отстоят друг от друга на 21 день.

В некоторых вариантах осуществления каждый период дозирования имеет одинаковую продолжительность (например, 7 дней). В некоторых вариантах осуществления конец каждого периода дозирования и начало следующего периода дозирования отстоят друг от друга на одинаковое количество дней (например, 21 день).

В некоторых вариантах осуществления первую дозу нуклеозидного метаболического ингибитора вводят через 7-21 день после первой дозы антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления первую дозу нуклеозидного метаболического ингибитора вводят через 10-17 дней после первой дозы антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления первую дозу нуклеозидного метаболического ингибитора вводят через 14 дней после первой дозы антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления одну из суточных доз нуклеозидного метаболического ингибитора вводят в тот же день, что и дозу антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента. То есть в вариантах осуществления способов по изобретению, в которых пациенту вводят как антитело против CD70 (или его антигенсвязывающий фрагмент), так и нуклеозидный метаболический ингибитор, режимы дозирования как антитела против CD70, так и нуклеозидного метаболического ингибитора таковы, что по меньшей мере одна из запланированных доз антитела против CD70 вводится в тот же день, что и одна из запланированных суточных доз нуклеозидного метаболического ингибитора. Этот день может быть первым, вторым, третьим, четвертым, пятым, шестым или седьмым днем периода дозирования нуклеозидного метаболического ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления дозу антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента вводят каждые 14-17 дней, а нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в соответствии с режимом дозирования повторяющихся периодов введения суточной дозы в течение 7 дней, где конец одного периода дозирования и начало следующего периода дозирования отстоят друг от друга на 21 день, причем первая суточная доза первого периода дозирования вводится через 14 дней после первой дозы антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

Еще одним преимуществом изобретения является то, что после начального периода комбинированной терапии введение NMI (например, aza) может быть остановлено или прекращено. Например, как показано в настоящем описании, начальный период комбинированной терапии с антителом к CD70 и NMI может значительно снизить процент бластов у пациента. Однако существует потенциал для накопленной токсичности, возникающей в результате длительных периодов лечения NMI, например, цитопении, возникающей в результате воздействия NMI на типы небластных клеток. Уменьшая или прекращая введение дозы NMI после начального периода, риск такой токсичности будет снижен, и типы небластных клеток могут восстановиться. Однако процент бластов все еще будет контролироваться путем поддержания дозы антитела против CD70. Другими словами, пациент может подвергаться лечению с помощью индукционной терапии уже описанного комбинированного лечения и затем может быть переведен на поддерживающую терапию, включающую терапию антителом против CD70 с уменьшающимися дозами NMI или терапию антителом против CD70 индивидуально в качестве монотерапии.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления лечение согласно изобретению включает введение пациенту антитела против CD70 и NMI в качестве комбинированной терапии в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше, на первой стадии (индукционная терапия) и на последующей второй стадии введение пациенту антитела против CD70 и введение дозы NMI ниже, чем доза NMI, вводимая на первой стадии (поддерживающая терапия). Доза NMI на второй стадии может быть нулевой, то есть вторая стадия может включать введение только антитела против CD70.

В таких вариантах осуществления доза антитела против CD70, вводимая на второй стадии (т.е. поддерживающей терапии), представляет собой любую дозу в соответствии с уже описанными вариантами осуществления. То есть в некоторых вариантах осуществления доза находится в диапазоне от 0,1 до 25 мг/кг, например от 0,1 до 20 мг/кг, например от 1 до 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза находится в диапазоне от 0,1 до 15 мг/кг на дозу. В некоторых вариантах осуществления доза находится в диапазоне от 0,5 до 2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 10 мг/кг.

Продолжительность первой стадии (т.е. индукционная терапия), сроки перехода ко второй стадии (т.е. поддерживающая терапия) и степень, до которой доза NMI уменьшается или полностью прекращается ее введение, являются факторами, которые будут адаптированы для конкретного пациента, и определяется их врачом в зависимости от реакции пациента на терапию и истории болезни. Следовательно, следующие варианты осуществления представлены в качестве неограничивающих примеров.

В некоторых вариантах осуществления индукционная терапия вводится пациенту до тех пор, пока процентная доля бластов его костного мозга и/или периферической крови не станет меньше чем 10%, необязательно меньше чем 5%. В некоторых вариантах осуществления индукционная терапия вводится в течение по меньшей мере 5 периодов дозирования NMI, необязательно по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10 периодов дозирования NMI.

В некоторых вариантах осуществления доза NMI в период поддержания составляет не более чем 50 мг/м в день, необязательно не более чем 40 мг/м в день, необязательно не более чем 30 мг/м в день, необязательно не более чем 20 мг/м в день.

#### **Фармацевтические композиции**

В соответствии с изобретением также предложены фармацевтические композиции для применения в способах, описанных в настоящем документе. Поэтому в следующем аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CD70 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель для применения в способе согласно изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества известны специалисту в данной области. Примеры фармацевтически приемлемых носителей и вспомогательных веществ, подходящих для включения в фармацевтические композиции по изобретению, включают цитрат натрия, глицин, полисорбат (например, полисорбат 80) и солевой раствор.

Для комбинаций по изобретению антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть включены в состав для введения тем же путем или другим путем по сравнению с нуклеозидным метаболическим ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 вводят пациенту парентерально, предпочтительно внутривенно (iv). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 вводят в виде непрерывной внутривенной инфузии до достижения желаемой дозы.

В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный метаболический ингибитор вводят парентерально, предпочтительно подкожно (s.c).

#### **Комбинированная терапия**

Лечение в соответствии с изобретением может быть включено в комбинированную терапию с одним или более дополнительными активными агентами, такими как терапевтические или паллиативные агенты (например, радиотерапия, анальгетики или антибиотики). Такие активные агенты могут вводиться в качестве терапевтических средств для улучшения реакции пациента на терапию и/или качества их жизни. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 (необязательно в комбинированной терапии с NMI) вводят в соответствии с изобретением в комбинированной терапии с одним или более дополнительными активными агентами.

Неожиданно было показано, что лечение AML или MDS с помощью антитела против CD70 (в виде монотерапии или комбинированной терапии с NMI, таким как aza) особенно эффективно для уменьшения бластов в костном мозге и периферической крови. Конкретное преимущество заключается в том, что антитела против CD70 избирательны в отношении бластов по сравнению с клетками других типов (поскольку CD70 обладает минимальной экспрессией в нормальных тканях) и могут индуцировать дифференцировку стволовых клеток/снижать их стволовость (например, путем препятствия передачи сигналов, опосредованной CD27/CD70).

Эти эффекты на бласты и лейкозные стволовые клетки указывают на то, что лечение в соответствии с изобретением будет преимущественно сочетаться с агентами, которые также нацелены на бласты и LSC. CD33 является рецептором, который экспрессируется на большинстве миелоидных бластов и LSC, но отсутствует или присутствует только на низком уровне в нормальных гемопоэтических стволовых клетках. В то время как CD33 экспрессируется на множестве других типов клеток, менее связанных с AML, CD33 экспрессируется на большинстве клеток AML, и уровень CD33, по-видимому, коррелирует с прогнозом заболевания. Антитела к CD33, такие как биспецифическое антитело AMG330 и конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) вадатуксимаб талирин, были описаны как эффективные средства для лечения AML, и вадатуксимаб талирин (также известный как SGN-CD33A от Seattle Genetics)

тестируется в исследованиях фазы III. Следовательно, ожидается, что антитела против CD33 будут комбинироваться с лечением согласно изобретению (монотерапия антителом против CD70 или комбинацией антитела против CD70 и NMI (например, aza)), обеспечивая особенно эффективную терапию для AML. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту вводят агент против CD33, например антитело против CD33, как часть комбинированной терапии с антителом против CD70 (и необязательно NMI) в соответствии с изобретением.

CD123 является другим рецептором, связанным с миелоидными бластами и LSC, но с низким уровнем экспрессии в других типах клеток, таких как здоровые гемопоэтические стволовые клетки и лимфоциты. Клетки AML с высокой экспрессией CD123 демонстрируют более высокую пролиферацию, а более высокая экспрессия CD123 среди бластов AML связана с более низкими показателями полной ремиссии и меньшей общей выживаемостью. Следовательно, агенты, нацеленные на CD123, представляют собой другую подходящую комбинацию для применения при лечении согласно настоящему изобретению. Агенты против CD123, подходящие для применения при лечении AML, включают связанный с токсином природный лиганд (например, DT<sub>388</sub>IL3) и антитела, такие как CSL360, CSL362 и MGD006 (модифицированное антитело (DART)). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту вводят анти-CD123-агент, например антитело против CD123, как часть комбинированной терапии с антителом против CD70 (и необязательно NMI) в соответствии с изобретением.

Лечение AML антителом против CD70 (в виде монотерапии или вместе с NMI (например, aza)) может быть дополнительно выгодно объединено в комбинированной терапии с другими терапевтическими агентами AML, например, ингибиторами E-селектина, ингибиторами рецептора 3 FMS-подобной тирозинкиназы (FLT3), ингибиторами циклинзависимой киназы, ингибиторами BCL-2, ингибиторами аминоксипептидазы и ингибиторами JAK/STAT.

Как уже описано, другие терапевтические агенты AML включают цитарабин, антрациклиновые соединения (например, даунорубин, идарубин) и гидроксимочевину.

#### **Антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент**

Во всех аспектах изобретения, описанного в настоящем документе, пациенту, подлежащему лечению, вводят антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент. Используемый в настоящем описании термин "антитело" относится к иммуноглобулинам, имеющим комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, которые обладают специфической иммунореактивной активностью к интересующему антигену (например, человеческому CD70). Термин "антитела к CD70" или "антитела против CD70" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения антител, которые проявляют иммунологическую специфичность к белку CD70 человека. "Специфичность" для человеческого CD70 в этом контексте не исключает перекрестной реактивности с видовыми гомологами CD70.

"Антитело" в контексте настоящего описания охватывает человеческие антитела любого класса (например, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), а также их подклассы/изотипы (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1). Используемое в настоящем описании антитело также относится к модифицированным антителам. Модифицированные антитела включают синтетические формы антител, которые изменены таким образом, что они не встречаются в природе, например, антитела, которые содержат по меньшей мере две части тяжелой цепи, но не две полные тяжелые цепи (такие как антитела с делецией домена или мини-тела); полиспецифичные формы антител (например, биспецифичные, триспецифичные и т.д.), измененные для связывания с двумя или более различными антигенами или с различными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелых цепей, соединенные с молекулами scFv и т.п. Кроме того, термин "модифицированное антитело" включает поливалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.д. антитела, которые связываются с тремя или более копиями одного и того же антигена).

Антитела, описанные в настоящем документе, могут обладать эффекторной функцией антитела, например, одной или более из антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

Антитело к CD70, подходящее для использования согласно всем аспектам изобретения, включает ARGX-110, описанное в WO 2012123586 (включенный в настоящее описание в качестве ссылки), и SGN-70 (WO 2006113909, а также McEarChern et al. Clin Cancer Res 2008; 14 (23) p7763, оба включены в настоящее описание в качестве ссылки).

Антитело против CD70, подходящее для использования по всем аспектам изобретения, также может представлять собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). ADC представляют собой антитела, присоединенные к активным агентам, например ауристинатам и майтанзинам или другим цитотоксическим агентам. Некоторые ADC поддерживают блокирование антител и/или эффекторную функцию (например, ADCC, CDC, ADCP), а также доставляют конъюгированный активный агент в клетки, экспрессирующие мишень (например, CD70). Примеры анти-CD70 ADC включают в себя ворсетузумаб мафодотин (также известный как SGN-75, Seattle Genetics), SGN-70A (Seattle Genetics) и MDX-1203/BMS936561 (Bristol-Myers Squibb), каждый из которых может использоваться в соответствии с изобретением. Подходящие анти-CD70 ADC также описаны в WO 2008074004 и WO 2004073656, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки).

"Антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту антитела, который под-

держивает специфичность связывания для CD70 и включает вариабельный домен легкой цепи антитела (VL); вариабельный домен тяжелой цепи антитела; вариабельный фрагмент с одной цепью или одноцепочечное антитело (scFv); Fab фрагмент; фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; фрагмент Fd; фрагмент Fv; антитело с одним плечом (одновалентное); димеры; триатела; тетратела; или любая антигенсвязывающая молекула, включая такие антигенсвязывающие фрагменты (например, химерный антигенный рецептор), или любая антигенсвязывающая молекула, образованная комбинацией, сборкой или конъюгацией таких антигенсвязывающих фрагментов. Фрагменты могут быть получены, например, химической или ферментативной обработкой интактного или полного антитела или цепи антитела или рекомбинантными способами.

Как показано в примерах, было продемонстрировано эффективное лечение пациентов с AML с помощью антитела против CD70, ARGX-110. ARGX-110 является антителом IgG1 против CD70, которое, как было показано, ингибирует взаимодействие CD70 с его рецептором CD27 (Silence et al. MAbs 2014 Mar-Apr;6(2):523-32, включено в настоящее описание в качестве ссылки). В частности, было показано, что ARGX-110 ингибирует индуцированную CD70 передачу сигналов CD27. Уровни передачи сигналов CD27 могут быть определены, например, путем измерения в сыворотке растворимого CD27, как описано в Riether et al. (J. Exp. Med. 2017 Feb; 214 (2): 359-380), или экспрессии IL-8, как описано в Silence et al (MAbs. 2014 Mar-Apr;6(2):523-32). Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что ингибирование передачи сигналов CD27 уменьшает активацию и/или пролиферацию Treg-клеток, тем самым уменьшая ингибирование противоопухолевых эффекторных T-клеток.

Следовательно, во всех аспектах изобретения антитело против CD70 может представлять собой антитело, которое ингибирует взаимодействие CD70 с его рецептором CD27. В некоторых таких вариантах осуществления антитело против CD70 может конкурировать с CD27 за связывание с CD70. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 может ингибировать индуцированную CD70 передачу сигнала CD27. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 может ингибировать активацию и/или пролиферацию Treg.

Также было продемонстрировано, что ARGX-110 истощает CD70-экспрессирующие опухолевые клетки. В частности, было показано, что ARGX-110 лизирует экспрессирующие CD70 опухолевые клетки посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC), а также усиливает антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) экспрессирующих CD70 клеток. (Silence et al, MAbs. 2014 Mar-Apr;6(2):523-32).

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 может представлять собой антитело, которое истощает CD70-экспрессирующие клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 может индуцировать лизис клеток, экспрессирующих CD70. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 может обладать функциональностью ADCC и/или CDC. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 может индуцировать ADCP.

Fc-область ARGX-110 представляет собой дефукозилированную Fc-область в соответствии с системой Potelligent™, и ARGX-110 было описано как проявляющее повышенную функциональность ADCC по сравнению с фукозилированным аналогом (Silence et al. MAbs. 2014 Mar-Apr;6(2):523-32). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 полностью или частично дефукозилировано.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 содержит домен Fc, домен CH3 или шарнир Fc, полученный из человеческого IgG1, включающего Lys433, Phe434 и Tyr436 (согласно нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 дополнительно содержит один или более из Tyr252, Thr254 и Glu256 (согласно нумерации EU). Было показано, что эти остатки в этих положениях увеличивают время циркуляции антител.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 представляет собой антитело IgG, предпочтительно антитело IgG3.

Как уже описано и в свете данных, впервые представленных в настоящем описании, антитела против CD70, отличные от ARGX-110, как ожидается, будут эффективными способами лечения в соответствии с изобретением, например, с использованием антител к CD70, которые ингибируют взаимодействие CD70 с CD27, конкурируют с CD27 за связывание CD70, ингибируют CD70-индуцированную передачу сигналов CD27, ингибируют активацию и/или пролиферацию Treg, истощают CD70-экспрессирующие клетки, индуцируют лизис CD70-экспрессирующих клеток, обладают ADCC, функциональностью CDC и/или индуцируют ADCP. Альтернативные антитела против CD70, которые, как ожидается, будут полезны при лечении согласно изобретению, известны в данной области, например, SGN-70 и те, которые описаны в WO 2006044643 и WO 2007038637, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Модифицированные антитела против CD70, такие как ADC SGN-75, SGN-70A и MDX-1203/BMS936561, являются дополнительными примерами антител против CD70, которые, как ожидается, будут эффективными при лечении согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, не ограничивающих варианты осуществления, антитело против CD70 может содержать последовательности CDR ARGX-110. То есть в некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат CDR (по определению Kabat):

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (DAGYSNHVPIFDS) HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (DINNEGTTYYADSVKG) HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1 (VYYMN) LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ALFISNPSVE) LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (NTNTRHS), и LCDR1, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 5 (GLKSGSVTSDNFPT). В некоторых вариантах осуществления домены VH и/или VL антитела против CD70 имеют по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с доменами VH и/или VL ARGX-110, соответственно (VH: SEQ ID NO: 4; VL: SEQ ID NO: 8). Для вариантов осуществления, в которых домены антител или антигенсвязывающих фрагментов определяются определенным процентом идентичности последовательности с эталонной последовательностью, домены VH и/или VL могут сохранять последовательности CDR, идентичные тем, которые присутствуют в эталонной последовательности, так что присутствует вариация только в каркасных областях. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD70 представляет собой ARGX-110.

Таблица 2

ARGX-110	Последовательность	SEQ ID NO
HCDR1	VYYMN	1
HCDR2	DINNEGTTYYADSVKG	2
HCDR3	DAGYSNHVPIFDS	3
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGK GLEWVSDINNEGTTYYADSVKGRFTISRDNKSNLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDAGYSNHVPIFDSWGQGLTVTVSS	4
LCDR1	GLKSGSVTSDNFPT	5
LCDR2	NTNTRHS	6
LCDR3	ALFISNPSVE	7
VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGLKSGSVTSDNFPTWYQQTPGQ APRLLIYNTNTRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDEAEYF CALFISNPSVEFGGGTQLTVLG	8

### Примеры

Пример 1. Эффект монотерапии антителом против CD70 или в комбинации с децитабином на LSC AML человека, трансплантированных мышам

Мышам NSG трансплантировали  $5 \times 10^6$  CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>lo</sup> клеток AML человека. Через 32 дня после приживления (приживление в PB: 14,45 +/- 0,95%) мышей NSG рандомизировали для обработки носителем (Veh), mCD dCD70 (aCD70, ARGX-110, 10 мг/кг), децитабином (D, 1,5 мг/кг/сут) или комбинации (aCD70/D) в течение 5 дней и анализировали костный мозг, селезенку и кровь.

Как антитело против CD70, так и только децитабин приводили к снижению общего приживления в костном мозге, селезенке и крови (фиг. 1). Комбинация антитела против CD70 и децитабина привела к усиленному снижению процента приживленных клеток человека по сравнению с какой-либо одной терапией (фиг. 1).

Комбинированная терапия также уменьшала количество клеток CD34<sup>+</sup> AML (маркер клеток-предшественников) в костном мозге лучше, чем только децитабин или антитело против CD70 индивидуально (фиг. 1). Кроме того, обработка антителом против CD70 снижала как количество CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеток, так и CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> клеток, причем обе клеточные популяции считались маркерами лейкозных стволовых клеток (LSC). В то время как один децитабин демонстрировал минимальный эффект при уменьшении количества LSC, комбинация анти-CD70 и децитабина приводила к значительному усилению снижения LSC (фиг. 1).

Пример 2. Гипометилирующие агенты (HMA) усиливают экспрессию CD70 на первичных стволовых клетках AML ex vivo и in vivo, коррелируя с усилением снижения образования колонии AML антителом против CD70 в комбинации с HMA.

Обнаружение того факта, что лечение антителом против CD70 в комбинации с нуклеозидным метаболитическим ингибитором (NMI), например гипометилирующим агентом децитабином, приводит к усиленному уменьшению приживления бластных клеток AML у мышей, было дополнительно исследовано на первичных LSC AML человека.

Было исследовано влияние обработки NMI (например, HMA, таких как азациитидин или децитабин) на экспрессию CD70 LSC AML. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клетки выделяли у пациентов с AML и культивировали в присутствии 0,5 мМ децитабина или носителя.

Данные на фиг. 2A демонстрируют, что экспрессия CD70 клетками LSC AML увеличивается, когда клетки культивируют с децитабином. Это увеличение экспрессии CD70 в ответ на децитабин происходит в клетках, взятых у пациентов с AML по всем категориям риска заболевания (благоприятный, промежу-

точный и неблагоприятный) и при измерении на уровне белка или транскрипции (фиг. 2С и 2D).

Существенно, что увеличение экспрессии CD70 в ответ на гипометилирующие агенты (НМА) наблюдалось *in vivo*. LSC, взятые у пациентов, недавно диагностированных с AML и получавших децитабин или азацитидин, показано увеличение экспрессии CD70 в ответ на лечение НМА по сравнению с уровнем экспрессии при диагностике (фиг. 2E и 2F).

В свете повышенной экспрессии CD70 в ответ на НМА эффект комбинации антитела против CD70/децитабин на LSC AML был исследован *ex vivo*.

На фиг. 3A показано, что как монотерапия антителом против CD70, так и децитабином снижают количество колоний, образованных LSC AML, в анализе посева колоний. Примечательно, что комбинация антитела против CD70 и децитабина снижала образование колоний больше, чем любая монотерапия. Этот эффект наблюдался для всех категорий риска заболевания (благоприятный (P6), промежуточный (P8) и неблагоприятный (p11)). Способность к повторному посеву LSC AML также была снижена (фиг. 3C).

Важно отметить, что антитело против CD70 не оказывало неблагоприятного воздействия на здоровые стволовые клетки. На фиг. 3D-F показано, что антитело против CD70 в качестве монотерапии не оказывало влияния на здоровые клетки по сравнению с одним носителем, и при использовании в комбинации не оказывало влияния по сравнению с децитабином, используемым индивидуально.

Эти данные подтверждают использование антитела против CD70 в качестве монотерапии для AML, а также в комбинации с нуклеозидным метаболическим ингибитором (NMI), например, НМА, таким как азацитидин или децитабин.

Пример 3. Фаза I/II испытания антитела против CD70 ARGX-110 в комбинации со стандартными дозами AZA у пациентов с ранее нелеченными AML и MDS высокого риска

Фаза I/II клинических испытаний была начата для изучения эффективности/клинических преимуществ, безопасности и переносимости ARGX-110 в сочетании со стандартными дозами AZA у пациентов с ранее нелеченными AML и MDS высокого риска, которым подходит лечение AZA.

#### **Протокол режима испытаний и образцы**

Исследование включало в себя этап скрининга (между днем - 35 и днем - 14), нагрузочную дозу ARGX-110 (день - 14) и открытую фазу лечения, во время которой пациенты посещали центр исследования для введения исследуемого препарата (День - 14 до прогрессирования заболевания) и оценки завершения периода терапии (ЕОТ), проведенные в течение 7 дней после последнего лечения ARGX-110. Дополнительные последующие оценки были запланированы через 30 и 60 дней ( $\pm 7$  дней) после даты ЕОТ. Последующее 60-дневное посещение было также посещением после завершения периода исследования (ЕОС).

Пациенты мужского и женского пола, не моложе 18 лет, с недавно диагностированным гистологически подтвержденным (биопсия костного мозга) AML или миелодиспластическим синдромом высокого риска (MDS) с числом бластов  $>20\%$ , которым не подходила стандартная интенсивная химиотерапия, были приемлемыми для включения в исследование. Пациенты должны были иметь ожидаемую продолжительность жизни 3 или более месяцев, а статус эффективности Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) 0-2 при скрининге. Пациенты получали нагрузочную дозу ARGX-110 в день-14 с последующим введением ARGX-110 в комбинации со стандартными дозами AZA. Дозы ARGX-110 вводили внутривенно каждые 2 недели (нагрузочная доза в день-14 и дополнительные дозы в дни 3 и 17) в комбинации со стандартными дозами AZA для определения токсичности, ограничивающей дозу (см. фиг. 4). Первый пациент каждой когорты находился под наблюдением до 7 дня, после чего привлекали второго пациента. Поскольку в течение этого периода не произошло значительных нежелательных явлений, в исследование были включены другие пациенты из каждой когорты. Уровень дозы ARGX-110 в первой группе в фазе I составлял 1 мг/кг массы тела.

Все участники исследования получали однократную нагрузочную дозу ARGX-110 в день-14 при том же уровне дозы, что и двухнедельная доза. Пациенты на первой стадии исследования получили один из следующих методов лечения: когорта 1: 1 мг/кг массы тела IV в дни 3 и 17 28-дневного цикла; когорта 2: 3 мг/кг массы тела IV в дни 3 и 17 28-дневного цикла; когорта 3: 10 мг/кг массы тела IV в дни 3 и 17 28-дневного цикла; когорта 4: масса тела 20 мг/кг IV в дни 3 и 17 28-дневного цикла

Инфузию начинали со скоростью 10 мл/ч. Затем скорость была увеличена в соответствии с переносимостью препарата пациентом.

Клинический ответ на лечение был классифицирован в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Критерии ответа	Определение
Полная ремиссия (CR)*	Бласты костного мозга < 5%; отсутствие бластов с тельцами Ауэра; отсутствие экстрамедуллярного заболевания; абсолютное количество нейтрофилов > $1 \times 10^9/L$ (1000/мкл); количество тромбоцитов > $100 \times 10^9/л$ (100000/мкл); независимость переливания эритроцитов
CR с неполным восстановлением (CRi)	Все критерии CR за исключением остаточной нейтропении (< $1 \times 10^9/л$ [1000/мкл]) или тромбоцитопении (< $100 \times 10^9/л$ [100000/мкл])
Морфологическое состояние без лейкоза (MLFS)	Бласты костного мозга < 5%; отсутствие бластов с тельцами Ауэра; отсутствие экстрамедуллярного заболевания; нет требуемого гематологического восстановления
Частичная ремиссия (PR)	Относится только к фазе I и II клинических испытаний; все гематологические критерии CR; снижение процента бластов костного мозга до 5–25%; и снижение процента бластов
	костного мозга перед лечением, по меньшей мере, на 50%
Неудачное лечение	
Устойчивое заболевание (RD)	Неспособность достичь CR или CRi (общая практика; испытания фазы II/III) или неспособность достичь CR, CRi или PR (испытания фазы I); включает только пациентов, выживших > 7 дней после завершения начального лечения, с признаками персистирующего лейкоза при анализе крови и/или костного мозга
Смерть в результате аплазии	Случаи смерти > 7 дней после завершения первоначального лечения при цитопении; с апластическим или гипопластическим костным мозгом, полученным в течение 7 дней после смерти, без признаков персистирующего лейкоза
Смерть по неопределенной причине	Смерть наступает до завершения терапии или < 7 дней после ее завершения; или смерти, произошедшие > 7 дней после завершения
Рецидив	Бласты костного мозга > 5%; или повторное появление бластов в крови; или развитие экстрамедуллярного заболевания

\* Все критерии должны быть выполнены; оценка костного мозга должна основываться на подсчете 200 ядродержащих клеток в аспирате со спикулами; если неоднозначно, рассмотрите повторное исследование через 5-7 дней; оценка проточной цитометрии может помочь различить между персистирующим лейкозом и регенерирующимся нормальным костным мозгом; биопсия костного мозга должна выполняться в случаях сухой пункции или при отсутствии спикул; минимальная продолжительность ответа не требуется.

Концентрации ARGX-110 в сыворотке крови анализировали с использованием проверенного мето-

да иммуноферментного анализа (ИФА). Оценивали следующие фармакокинетические параметры:

$C_{max}$ : максимальная наблюдаемая концентрация;  $C_{ост}$ : остаточная концентрации;

$AUC_{\infty}$ : площадь под кривой концентрация-время в сыворотке от нуля до бесконечности;

$AUC_{tau}$ : площадь под кривой сывороточная концентрация-время в течение интервала дозирования;

$V_d$ : кажущийся объем распределения;

CL: общий системный клиренс препарата после внутривенного введения;  $t_{1/2}$ : период полужизни.

У всех пациентов исследования были взяты образцы венозной крови для оценки антител против лекарственных средств (ADA). Иммуногенность ARGX-110 оценивали в образцах сыворотки, используя метод ИФА, который может обнаружить любой класс ADA. Реактивные образцы были проанализированы в подтверждающем анализе для проверки специфичности.

Оценка биомаркеров может быть выполнена на аспиратах костного мозга и/или цельной крови, собранной в моменты времени, как указано на фиг. 5. Фармакодинамику исследовали путем измерения ряда биомаркеров, включая следующие:

Молекулярная генетика: характеристика метилирования промоторов CD70 и CD11a, выявление повторяющихся геномных aberrаций AML, а также анализ геномной ДНК воздействия лечения на заболевание и патологию-мишень.

Экспрессия генов: характеристика уровней мРНК CD70, маркеры болезни и лекарственного эффекта.

Проточная цитометрия (FACS): дополнительная характеристика CD70 (например, лечение до ARGX-110, пострецидив) и экспрессии CD27, а также влияние лекарственного средства (например, blasts, NK и T-клетки) и анализ минимального остаточного заболевания (MRD).

Количественное определение сывороточного белка: дополнительная характеристика sCD27, маркеры болезни и лекарственного эффекта (например, IL-8). Если связанные с инфузией реакции являются более серьезными, чем в более ранних испытаниях ARGX-110, то может быть выполнен анализ воспалительных цитокинов.

Определение стволовости проводили на мононуклеарных клетках, очищенных из крови или костного мозга. В зависимости от количества собранных клеток анализ данных включал окрашивание Numb (для определения соотношения асимметричного/симметричного деления), исследования на клетках и *in vivo* (оценка потенциала стволовых клеток, например, с помощью анализа CFU колонии с метилцеллюлозой или исследований выживания мышей NSG, которым инъецировали мононуклеарные клетки пациента) или анализ экспрессии генов.

Оценки минимального остаточного заболевания (MRD) были выполнены на аспиратах костного мозга и/или цельной крови, собранной в моменты времени, как указано на фиг. 5. Проточная цитометрия была использована в качестве основного метода анализа MRD. Подходящие маркеры проточной цитометрии для оценки MRD и определения подтипа AML включают CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b, CD10, HLA-DR, CD45, CD35, CD64, IREM-2, CD36, CD105, CD14, CD33, CD71, CD36, CD105, CD33, CD71, cTdT, CD56, CD7, CD19, cMPO, cЛактоферрин, cЛизоцим. В качестве части исследования использовалась дополнительная панель, посвященная экспрессии CD70, CD27, а также маркерам, указывающим на потенциал стволовых клеток или миелоидную дифференцировку: CD27, CD70, CD34, CD117, CD11b, HLA-DR, CD45, CD38 и CD123. Когда это возможно, результаты проточной цитометрии сравнивали с другими молекулярными подходами, такими как тест полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Аспираты костного мозга или цельная кровь могут быть использованы для иммунофенотипирования (выполненного с помощью проточной цитометрии или массовой цитометрии), которое включает анализ NK-клеток и T-клеток, а также других потенциальных субпопуляций иммунных клеток.

## Результаты

### Общие клинические результаты

Примечательно, что более 90% пациентов, привлеченных к участию в исследовании, ответили на терапию антителом против CD70 (10/11 пациентов, которых лечили в течение времени, достаточного для оценки ответа).

Табл. 4 показывает лучший ответ тех пациентов, у которых было достаточно времени, чтобы оценить ответ. В каждой из групп 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг 2 из 3 пациентов в каждой когорте показали полную ремиссию. В когорте 1 третий пациент достиг полной ремиссии с неполным гематологическим выздоровлением.

Уровень ответа, превышающий 90%, резко контрастирует с показателем ответа приблизительно 25%, наблюдаемым для аза индивидуально (Dombret et al. Blood 2015 (Blood. 2015; 126 (3): 291-299, включено в настоящее описание в качестве ссылки).

Таблица 4

	Риск	Лучший ответ к настоящему моменту	Время лучшего ответа
Когорта 1 (1мг/кг)	Неблагоприятный	CRi	C5D1
	Промежуточный	CR	EOT
	Неблагоприятный	CR	C7D1
Когорта 2 (3мг/кг)	Промежуточный	CR	C4D1
	Промежуточный	CR	C7D2
	Неблагоприятный	PR	EOT
Когорта 3 (10мг/кг)	Промежуточный	CR	C3D23
	Промежуточный	CR	C4D1
	Неблагоприятный	MLFS	C1D1
Когорта 4 (20мг/кг)	Неблагоприятный	CRi	C3D1
	Неблагоприятный	PR	C1D1
	Промежуточный	Нет ответа к настоящему времени	

Примечательно, что состояние без морфологического лейкоза (MLFS) было достигнуто после монотерапии одним ARGX-110. У 71-летнего пациента в когорте 2 с 20% бластов костного мозга при включении в исследование и у 74-летнего пациента в группе 3 с >50% бластов костного мозга при включении в исследование достигнут MLFS, характеризующийся отсутствием бластов к моменту времени C1D1 - т.е. после нагрузочной дозы с ARGX-110 и до первой дозы aza.

Это ясно демонстрирует, что терапия антителами против CD70 сама по себе может быть эффективным лечением AML.

Кроме того, полная ремиссия также была вызвана комбинированной терапией ARGX-110/aza. Шесть пациентов в каждой из когорт 1-4 достигли полной ремиссии после комбинированной терапии, а еще два пациента достигли CRi после комбинированной терапии.

Еще более важным является тот факт, что комбинированное лечение позволило одному пациенту перейти к пересадке костного мозга. Это важно потому, что многие пациенты с AML, особенно пожилые пациенты, обычно не могут перенести трансплантацию из-за агрессивного характера традиционных методов лечения, необходимых для соответствия критериям трансплантации. Тот факт, что комбинированное лечение было достаточно эффективным, чтобы позволить 75-летнему пациенту с AML прогрессировать до трансплантации, показывает преимущества комбинированной терапии по сравнению с традиционным лечением.

Моно- и комбинированная терапия уменьшают количество бластов в костном мозге и периферической крови.

Для каждого пациента количество бластов в костном мозге и периферической крови оценивалось в различные моменты времени, как показано на фиг. 5.

Для оценки бластов костного мозга были проанализированы аспираты костного мозга, взятые в различные моменты времени. Метилцеллюлозные анализы колоний с использованием FACS-отсортированных моноцитов (моноклеарные клетки (CD45<sup>dim</sup>) были селективно отсортированы путем исключения дублетов, мертвых клеток и лимфоцитов с использованием аннексина V и антитела к CD19 и CD4/CD8) использовались для оценки количества LSC в костном мозге. Кроме того, процентное содержание бластов в костном мозге также оценивалось с помощью морфологии клеток и анализа проточной цитометрией.

Результаты бластов костного мозга для каждого пациента показаны в сопоставлении на фиг. 6. Эти данные показывают, что для большинства пациентов процент бластов в костном мозге был по меньшей мере частично или полностью снижен на C1D1, то есть после монотерапии ARGX-110.

Кроме того, после начала аза-терапии (с C1D1) процент бластов костного мозга еще более уменьшался и поддерживался на низком уровне в течение оставшейся части лечения. Это имеет место независимо от того, используются ли цитоморфологические или проточные анализы бластов.

Особенно примечательно, что количество бластов костного мозга, измеренное в соответствии с критериями минимального остаточного заболевания (MRD), значительно снижается как при монотерапии ARGX-110, так и при комбинированной терапии ARGX-110 и аза, учитывая клиническую важность оценки MRD. Два пациента (один в когорте 1 и один в когорте 2) достигли статуса MRD.

Аналогичные результаты также наблюдаются при оценке процента бластов периферической крови (фиг. 7). Изменения в данных периферической крови пациента более восприимчивы к внешним факторам, что приводит к большему разбросу данных. Тем не менее, результаты периферической крови (PB)

соответствуют изменениям, наблюдаемым в костном мозге после моно- и комбинированной терапии (фиг. 7).

На фиг. 7 показано, что подобно данным для костного мозга процентная доля бластных клеток в целом снижается после монотерапии ARGX-110 (то есть при уровне C1D1 по сравнению с более ранними точками данных), а затем дополнительно снижается при комбинированной терапии (начиная с уровня C1D1 и далее). Опять же, этот эффект наблюдается независимо от того, используются ли цитоморфологические анализы бластов или на основе проточной цитометрии, и это очевидно при использовании критериев оценки MRD.

Таким образом, монотерапия антителами против CD70 и комбинация анти-CD70 плюс HMA, такие как aza, способны снизить процент бластов в костном мозге и периферической крови и, в случае комбинированной терапии, поддерживать этот сниженный процент в течение ряда временных точек.

#### **Моно- и комбинированная терапия усиливают миелоидную дифференцировку LSC**

Постоянство лейкозных стволовых клеток (LSC) при AML представляет собой значительное препятствие для успешного лечения пациентов с AML. LSC ответственны за рецидив заболевания при AML, и их количество поддерживается посредством процесса симметричного деления клеток, то есть каждая LSC делится симметрично с образованием двух дочерних LSC. Такое симметричное разделение является движущим фактором агрессивности AML и рецидивов у пациентов.

При альтернативном предопределении клеточной судьбы LSC должна подвергнуться миелоидной дифференцировке. В этом процессе LSC подвергается асимметричному делению, генерируя миелоидно-дифференцированную дочернюю клетку вместе с дочерней стволовой клеткой.

Такое асимметричное деление значительно уменьшает пул LSC у пациента, и увеличенное асимметричное деление указывает на улучшение реакции пациента.

Уровень асимметричного деления в популяции LSC можно определить путем измерения уровня детерминанты клеточной судьбы, такой как белок Numb (Riether et al. J Exp Med. 2017 Feb; 214(2): 359-380, включено в настоящее описание в качестве ссылки). Повышенная экспрессия Numb указывает на увеличение асимметричного деления и, следовательно, увеличение миелоидной дифференцировки и уменьшение популяций LSC.

На фиг. 8 показано, что экспрессия Numb увеличивается после монотерапии ARGX-110 (C1D1), а затем дополнительно увеличивается при комбинированной терапии ARGX-110/aza, что указывает на то, что обе терапии увеличивают асимметричное деление и, таким образом, миелоидную дифференцировку LSC.

Эти данные указывают на то, что не только монотерапия антителом против CD70 и комбинированная aza-терапия снижает количество бластов у пациентов путем модуляции пути CD70-CD27 (тем самым способствуя T-клеточной чувствительности), но и то, что антитело против CD70 также способствует дифференцировке LSC. Эта дифференцировка уменьшает популяцию стволовых клеток и, таким образом, способствует снижению количества бластов, наблюдаемых у пациентов, участвовавших в исследовании.

#### **Монотерапия и комбинированная терапия уменьшают образование колоний ex vivo**

Для дальнейшего изучения влияния моно- и комбинированной терапии на популяции LSC у пациентов были проведены анализы колоний на метилцеллюлозе с использованием FACS-отсортированных моноцитов ex vivo. Мононуклеарные клетки (CD45<sup>DIM</sup>) были выборочно отсортированы путем исключения дублетов, мертвых клеток и лимфоцитов с использованием аннексина V и антитела к CD19 и CD4/CD8 и последовательного высевания на метилцеллюлозу в течение 14 дней.

На фиг. 9A-E представлены репрезентативные данные для формирования колонии на лунку (и, следовательно, количество LSC) до лечения (SCR) и после монотерапии ARGX-110 (момент времени 0, соответствующий C1D1)

На фиг. 9F представлены репрезентативные данные для формирования колонии на лунку (и, следовательно, количество LSC) до лечения, после монотерапии ARGX-110 (то есть при C1D1) и после комбинированной терапии (C4D1). Эти данные соответствуют примерно 24-кратному снижению частоты встречаемости LSC по сравнению с базовыми уровнями.

Кроме того, терапия не только уменьшает количество LSC, но также уменьшается количество клеток в колонии, что указывает на то, что пролиферативный потенциал LSC также уменьшается после терапии (данные не показаны).

Опять же, эти данные демонстрируют, что уровень циркулирующих LSC снижаются после монотерапии ARGX-110, а затем снижается еще больше после комбинации ARGX-110 и aza. Кроме того, пролиферативный потенциал этих LSC также снижается при терапии.

#### **Монотерапия и комбинированная терапия снижают уровень растворимого CD27**

Растворимый CD27 (sCD27) может служить биомаркером для степени взаимодействия CD70/CD27. Считается, что опосредованная CD70/CD27 передача сигналов способствует aberrантному делению клеток, а высокий уровень sCD27 в сыворотке коррелирует с плохим прогнозом у пациентов с AML. Кроме того, sCD27, как полагают, коррелирует с процентом бластных клеток в костном мозге, а также служит маркером стволовости бластов пациента, с повышенным уровнем sCD27, указывающим на повышенный

уровень стволовости (Riether et al. J. Exp. Med. 2017 Feb;214(2):359-380).

Для оценки влияния монотерапии антителом против CD70 и комбинированной терапии на взаимодействие CD27/CD70, а также для дальнейшего изучения влияния на процент бластов и стволовость был также измерен уровень растворимого CD27 у пациентов.

На фиг. 10 показаны типичные уровни sCD27 для пациента во время цикла лечения. Монотерапия ARGX-110 (C1D1) снижает уровни sCD27 по сравнению с уровнем до лечения ("Загрузка"), и это снижение продолжает усиливаться во время комбинированной терапии, так что оно достигает уровней, характерных для здорового пациента.

Эти данные демонстрируют, что как моно-, так и комбинированная терапия ингибируют взаимодействие CD27/CD70 и снижают процент бластов и стволовость в соответствии с результатами других анализов.

Кроме того, на фиг. 10 показано, что уровни sCD27 повышаются после завершения терапии (EOT). Это, вероятно, обусловлено увеличением взаимодействия CD27/CD70 после удаления антитела против CD70 и указывает на то, что sCD27 можно использовать в качестве эффективного маркера рекрутирования лекарственного средства против CD70 у пациента.

#### ARGX-110 терапия не повышает токсичность

Существенным фактором в пригодности терапевтического режима является связанная с ним токсичность для пациента. Преимущественно антитело против CD70, ARGX-110, не приводило к какому-либо наблюдаемому увеличению токсичности ни в качестве монотерапии, ни при использовании в комбинации с aza.

Для каждой из когорт 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг неблагоприятные события и гематологическая токсичность не отличались от таковых, отражающих обычный профиль безопасности азациитидина. Это особенно удивительно и выгодно, поскольку добавление комбинированного терапевтического агента часто приводит к увеличению токсичности. Однако с комбинацией ARGX-110/aza не наблюдалось увеличения токсичности и вызывалось значительное увеличение эффективности.

Таблица 5

Степень 3–5 нежелательных явлений У пациентов в Фазе 1	Когорта 1 (1мг/кг) Явления (пациенты)	Когорта 2 (3мг/кг) Явления (пациенты)	Когорта 3 (10мг/кг) Явления (пациенты)	Когорта 4 (20мг/кг) Явления (пациенты)	Всего
Анемия	4 (1)	10 (3)		2 (1)	16
Тромбоцитопения	8 (2)	3 (3)	2 (1)	2 (2)	15
Нейтропения	2 (1)	4 (1)			6
Фебрильная нейтропения	2 (2)		1 (1)	1(1)	4
Гипертензия		2 (1)			2
Проктит		2 (1)			2
Лейкопения	1 (1)	1 (1)			1
Инфекция легких	1 (1)				1
Плевро–перикардит	1 (1)				1
Констипация		1 (1)			1
Лихорадка		1 (1)			1
Гипокалиемиа		1 (1)			1
Инфекция зуба		1 (1)			1
Прогрессия заболевания			1(1)		1

#### Фармакокинетические (ПК) данные

Концентрацию ARGX-110 в сыворотке анализировали с использованием утвержденного метода иммуноферментного анализа (ИФА). На фиг. 11 представлены индивидуальные графики ПК пациента для когорты 10 мг/кг. График ПК представляет данные для цикла 1 ARGX-110 (предварительная доза D-14 до предварительной дозы 1 цикла D1).

В целом, фармакокинетика ARGX-110 показала пропорциональность дозы C<sub>max</sub> и AUC в исследованном диапазоне доз и период полужизни приблизительно 9,2 дня при 10 мг/кг.

Концентрацию ARGX-110 в аспиратах костного мозга измеряли в ограниченных образцах и сравнивали с соответствующими образцами плазмы. Концентрация ARGX-110 в аспиратах костного мозга была сопоставима с уровнями в плазме для пациентов 1001005 и 1001007 в дозовой когорте 3 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно.

Таблица 6

Пациент	Когорта дозы	Образец	C <sub>ARGX-110</sub> BM аспират	C <sub>ARGX-110</sub> плазма
1001005	3 мг/кг	Цикл 7 День 2	33,1 мкг/мл	37,3 мкг/мл
1001007	10 мг/кг	Цикл 4 День 1	117,7 мкг/мл	126,6 мкг/мл

**Характеристики пациентов и исследование частных случаев**

В табл. 7 представлены сводные данные о вновь диагностированных пациентах с AML, набранных в каждую когорту.

Таблица 7

Характеристика пациента	1 мг/кг	3 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг	Всего
Средний возраст (диапазон)	78 (71–80)	75 (71–84)	71 (64–75)	75 (72–77)	74 (64–84)
Пол (Мужчины : Женщины)	2:1	1:2	2:1	2:1	7:5
<b>Риск (ELN 2017)</b>					
Промежуточный	1	2	2	1	6
Серьезный	2	1	1	2	6
Бласты костного мозга Медиана % (диапазон)	51,3 (24–90)	40 (20–60)	70 (50–80)	50 (22–80)	52,7 (20–90)
<b>Классификация AML (ВОЗ 2016)</b>					
NOS	0	1	3	0	4
С изменениями, связанными с миеلودисплазией	2	2	0	2	6
Связанный с терапией миелоидное новообразование	1	0	0	0	1
Рецидивирующие генетические аномалии	0	0	0	1	1
Франко–американо–британская классификация	M4, M1, M2	M4, M5, M2	M1, M2, M5a	M2, M2, M4	

Ниже приведены примеры отдельных пациентов, привлеченных к участию в испытании.

Пациент 1001001 - 80-летняя женщина с AML, связанным с терапией, через 5 лет после адъювантной химиотерапии при раке молочной железы с бластными показателями 90% в костном мозге (BM) и 80% в периферической крови (PB) (39,5 г/л), FAB подтип: миеломоноцитарный M4 и классификация ВОЗ 2016 года: временная подгруппа: AML с мутированным RUNX1. Пациент лечился в соответствии с протоколом в группе терапии 1 мг/кг.

Аспират костного мозга, взятый в 1-й день, сравнивали с аспирином костного мозга, взятым до введения нагрузки ARGX-110. Метилцеллюлозные анализы колоний с использованием FACS-отсортированных моноцитов (моноклеарные клетки (CD45<sup>dim</sup>)) были выборочно отсортированы путем исключения дублетов, мертвых клеток и лимфоцитов с использованием аннексина V и антитела к CD19 и CD4/CD8) использовались для оценки количества LSC в костном мозге.

Результаты показали, что однократная доза ARGX-110 снижала количество LSC в костном мозге в 140000 раз (расчет частоты стволовых клеток с помощью ELDA: анализ предельного разведения (<http://bioinf.wehi.edu.au>; Ни & Smyth (2009) ELDA: Journal of Immunological Methods 347, 70-78.).

Кроме того, клеточный морфологический и проточный цитометрический анализ популяций бластных клеток продемонстрировал снижение количества бластов костного мозга и периферической крови после однократного введения (нагрузочная доза) ARGX-110. После продолжения лечения в комбинации с AZA в соответствии с графиком на фиг. 5, бласты BM снизились до 2,8% (согласно проточной цитометрии) к C3D1 (то есть после 2 циклов лечения). Таким образом, оценка клинического ответа пациента в этот момент времени соответствовала полной ремиссии с неполным выздоровлением (CRi). Минимальное остаточное заболевание (MRD) было определено как 0,2%. Статус CRi по аспирату костного мозга и по оценке MRD поддерживался, по крайней мере, до C5D1. В периферической крови бласты вывелись после первого полного цикла лечения (C2D1). К C3D1 MRD для периферической крови составлял 0,3%, а к C4D1 процент бластов периферической крови составлял 0,8% бластов по проточной цитометрии и 0% по морфологии клеток. К C4D17 количество бластных клеток в периферической крови было достаточно низким, чтобы классифицировать его как MRD-отрицательное.

Пациент 1001002 - это 75-летний мужчина с AML с изменениями, связанными с миеلودисплазией (классификация ВОЗ; M1/M2 AML в соответствии с классификацией FAB). Пациент продемонстрировал 40% бластов костного мозга до лечения. Пациент лечился в соответствии с протоколом в группе терапии

1 мг/кг.

Аспират костного мозга, взятый на 1-й день, сравнивали с аспирином костного мозга, взятым до введения нагрузки ARGX-110, и оценивали с использованием анализа колонии на метилцеллюлозе на моноцитах. Подобно пациенту 1001001, однократная монотерапия ARGX-110 снижала количество LSC в костном мозге. У пациента 1001002 количество LSC было снижено в 2 раза после нагрузочной дозы ARGX-110. Образование колоний снижалось более чем на 50% при всех информативных последовательных разведениях концентрации, и количество клеток в колонии также уменьшалось.

После однократной дозы ARGX-110 процент общих бластов в костном мозге, по-видимому, снижался при оценке методом проточной цитометрии, но при оценке по морфологии клеток наблюдалось увеличение.

Аналогично пациенту 1001001, общий процент бластов в периферической крови снизился после нагрузочной дозы ARGX-110 (C1D1 против скрининга) и продолжал снижаться в течение цикла 1, приближаясь к нулю к концу цикла 1 (C2D1). К C2D17 процент бластов в периферической крови составил 0,8% по проточной цитометрии и 0% по морфологии клеток. После 3 циклов (C3D17) показатели периферической крови восстановились (Hb 10,2 г/дл; тромбоциты 128 г/л; абсолютное количество нейтрофилов (ANC) 0,97 г/л) и анализ костного мозга к C4D1 показал CRi.

Пациент 1001003 - это 77-летний мужчина с AML с изменениями, связанными с миелодисплазией, по классификации ВОЗ (AML-M2 по классификации FAC) и 24% бластов костного мозга. К 1 циклу (C2D1) у пациента не было периферических бластов, и он восстанавливался после кратковременной тромбоцитопении и лимфопении (тромбоциты 98 г/л; ANC 0,38 г/л; Hb 9,2 г/дл). Процент бластов к C1D1 был стабильным.

Данные этих пациентов показывают, что монотерапия антителом против CD70 (ARGX-110) снижает количество лейкозных стволовых клеток в костном мозге пациентов с AML и может снизить общий процент бластов в костном мозге и в периферической крови. Комбинированная терапия антителом против CD70 (ARGX-110) и нуклеозидным метаболическим ингибитором (азациитидином) дополнительно снижает общий процент бластов в костном мозге и периферической крови до такой степени, что пациент может быть классифицирован как свободный от минимального остаточного заболевания, результат, который обычно не наблюдается при использовании только азациитидина.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения процента бластов в костном мозге и/или периферической крови пациента с AML или MDS, где способ включает введение пациенту одной или более терапевтически эффективных доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент являются полностью или частично дефукозилированными.

2. Способ подготовки пациента с AML или MDS для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), включающий введение пациенту одной или более доз антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент являются полностью или частично дефукозилированными.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ снижает процент бластов в костном мозге пациента.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ снижает процент бластов в периферической крови пациента.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 0,1 до 25 мг/кг на дозу.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 1 до 20 мг/кг на дозу.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 10 мг/кг.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где каждая доза антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента отстоит от другой на 10-20 дней, необязательно 12-18 дней, необязательно 14-17 дней.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий введение пациенту нуклеозидного метаболического ингибитора.

10. Способ по п.9, где нуклеозидный метаболический ингибитор представляет собой гипометилирующий агент, необязательно азациитидин или децитабин.

11. Способ по п.9 или 10, где нуклеозидный метаболический ингибитор представляет собой азациитидин.

12. Способ по любому из пп.9-11, где нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в дозе в диапазоне 50-100 мг/м<sup>2</sup> в день.

13. Способ по любому из пп.9-12, где нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в период дозирования суточной дозы в течение 5-9 дней.

14. Способ по п.13, где нуклеозидный метаболический ингибитор вводят в соответствии с режимом дозирования повторяющихся периодов дозирования, где конец одного периода дозирования и начало следующего периода дозирования отстоят на 18-25 дней.

15. Способ по любому из пп.9-14, где первую дозу нуклеозидного метаболического ингибитора вводят через 7-21 день после первой дозы антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

16. Способ по любому из пп.9-15, где одну из суточных доз нуклеозидного метаболического ингибитора вводят в тот же день, что и дозу антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента.

17. Способ по любому из пп.9-16, где способ включает:

i) первую стадию, включающую введение антитела против CD70 и нуклеозидного метаболического ингибитора по любому из пп.9-16, и

ii) вторую стадию, включающую введение антитела против CD70 по любому из пп.1-8 и введение нуклеозидного метаболического ингибитора в более низкой дозе, чем доза нуклеозидного метаболического ингибитора, вводимого на первой стадии.

18. Способ по любому из предыдущих пунктов, где пациенту не подходит стандартная интенсивная химиотерапия перед лечением.

19. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий стадию проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

20. Способ по любому из предыдущих пунктов, где возраст пациента составляет 60 лет или старше, необязательно 75 лет или старше.

21. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий введение пациенту одного или более из активных агентов, выбранных из антитела против CD33, антитела против CD123, ингибитора E-селектина, ингибитора FLT3, ингибитора циклинзависимой киназы, ингибитора BCL-2, ингибитора аминокептидазы и ингибитора JAK/STAT.

22. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий мониторинг количества бластов у пациента.

23. Способ по любому из предыдущих пунктов, который индуцирует частичный ответ (PR), полный ответ с неполным гематологическим восстановлением (CRi) или полный ответ (CR).

24. Способ по любому из предыдущих пунктов, который индуцирует минимальное остаточное болезненное состояние, которое является отрицательным.

25. Способ по любому из предыдущих пунктов, который увеличивает выживаемость по сравнению со стандартными терапевтическими агентами, которые подходили бы пациенту.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют связывание CD70-CD27.

27. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент истощают клетки, экспрессирующие CD70.

28. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат CDR: HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (DAGYSNHVPIFDS); HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (DINNEGTTYYADSVKG); HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1 (VYYMN); LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ALFISNPSVE);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (NTNTRHS), и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5 (GLKSGSVTSDNFPT).

29. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, который по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 4 и/или содержит домен VL, который по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 8.

30. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 представляет собой антитело IgG1.

31. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело против CD70 представляет собой ARGX-110.

32. Применение антитела против CD70 в способе по любому из предыдущих пунктов.

33. Применение фармацевтической композиции в способе по любому из предыдущих пунктов, где фармацевтическая композиция содержит антитело против CD70 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

34. Применение антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения AML, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с гипометилирующим агентом где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент являются полностью или частично дефукозилированными.

35. Применение по п.34, где гипометилирующий агент является азациитидином.

36. Применение по любому из пп.32-35, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание CD70-CD27.

37. Применение по любому из пп.32-36, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент истощает клетки, экспрессирующие CD70.

38. Применение по любому из пп.32-37, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат CDR:

- HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (DAGYSNHVPIFDS);
- HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (DINNEGTTYYADSVKG);
- HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1 (VYYMN);
- LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ALFISNPSVE);
- LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (NTNTRHS), и
- LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5 (GLKSGSVTSDNFPT).

39. Применение по любому из пп.32-38, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, который по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 4 и/или содержит домен VL, который по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 8.

40. Применение по любому из пп.32-39, где антитело против CD70 представляет собой антитело IgG1.

41. Применение по любому из пп.32-40, где антитело против CD70 представляет собой ARGX-110.

42. Комбинация для лечения AML и MDS, содержащая антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент и нуклеозидный метаболический ингибитор (NMI), где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент являются полностью или частично дефукозилированными.

43. Комбинация по п.42, где NMI представляет собой гипометилирующий агент.

44. Комбинация по п.43, где гипометилирующий агент представляет собой азациитидин.

45. Комбинация по любому из пп.42-44, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание CD70-CD27.

46. Комбинация по любому из пп.42-45, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент истощает клетки, экспрессирующие CD70.

47. Комбинация по любому из пп.42-46, где антитело против CD70 содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат CDR:

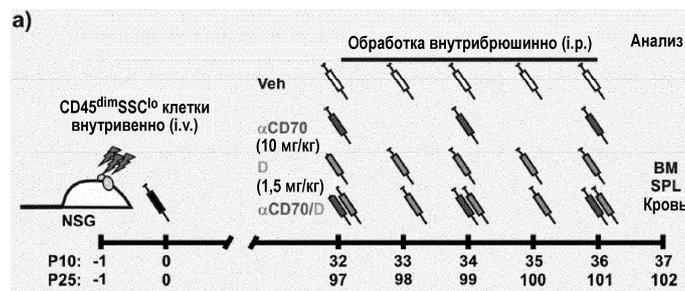
- HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (DAGYSNHVPIFDS);
- HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (DINNEGTTYYADSVKG);
- HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1 (VYYMN);
- LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ALFISNPSVE);
- LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (NTNTRHS), и
- LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 5 (GLKSGSVTSDNFPT).

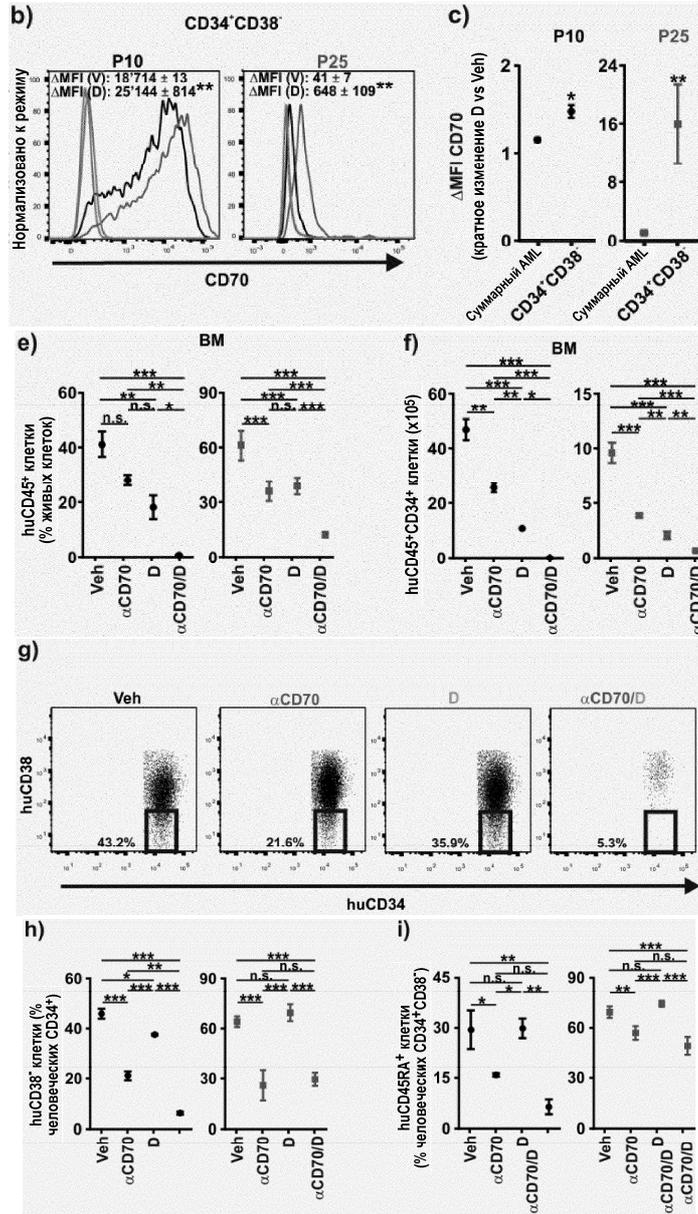
48. Комбинация по любому из пп.42-47, где антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, по меньшей мере на 80% идентичный SEQ ID NO: 4, и/или содержит домен VL, по меньшей мере на 80% идентичный SEQ ID NO: 8.

49. Комбинация по любому из пп.42-48, где антитело против CD70 представляет собой антитело IgG1.

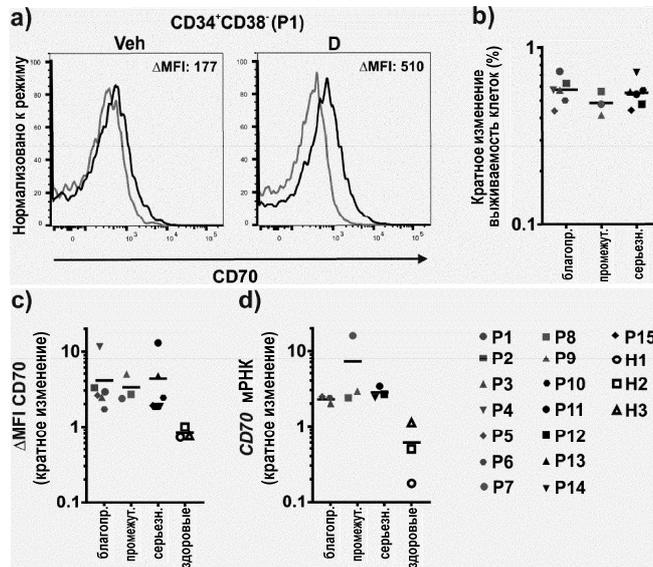
50. Комбинация по любому из пп.42-49, где антитело против CD70 представляет собой ARGX-110.

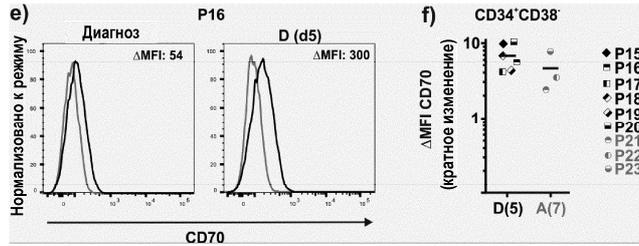
51. Применение комбинации по любому из пп.42-50 в способе по любому из пп.1-31.



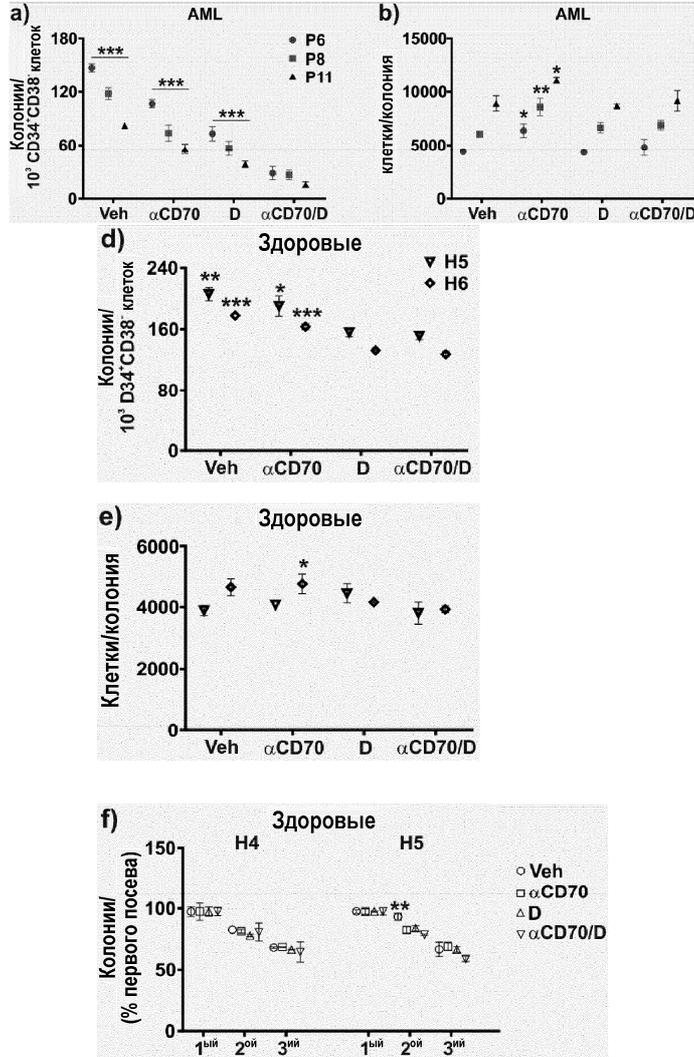


Фиг. 1

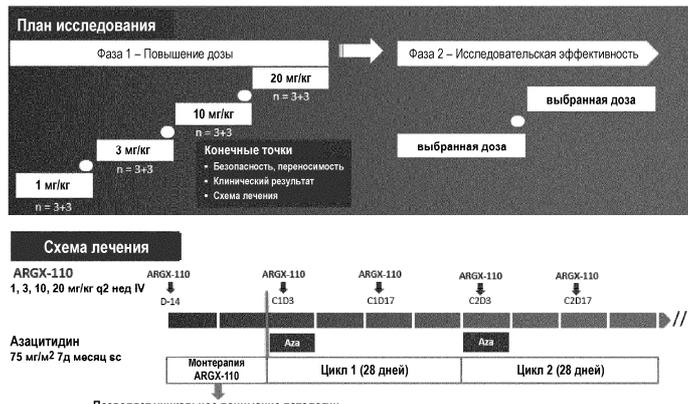




Фиг. 2



Фиг. 3

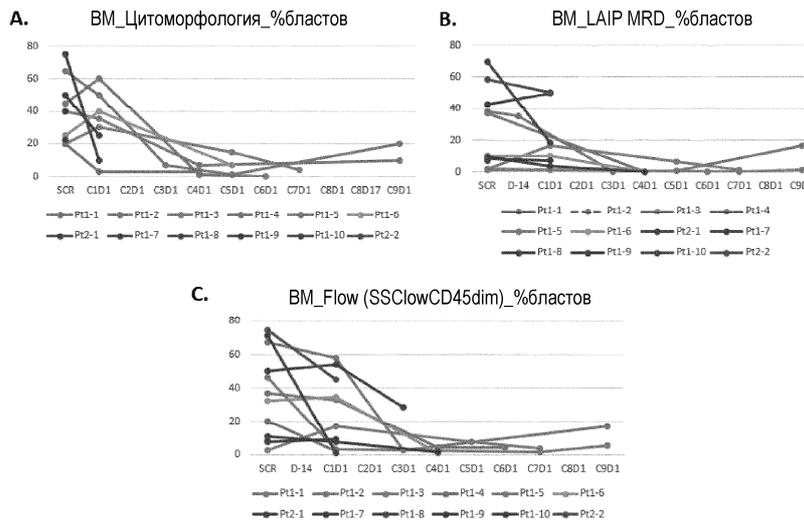


Фиг. 4

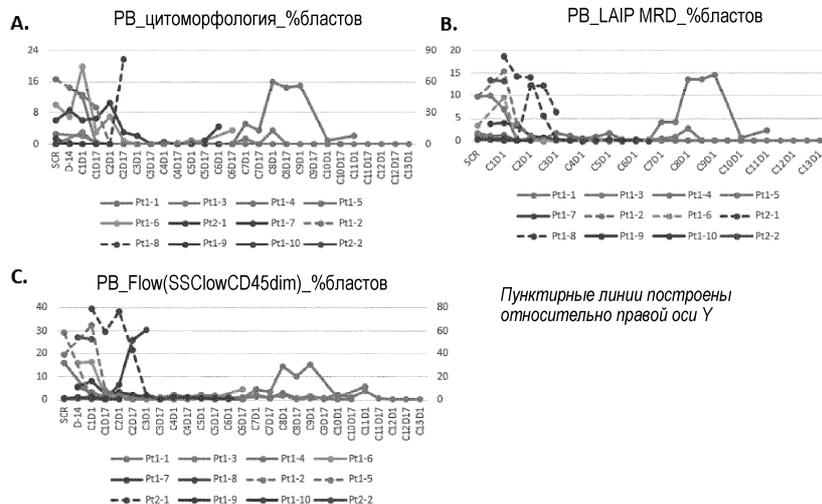
Footnotes are shown on the next page

Процедуры	Фаза скрининга	Загрузочная доза	Открытая фаза терапии							Визит после завершения терапии (ЕОТ)	Фаза наблюдения	
	В интервале между днями -35 до -14		День -14	Цикл 1 день 1 ±2 дня	Цикл 1 день 3	Цикл 1 день 7	Цикл 1 день 17 ±3 дня	Цикл 2 день 1-7 ±7 дней	Цикл 2 день 17 ±3 дня			Цикл ≥3 день 1-7 ±7 дней
<b>Введение исследуемого лекарственного средства</b>												
ARGX-110		X		X		X	X (D3)	X	X (D3)	X		
Азацитидин				X (D 1-7)								
<b>Забор образцов крови для анализов фармакокинетики и иммуногенности</b>												
Фармакокинетика <sup>b) i)</sup>		Пре- & 0 ч, 2 ч, 24 ч D-10	Пре-AZA	Пре-AZA & Пост-ARGX (0 ч, 2 ч, 24 ч)	Пре-AZA	Пре-ARGX & Пост (0 ч)	Д3: Пре-AZA & Пост-ARGX (0 ч)	Пре-ARGX & Пост (0 ч)	Д3: Пре-AZA & Пост-ARGX (0 ч)	Пре-ARGX & Пост (0 ч)	X	X
Иммуногенность/ADA <sup>ii)</sup>		Пре-		Пре-AZA		Пре-ARGX	Д3: Пре-AZA	Пре-	Д3: Пре-AZA	Пре-	X	X
<b>Забор образцов крови для оценки заболевания и биомаркеров</b>												
Молекулярная генетика <sup>d)</sup>		Пре-	Пре-				D1, Пре-		C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	X
Экспрессия генов <sup>e)</sup>		Пре-	Пре-				D1, Пре-		C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	X
Проточная цитометрия <sup>f)</sup>		Пре-	Пре-				D1, Пре-		C <sub>0</sub> ±D1, Пре- f)		X	
Колич. оценка сывороточного белка <sup>g)</sup>		Пре-	Пре-				D1, Пре-		C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	X
Определение стволовости <sup>h)</sup>	X		Пре-								X	
<b>Забор костного мозга (BM) для анализов фармакокинетики, иммуногенности и для оценки заболевания и биомаркеров</b>												
	В интервале между днями -35 до -14	День -14	Оценка ответа, монотерапия (C1D1 пре-AZA) <sup>k)</sup>				Оценка ответа, комбинотерапия <sup>l)</sup> (C <sub>0</sub> ±D1: каждый нечетный цикл D1 до CR/CRi; пре-AZA)			В течение 7 дней после ЕОТ <sup>o)</sup>	30±60 дней после ЕОТ ±7 дней	
Аспират костного мозга/ биопсия <sup>j)</sup>	X			X					C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	
Молекулярная генетика <sup>d)</sup>	X			X					C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	
Экспрессия генов <sup>e)</sup>	X			X					C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	
Проточная цитометрия <sup>f)</sup>	X			X					C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	
Определение стволовости <sup>h)</sup>	X			X					C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	
Фармакокинетика <sup>i)</sup>	X			X					C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	
Иммуногенность/ADA <sup>ii)</sup>	X			X					C <sub>0</sub> ±D1, Пре-		X	

Фиг. 5

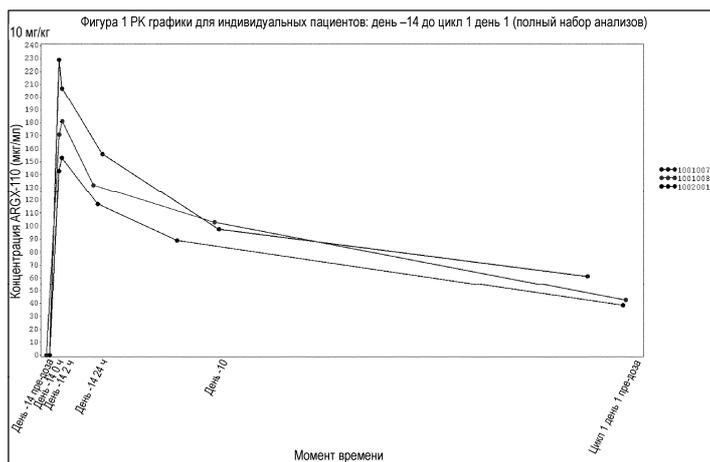


Фиг. 6



Фиг. 7





Фиг. 11

