

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045608**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.11**

**(21)** Номер заявки  
**202091714**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.01.16**

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

---

**(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ CD70**

---

**(31)** 1800649.4

**(32)** 2018.01.16

**(33)** GB

**(43)** 2020.10.15

**(86)** PCT/EP2019/051058

**(87)** WO 2019/141732 2019.07.25

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АРДЖЕНКС БВБА (BE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ван Ромпай Люк, Мошир Махан,  
Заброцкий Пётр, Делаэ Тим (BE)**

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

**(56)** WO-A2-2017079116  
WO-A2-2015138600  
WO-A1-2017021354  
US-A1-2008025989  
WO-A1-2017134140  
WO-A2-2007146968

NAN GUO RING ET AL.: "Anti-SIRP[alpha] antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 20 November 2017 (2017-11-20), XP055429669, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1710877114, the whole document, page 3, left-hand column, last paragraph; figure 4d, page 3, right-hand column, last paragraph - page 4, right-hand column, paragraph 1

WEI SHAO ET AL.: "Combination of monoclonal antibodies with DST inhibits accelerated rejection mediated by memory T cells to induce long-lived heart allograft acceptance in mice", IMMUNOLOGY LETTERS, ELSEVIER BV, NL, vol. 138, no. 2, 27 March 2011 (2011-03-27), pages 122-128, XP028231973, ISSN: 0165-2478, DOI: 10.1016/J.IMLET.2011.03.009 [retrieved on 2011-04-06] paragraph [03.2] - paragraph [03.3]; table 1

---

**(57)** Изобретение относится к комбинированной терапии с использованием молекулы антитела, которая связывается с CD70, для лечения злокачественного заболевания. Кроме комбинации, содержащей указанную молекулу, заявлены применение и способы лечения указанной комбинации.

---

**B1**

**045608**

**045608  
B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для лечения злокачественного заболевания, в частности миелоидного злокачественного заболевания, такого как острый миелоидный лейкоз (AML). Комбинированные терапии могут включать молекулу антитела, которая связывается с CD70, и по меньшей мере одну молекулу антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке. Предпочтительными мишенями на лейкозной стволовой клетке являются TIM-3, IL1R3/IL1RAP и CD47. Альтернативно или в дополнение, комбинированные терапии могут включать молекулу антитела, которая связывается с CD70, и средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ . Комбинированные терапии также могут включать дополнительное противораковое средство, например средство, используемое для лечения AML, такое как азацитидин или децитабин.

### Предпосылки создания изобретения

В последние годы разработка новых методов лечения рака была сосредоточена на молекулярных мишенях, особенно на белках, вовлеченных в прогрессирование рака. Перечень молекулярных мишеней, вовлеченных в рост опухоли, инвазию и метастазирование, продолжает расширяться и включает белки, сверхэкспрессируемые опухолевыми клетками, а также мишени, связанные с системами, поддерживающими рост опухоли, такими как сосудистая сеть и иммунная система. Число терапевтических или противораковых средств, предназначенных для взаимодействия с этими молекулярными мишенями, также продолжает увеличиваться, и в настоящее время большое количество противораковых лекарств направленного действия одобрено для клинического применения, и многие другие находятся на стадии разработки.

Иммунотерапия является подходом к лечению рака, вызывающим особенный интерес. Эта форма терапии направлена на то, чтобы использовать возможности собственной иммунной системы организма для контроля роста опухоли. Иммунная система очень сложна, включая множество различных типов клеток, и у здоровых людей эти различные клеточные популяции находятся под жестким контролем. Во время развития рака в опухолях обычно формируются пути, позволяющие избежать обнаружения и элиминации иммунной системой хозяина, например, путем подавления активаторов природных киллерных клеток (NK), снижения экспрессии белков MHC класса I опухолевыми клетками, иммунологической T-клеточной толерантности и/или повышенной регуляции иммуносупрессорных регуляторных T-клеток (или Tregs). Иммунотерапия направлена на реверсию иммуносупрессивного опухолевого окружения, помогая таким образом организму установить эффективный противоопухолевый ответ.

CD70 идентифицирован как молекулярная мишень, представляющая особый интерес благодаря его конститутивной экспрессии на многих типах гематологических злокачественных новообразований и солидных карцином (Junker et al. (2005) *J. Urol.* 173:2150-3; Sloan et al. (2004) *Am. J. Pathol.* 164:315-23; Held-Feindt and Mentlein (2002) *Int J Cancer* 98:352-6; Hishima et al. (2000) *Am J. Surg Pathol.* 24:742-6; Lens et al. (1999) *Br J. Haematol.* 106: 491-503; Boursalian et al. (2009) *Adv Exp Med Biol.* 647:108-119; Wajant H. (2016) *Expert Opin Ther Targets* 20 (8):959-973). CD70 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, принадлежащий к суперсемейству факторов некроза опухолей (TNF), который опосредует свои эффекты посредством связывания с его родственным рецептором клеточной поверхности, CD27. Как CD70, так и CD27 экспрессируются множеством типов клеток иммунной системы, и сигнальный путь CD70-CD27 вовлечен в регуляцию нескольких различных аспектов иммунного ответа. Это отражается в том, что сверхэкспрессия CD70 происходит при различных аутоиммунных заболеваниях, включая ревматоидный и псориатический артрит и волчанку (Boursalian et al. (2009) *Adv Exp Med Biol.* 647:108-119; Han et al. (2005) *Lupus* 14 (8):598-606; Lee et al. (2007) *J. Immunol.* 179 (4): 2609-2615; Oelke et al. (2004) *Arthritis Rheum.* 50 (6): 1850-1860).

Экспрессию CD70 связывают с плохим прогнозом для некоторых видов рака, включая B-клеточную лимфому, почечно-клеточный рак и рак молочной железы (Bertrand et al. (2013), *Genes Chromosomes Cancer* 52 (8):764-774; Jilaveanu et al. (2012) *Hum Pathol.* 43 (9): 1394-1399; Petrau et al. (2014) *J. Cancer* 5 (9):761-764). Экспрессия CD70 также обнаружена на метастатической ткани в большом проценте случаев, что указывает на ключевую роль этой молекулы в прогрессировании рака (Jacobs et al. (2015) *Oncotarget* 6 (15):13462-13475). Конститутивную экспрессию CD70 и его рецептора CD27 на опухолевых клетках гематопоетической линии связывают с ролью сигнальной оси CD70-CD27 в прямой регуляции пролиферации и выживания опухолевых клеток (Goto et al. (2012) *Leuk Lymphoma* 53 (8): 1494-1500; Lens et al. (1999) *Br J. Haematol.* 106 (2); 491-503; Nilsson et al. (2005) *Exp Hematol.* 33 (12):1500-1507; van Doorn et al. (2004) *Cancer Res.* 64 (16):5578-5586).

Повышенная экспрессия CD70 на опухолях, в частности солидных опухолях, которые не коэкспрессируют CD27, также способствует иммуносупрессии в опухолевом микроокружении различными путями. Например, было показано, что связывание CD70 с CD27 на регуляторных T-клетках увеличивает частоту Tregs, уменьшает опухоль-специфические T-клеточные ответы и способствует росту опухоли у мышей (Claus et al. (2012) *Cancer Res.* 72(14):3664-3676). Передача сигналов CD70-CD27 также ослабляет иммунный ответ посредством опухоль-индуцируемого апоптоза T-лимфоцитов, как продемонстрировано в клетках почечно-клеточной карциномы, глиомы и глиобластомы (Chahlavi et al. (2005) *Cancer Res.* 65(12):5428-5438; Diegmann et al. (2006) *Neoplasia* 8(11):933-938; Wischusen et al. (2002) *Cancer Res*

62(9):2592-2599). Наконец, экспрессию CD70 также связывают с Т-клеточным истощением, в результате чего лимфоциты принимают более дефинитивный фенотип и становятся неспособными убивать опухолевые клетки (Wang et al. (2012) *Cancer Res* 72(23):6119-6129; Yang et al. (2014) *Leukemia* 28(9):1872-1884).

Учитывая важное значение CD70 в развитии рака, CD70 является привлекательной мишенью для противораковой терапии, и антитела, таргетирующие этот белок клеточной поверхности, находятся в стадии клинической разработки (Jacob et al. (2015) *Pharmacol Ther.* 155:1-10; Silence et al. (2014) *mAbs* 6(2):523-532).

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на комбинированную терапию, включающую молекулы антител, которые связываются с CD70. В комбинированной терапии по изобретению молекулу антитела, которая связывается с CD70, комбинируют с по меньшей мере одним дополнительным средством, направленным на другую мишень, для достижения таким образом более эффективного лечения рака. Средства, с которыми можно комбинировать молекулы антител к CD70, включают молекулы антител, которые связываются с мишенями на лейкозной стволовой клетке, и/или средства, которые ингибируют передачу сигналов SIRPα.

Было обнаружено, что анти-CD70 антитела эффективны для лечения миелоидных злокачественных заболеваний, в частности острого миелоидного лейкоза (AML) и миелодиспластического синдрома (MDS). Настоящее изобретение основано на применении молекул антител, которые связываются с CD70, в комбинации с дополнительными средствами, которые таргетируют злокачественные миелоидные клетки, в частности лейкозные стволовые клетки.

В первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комбинацию, включающую молекулу антитела, которая связывается с CD70, и по меньшей мере одну молекулу антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке.

В некоторых вариантах осуществления мишень на лейкозной стволовой клетке выбрана из группы, состоящей из: TIM-3; галектина-9; CD47; IL1RAP; LILRB2; CLL-1; CD123; CD33; SAIL; GPR56; CD44; E-селектина; CXCR4; CD25; CD32; PR1; WT1; ADGRE2; CCR1; TNFRSF1B и CD96. В предпочтительных вариантах осуществления мишень на лейкозной стволовой клетке выбрана из TIM-3, галектина-9, CD47, IL1RAP и LILRB2.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD70, выбрана из: (i) молекулы антитела, включающей переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), включающие CDR тяжелой цепи (HCDR3, HCDR2 и HCDR1) и CDR легкой цепи (LCDR3, LCDR2 и LCDR1): HCDR3, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 3; HCDR2, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 2; HCDR1, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 1; LCDR3, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 7; LCDR2, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 6; и LCDR1, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 5; (ii) молекулы антитела, включающей VH домен, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4, и VL домен, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:8; или (iii) ARGX-110.

В некоторых вариантах осуществления комбинация включает, в дополнение к молекуле антитела, которая связывается с CD70, молекулу антитела, которая связывается с первой мишенью на лейкозной стволовой клетке, и молекулу антитела, которая связывается с второй мишенью на лейкозной стволовой клетке, где первая и вторая мишени на лейкозной стволовой клетке являются разными. Первая и вторая мишени на лейкозной стволовой клетке могут быть выбраны из группы, состоящей из: TIM-3; галектина-9; CD47; IL1RAP; LILRB2; CLL-1; CD123; CD33; SAIL; GPR56; CD44; E-селектина; CXCR4; CD25; CD32; PR1; WT1; ADGRE2; CCR1; TNFRSF1B и CD96, предпочтительно из группы, состоящей из: TIM-3; галектина-9; CD47; IL1RAP и LILRB2. В предпочтительных вариантах осуществления первая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой TIM-3, а вторая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой CD47. В других предпочтительных вариантах осуществления первая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой TIM-3, а вторая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой IL1RAP.

Что касается комбинаций по изобретению, включающих молекулу антитела, которая связывается с TIM-3, или молекулу антитела, которая связывается с IL1RAP, в некоторых вариантах осуществления эта молекула антитела приводит к пониженной передаче сигналов NF-κB; пониженной передаче сигналов Wnt/β-катенина; пониженности стволовости AML клеток; или к их комбинации. Альтернативно или в дополнение, молекула антитела, которая связывается с TIM-3, может ингибировать взаимодействие TIM-3 с одним или несколькими TIM-3-взаимодействующими белками, необязательно с TIM-3-взаимодействующими белками, выбранными из: CEACAM-1; HMGB-1; фосфатидилсерина; Галектина-9; LILRB2; и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела или молекулы антител, которые связыв-

ваются с LSC мишенью(мишенями), происходит/происходят от верблюдовых. Например, молекулы антител могут быть выбраны из одной или нескольких иммунных библиотек, полученных способом, включающим стадию иммунизации животного из семейства верблюдовых, предпочтительно ламы, мишенью(мишенями), экспрессируемой лейкозной стволовой клеткой. Молекулы антител можно получить от животного из семейства верблюдовых путем иммунизации животного семейства верблюдовых LSC белком-мишенью или его полипептидным фрагментом или путем иммунизации животного из семейства верблюдовых молекулой мРНК или кДНК, экспрессирующей LSC белок-мишень или его полипептидный фрагмент.

Что касается комбинаций по изобретению, включающих молекулу антитела, которая связывается с CD47, в некоторых вариантах осуществления молекула антитела ингибирует взаимодействие между CD47 на лейкозных стволовых клетках и SIRP $\alpha$  на фагоцитарных клетках. Молекула антитела, которая связывается с CD47, может, альтернативно или в дополнение, увеличивать фагоцитоз опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител комбинации независимо выбраны из группы, состоящей из: IgG антитела; варибельного домена легкой цепи антитела (VL); варибельного домена тяжелой цепи антитела (VH); одноцепочечного антитела(scFv); F(ab')<sub>2</sub> фрагмента; Fab фрагмента; Fd фрагмента; Fv фрагмента; неполного (моновалентного) антитела; диател, триател, тетрадел или любой антиген-связывающей молекулы, образованной путем комбинации, сборки или конъюгации таких антиген-связывающих фрагментов.

Что касается получения составов комбинации, в некоторых вариантах осуществления молекулы антител комбинации объединены в формате одного антитела, например в виде мультиспецифического антитела, предпочтительно биспецифического антитела. Альтернативно, молекулы антител могут быть отдельными, но совместно сформулированными в одну композицию. Когда молекулы антител совместно сформулированы в виде одной композиции, соотношение разных молекул антител может быть 1:1. Альтернативно, молекулы антител могут присутствовать в разных относительных количествах. Например, для вариантов осуществления изобретения, в которых комбинация включает первую молекулу антитела, которая связывается с CD70, и вторую молекулу антитела, которая связывается с LSC мишенью, соотношение первой молекулы антитела и второй молекулы антитела может быть 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 и т.д. В альтернативных вариантах осуществления молекулы антител обеспечиваются отдельно.

Молекулы антител комбинаций могут обладать одной или несколькими эффекторными функциями. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из молекул антител: блокирует функцию своей мишени полностью или частично; и/или обладает ADCC активностью; и/или включает домен дефукозилированного антитела; и/или обладает CDC активностью; и/или обладает ADCP активностью.

Комбинации по изобретению могут включать одно или несколько дополнительных терапевтических средств, например одно или несколько дополнительных противораковых средств. В некоторых вариантах осуществления комбинация включает средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ . Средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , может представлять собой молекулу антитела, которая связывается с SIRP $\alpha$  и ингибирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ , или, альтернативно, может представлять собой слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела, например SIRP $\alpha$ -Fc слияние. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела включает по меньшей мере одну из молекул антител комбинации. В конкретных вариантах осуществления слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела включает молекулу антитела комбинации, которая связывается с CD70.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комбинацию, включающую молекулу антитела, которая связывается с CD70, и средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ .

Средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , может быть выбрано из: (i) молекулы антитела, которая связывается с CD47 и ингибирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ ; (ii) молекулы антитела, которая связывается с SIRP $\alpha$  и ингибирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ ; (iii) слитого белка SIRP $\alpha$ -молекула антитела, необязательно SIRP $\alpha$ -Fc слитого белка. В конкретных вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD70, и средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , объединены в одну молекулу, например слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела, где молекула антитела включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70. В конкретных вариантах осуществления комбинации второго аспекта изобретения включают по меньшей мере один V-подобный домен SIRP $\alpha$ , ковалентно связанный с молекулой антитела, которая связывается с CD70. Связывание между V-подобным доменом SIRP $\alpha$  и молекулой антитела, которая связывается с CD70, может быть опосредовано через линкер.

Во всех аспектах изобретения, в некоторых вариантах осуществления комбинация включает по меньшей мере одно дополнительное противораковое средство, например, по меньшей мере одно средство для лечения миелоидного злокачественного заболевания. В некоторых вариантах осуществления комбинации по настоящему изобретению включают дополнительное средство для лечения AML. В предпочтительных вариантах осуществления комбинации включают гипометилирующее средство, предпочтительно азацитидин. Альтернативно или в дополнение, комбинация может включать ингибитор PD-1

и/или ингибитор PD-L1.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комбинации в соответствии с первым и вторым аспектами изобретения для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека. Настоящее изобретение также относится способ для лечения злокачественного заболевания у субъекта-человека, содержащий введение субъекту любой из комбинаций в соответствии с первым или вторым аспектами изобретения.

Настоящее изобретение также относится молекулу антитела, которая связывается с CD70, для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где молекулу антитела вводят в комбинации с молекулой антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке. Настоящее изобретение также относится молекулу антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где молекулу антитела вводят в комбинации с молекулой антитела, которая связывается с CD70.

Настоящее изобретение также относится молекулу антитела, которая связывается с CD70, для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где молекулу антитела вводят в комбинации со средством, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ . Настоящее изобретение также относится средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где средство вводят в комбинации с молекулой антитела, которая связывается с CD70.

Что касается злокачественных заболеваний, подлежащих лечению с использованием комбинаций по изобретению, указанные злокачественные заболевания могут представлять собой (i) злокачественные заболевания, включающие продукцию раковых клеток-предшественников или стволовых клеток, экспрессирующих CD70, CD27 или оба; (ii) злокачественные заболевания, включающие продукцию раковых клеток-предшественников или стволовых клеток, экспрессирующих LSC мишень, с которой связывается по меньшей мере одна из молекул антител комбинации; (iii) миелоидные злокачественные заболевания; (iv) впервые диагностированные миелоидные злокачественные заболевания; (v) рецидивные или рефрактерные миелоидные злокачественные заболевания; (vi) миелоидные злокачественные заболевания, выбранные из: острого миелоидного лейкоза (AML); миелодиспластических синдромов (MDS); миелопролиферативных новообразований (MPN); хронического миелоидного лейкоза (CML); и миеломоноцитарного лейкоза (CMML). В особенно предпочтительном варианте осуществления комбинации по изобретению предназначены для лечения острого миелоидного лейкоза (AML).

В некоторых вариантах осуществления способы также включают контроль количества бластов у пациента. Количество бластов в периферической крови и/или костном мозге пациента может быть снижено, например снижено до менее чем 25%, например снижено до 5%, например снижено до менее чем 5%, например снижено до неопределяемых уровней. В некоторых вариантах осуществления количество бластов в костном мозге снижается до между 5% и 25%, и процентное содержание бластов в костном мозге снижается на более чем 50% по сравнению с их содержанием до лечения.

В некоторых вариантах осуществления способы индуцируют частичный ответ. В некоторых вариантах осуществления способы индуцируют полный ответ, необязательно с восстановлением количества тромбоцитов и/или восстановлением количества нейтрофилов. Способы могут индуцировать отсутствие потребности в трансфузиях эритроцитов или тромбоцитов, или и тех и других, в течение 8 недель или больше, 10 недель или больше, 12 недель или больше. В некоторых вариантах осуществления способы снижают показатель смертности по прошествии 30-дневного периода или по прошествии 60-дневного периода.

В некоторых вариантах осуществления способы повышают выживаемость. Например, способы могут повышать выживаемость по сравнению с препаратом или препаратами стандартного лечения, используемыми для лечения конкретного миелоидного злокачественного заболевания, которое лечат комбинацией. Способы могут индуцировать статус минимального остаточного заболевания, который является негативным.

В некоторых вариантах осуществления способы также включают стадию трансплантации костного мозга субъекту. Альтернативно или в дополнение, способы также могут включать стадию введения одного или нескольких дополнительных противораковых средств. Одно или несколько дополнительных противораковых средств могут быть выбраны из любых средств, подходящих для лечения миелоидных злокачественных заболеваний, предпочтительно AML. Предпочтительные средства могут быть выбраны из Venetoclax; Vuxeos; Idhifa (Энасидениб); и Rydapt (мидостаурин).

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-TIM-3 антител (1A11 и 2B10) в индукции антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) против клеточной линии AML (BDCM).

Фиг. 2 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-IL1RAP антител (1F10, 1C1, 7E4G1E8 и 89412) в индукции антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) против клеточных линий AML (MV4-11, THP1 и U937).

Фиг. 3 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-CD47 антител (B6H12, CC2C6 и BRIC126) в индукции антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) против клеточных линий AML (MV4-11, THP1, GDM1 и U937).

Фиг. 4 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-TIM-3 антител (1A11 и 2B10) в индукции комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC).

Фиг. 5 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-IL1RAP антител (1F10 и 1C1) в индукции комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC). А CDC, измеренная с использованием AML клеток MV4-11; В CDC, измеренная с использованием AML клеток NOMO-1.

Фиг. 6 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-CD47 антитела (BRIC126) в индукции комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC). А CDC, измеренная с использованием AML клеток MV4-11; В CDC, измеренная с использованием AML клеток NOMO-1.

Фиг. 7 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-TIM-3 антитела (2B10) в индукции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) против клеточной линии AML (BDCM).

Фиг. 8 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-IL1RAP антитела (1F10) в индукции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) против клеточной линии AML (NOMO-1).

Фиг. 9 показывает комбинированную эффективность анти-CD70 антитела (ARGX-110) и анти-CD47 антитела (CC2C6) в индукции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) против клеточной линии AML (NOMO-1).

### Подробное описание

#### А. Определения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют значение, хорошо известное специалистам в области, к которой относится изобретение.

"Комбинированная терапия" - В контексте настоящего изобретения термин "комбинированная терапия" относится к лечению, при котором субъект, например человек, получает два или более терапевтических средства. "Комбинации", описанные в настоящем изобретении, предназначены для применения в комбинированной терапии. Два или более терапевтических средства типично вводят так, чтобы лечить одно заболевание, в данном случае злокачественное заболевание. В некоторых вариантах осуществления в комбинированных терапиях по настоящему изобретению используют молекулы антител, связывающиеся с разными мишенями, конкретно с CD70 и мишенью на лейкозной стволовой клетке, например TIM-3, CD47 или IL1RAP. Как описано в настоящем изобретении, молекулы антител, включенные в комбинированные терапии, могут быть включены в одно антитело (например, мультиспецифическое антитело), могут быть совместно сформулированы или могут обеспечиваться отдельно, например в виде отдельных композиций, для введения субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления в комбинированных терапиях по настоящему изобретению используют молекулу антитела, которая связывается с CD70, в комбинации с по меньшей мере одним средством, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ . Молекулу антитела, которая связывается с CD70, можно комбинировать с средством, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , в виде одного слитого белка SIRP $\alpha$ -молекула антитела. Альтернативно, молекула антитела, которая связывается с CD70, и средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , могут обеспечиваться отдельно, например в виде отдельных композиций, для введения субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом.

"Молекула антитела" - В контексте настоящего изобретения термин "молекула антитела" предназначен для охвата полноразмерных антител и их антиген-связывающих фрагментов, включая варианты, такие как модифицированные антитела, гуманизированные антитела, антитела, подвергавшиеся модификации на уровне генов зародышевой линии, и их антиген-связывающие фрагменты. Термин "антитело" типично относится к полипептиду иммуноглобулина, имеющему комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, где полипептид обладает существенной специфической иммунореактивной активностью в отношении антигена, представляющего интерес (в данном случае CD70 или мишень на лейкозной стволовой клетке, например TIM-3, CD47, IL1RAP). Что касается антител IgG класса, антитела включают две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон, и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой 53000-70000. Эти четыре цепи соединены дисульфидными связями в "У" конфигурации, где легкие цепи захватывают в скобки тяжелые цепи, начиная с устья "У" и продолжая через вариабельную область. Легкие цепи антитела классифицируются как каппа или лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с либо каппа, либо лямбда легкой цепью. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины образуются либо гибридами, либо В-клетками, либо генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах У конфигурации к С-концу у основания каждой цепи.

Специалистам в данной области будет понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), с некоторыми подклассами среди них (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, сообщают функциональную специализацию. Термин "молекула антитела", используемый в настоящем изобретении, охватывает полноразмерные антитела или их антиген-связывающие фрагменты из любого класса или подкласса антител.

Что касается антиген-связывающих фрагментов, охватываемых общим термином "молекула антитела", эти фрагменты являются фрагментами или частями полноразмерного антитела или цепи антитела, включающими меньше аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело, сохраняя при этом антиген-связывающую активность. Термин "молекула антитела", используемый в настоящем изобретении, предназначен для охвата антиген-связывающих фрагментов, выбранных из: переменного домена легкой цепи антитела (VL); переменного домена тяжелой цепи антитела (VH); одноцепочечного антитела (scFv); F(ab')<sub>2</sub> фрагмента; Fab фрагмента; Fd фрагмента; Fv фрагмента; неполного (моновалентного) антитела; диатела, триатела, тетраатела или любой антиген-связывающей молекулы, образованной путем комбинации, сборки или конъюгации таких антиген-связывающих фрагментов. Термин "молекула антитела", используемый в настоящем изобретении, также предназначен для охвата фрагментов антител, выбранных из группы, состоящей из: унител; доменных антител; и нанотел. Фрагменты можно получить, например, путем химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела или рекомбинантными способами.

"Специфичность" и "мультиспецифические антитела" - Молекулы антител для применения в комбинированных терапиях, описанных в настоящем изобретении, связываются с конкретными антигенами-мишенями. Предпочтительно, чтобы молекулы антител "специфически связывались" с их антигеном-мишенью, при этом термин "специфически связываются" относится к способности любой молекулы антитела преимущественно взаимодействовать с определенной мишенью, например CD70, TIM-3, CD47, IL1RAP, LILRB2. Молекулы антител комбинаций и способов по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими и содержать один или несколько сайтов связывания, которые специфически связываются с конкретной мишенью. Молекулы антител комбинаций и способов по настоящему изобретению могут быть включены в форматы "мультиспецифических антител", например биспецифических антител, где мультиспецифическое антитело связывается с двумя или более антигенами-мишенями. Например, в одном варианте осуществления комбинация по настоящему изобретению включает биспецифическое антитело, включающее первую молекулу антитела, специфически связывающуюся с CD70, и вторую молекулу антитела, специфически связывающуюся с TIM-3. В альтернативном варианте осуществления комбинация по настоящему изобретению включает биспецифическое антитело, включающее первую молекулу антитела, специфически связывающуюся с CD70, и вторую молекулу антитела, специфически связывающуюся с CD47. Еще в одном альтернативном варианте осуществления комбинация по настоящему изобретению включает биспецифическое антитело, включающее первую молекулу антитела, специфически связывающуюся с CD70, и вторую молекулу антитела, специфически связывающуюся с IL1RAP. Для достижения множественных специфичностей "мультиспецифические антитела" типично конструируют так, чтобы они включали различные комбинации или спаривания полипептидов тяжелой и легкой цепей с дугими VH-VL парами. Мультиспецифические, особенно биспецифические антитела, могут быть сконструированы так, чтобы принимать общую конформацию нативного антитела, например Y-образного антитела, имеющего Fab-плечи различной специфичности, конъюгированные с областью Fc. Альтернативно, мультиспецифические антитела, например, биспецифические антитела, могут быть сконструированы так, чтобы принимать ненативную конформацию, например, в которой переменные домены или пары переменных доменов, имеющие разные специфичности, расположены на противоположных концах Fc области.

Биспецифические или мультиспецифические антитела могут иметь нативную структуру IgG с двумя Y-образными Fab плечами, имеющими специфичность связывания в отношении первой мишени, и одним или несколькими дополнительными антиген-связывающими доменами, расположенными на C-конце Fc домена, имеющими специфичность связывания в отношении второй мишени. Альтернативно, биспецифические или мультиспецифические антитела могут иметь нативную структуру IgG с двумя Y-образными плечами Fab, имеющими специфичность связывания в отношении первой мишени, и одним или несколькими scFv фрагментами, имеющими специфичность связывания в отношении второй мишени, расположенными на C-конце Fc домена. Биспецифические или мультиспецифические антитела могут представлять собой асимметричные IgG антитела, в которых одна Fab область заменена другим антиген-связывающим доменом, например VHH доменом. В этих асимметричных антителах Fab область или фрагмент могут связываться с CD70, а VHH домен может связываться с LSC мишенью, или наоборот.

"Модифицированное антитело" - в контексте настоящего изобретения термин "модифицированное антитело" включает синтетические формы антител, которые изменены так, чтобы они не были такими, которые присутствуют в природе, например, антитела, которые включают по меньшей мере две части тяжелых цепей, а не две полные тяжелые цепи (такие как домен-делетированные антитела или миниан-

титела); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), измененные так, чтобы они связывались с двумя или более разными антигенами или с разными эпитопами на одном антигене); молекулы, состоящие только из тяжелых цепей, объединенные с scFv молекулами, и т.п. scFv молекулы известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019. В дополнение к этому, термин "модифицированное антитело" включает мультвалентные формы антител (например, тривалентные, тетравалентные и т.д. антитела, которые связываются с тремя или более копиями одного и того же антигена). В другом варианте осуществления модифицированное антитело по изобретению представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере одну часть тяжелой цепи, в которой отсутствует CH2 домен, и содержащий связывающий домен полипептида, содержащий связывающую часть одного члена из пары рецептор-лиганд.

"Гуманизирующие замены" - в контексте настоящего изобретения термин "гуманизирующие замены" относится к заменам аминокислот, где аминокислотный остаток, присутствующий в конкретном положении в VH или VL домене антитела заменяют аминокислотным остатком, который присутствует в эквивалентном положении в референсном человеческом VH или VL домене. Референсный человеческий VH или VL домен может представлять собой VH или VL домен, кодируемый зародышевой линией человека. Гуманизирующие замены можно осуществить в каркасных областях и/или CDRs антител, определенных в настоящем изобретении.

"Гуманизированные варианты" - в контексте настоящего изобретения термин "гуманизированный вариант" или "гуманизированное антитело" относится к вариантному антителу, которое содержит одну или несколько "гуманизирующих замен" по сравнению с референсным антителом, где часть референсного антитела (например VH домен и/или VL домен или их части содержат по меньшей мере одну CDR) содержит аминокислоту, происходящую из отличного от человека вида, и "гуманизирующие замены" происходят в аминокислотной последовательности, происходящей из отличного от человека вида.

"Модифицированные на уровне генов зародышевой линии варианты" - Термин "модифицированный на уровне генов зародышевой линии вариант" или "модифицированное на уровне генов зародышевой линии антитело" В контексте настоящего изобретения относится конкретно к "гуманизированным вариантам", в которых "гуманизирующие замены" приводят к замене одного или нескольких аминокислотных остатков, присутствующих в (а) конкретном положении(положениях) в VH или VL домене антитела, аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в референсном человеческом VH или VL домене, кодируемом зародышевой линией человека. Типичным для любого данного "модифицированного на уровне генов зародышевой линии варианта" является то, что аминокислотные остатки, используемые для замены в модифицированном на уровне генов зародышевой линии варианте, берут исключительно, или преимущественно, из одного VH или VL домена, кодируемого человеческой зародышевой линией. Термины "гуманизированный вариант" и "модифицированный на уровне генов зародышевой линии вариант" часто используются взаимозаменяемо. Введение одной или нескольких "гуманизирующих замен" в происходящий от животного из семейства верблюдовых (например ламы) VH или VL домен приводит к продукции "гуманизированного варианта" происходящего от животного из семейства верблюдовых (ламы) VH или VL домена. Когда заменяющие аминокислотные остатки происходят преимущественно или исключительно из одной кодируемой человеческой зародышевой линией последовательности VH или VL домена, тогда результатом может быть "гуманизированный вариант" происходящего от животного семейства верблюдовых (лама) VH или VL домена.

"CD70" - в контексте настоящего изобретения термины "CD70" или "CD70 белок" или "CD70 антиген" используются взаимозаменяемо и относятся к члену семейства TNF лигандов, который представляет собой лиганд для TNFRSF7/CD27. CD70 также известен как CD27L или TNFSF7. Термины "человеческий CD70 белок" или "человеческий CD70 антиген" или "человеческий CD70" используются взаимозаменяемо и конкретно относятся к человеческому гомологу, включая природный человеческий CD70 белок, естественным образом экспрессируемый в организме человека и/или на поверхности культивируемых человеческих клеточных линий, а также к его рекомбинантным формам и фрагментам. Конкретные примеры человеческого CD70 включают полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, показанную под NCBI Reference Sequence номером доступа NP\_001243, или его внеклеточный домен.

"Мишень на лейкозной стволовой клетке" - в контексте настоящего изобретения термин "мишень на лейкозной стволовой клетке" относится к антигену, экспрессируемому лейкозными стволовыми клетками. Лейкозные стволовые клетки или "LSC" представляют собой встречающуюся с низкой частотой субпопуляцию лейкозных клеток, которые обладают свойствами стволовых клеток, отличными от основной массы лейкозных клеток, включая способность к самообновлению, см. Wang et al. (2017) *Molecular Cancer* 16:2, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки. LSC обычно встречаются с частотой в диапазоне от 1 на 10000 до 1 на 1 миллион как доля первичных бластных клеток при остром миелобластном лейкозе - AML (Pollyea and Jordan (2017) *Blood* 129: 1627-1635, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки). LSC, при их трансплантации реципиенту с иммунодефицитом, способны инициировать лейкозное заболевание, и, поскольку эти лейкозные стволовые клетки, по видимому, стимулируют рост рака, они представляют привлекательную мишень для новых терапевтических средств. LSC продуцируют ряд молекул, включая антигены клеточной поверхности, которые слу-

жат маркерами LSC. Эти маркеры, в некоторых случаях, позволяют отличить LSC от основной массы лейкозных клеток, см., например, Hanekamp et al. (2017) *Int. J Hematol.* 105:549-557, включенный посредством ссылки. Термин "мишень на лейкозной стволовой клетке", используемый в настоящем изобретении, относится к маркерам LSC, в частности к их популяции на клеточной поверхности.

"TIM-3" - в контексте настоящего изобретения термин "TIM-3" или "TIMD-3" относится к "белку, содержащему T-клеточный иммуноглобулин и домен муцина-3". TIM-3 также называют клеточным рецептором 2 вируса гепатита А (HAVCR2). TIM-3 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, имеющего трансмембранную структуру, включающую внеклеточный домен, состоящий из мембрано-дистального N-концевого домена иммуноглобулина и мембранно-проксимального домена муцина, содержащего потенциальные сайты для O-связанного гликозилирования. Известны различные полиморфные варианты белка TIM-3, см., например, варианты TIM-3 человека с 301 и 272 аминокислотами: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8TDQ0>; и <http://www.uniprot.org/uniprot/E5RHN3>. В контексте настоящего изобретения термин "TIM-3" предназначен для охвата всех полиморфных вариантов TIM-3, кодируемых транскриптами из геномного локуса TIM-3/HAVCR2, которые приводят к экспрессии TIM-3 на клеточной поверхности.

"Галектин-9" - в контексте настоящего изобретения термин "галектин-9" относится к белку, ассоциированному с внеклеточной мембраной, который служит лигандом или партнером связывания TIM-3. галектин 9 представляет собой растворимый белок, содержащий два tandemно связанных домена распознавания углеводов, которые специфически распознают структуру N-связанных сахарных цепей в иммуноглобулиновом домене TIM-3. Человеческий гомолог галектина-9 состоит из 355 аминокислотных остатков, представленных GenBank Accession BAB83625.

"CD47" - В контексте настоящего изобретения термин "CD47" относится к антигену клеточной поверхности CD47, который представляет собой трансмембранный белок, повсеместно экспрессируемый в различных нормальных клетках и опухолевых клетках. CD47 является лигандом для рецептора суперсемейства иммуноглобулинов SIRP $\alpha$ . CD47 также называют "антигенным поверхностно-детерминантным белком OА3", "интегрин-ассоциированным белком (IAP)" и "белком MER6". Человеческий гомолог CD47, кодируемый геномным локусом CD47, имеет длину 323 аминокислоты (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q08722>). В контексте настоящего изобретения термин CD47 предназначен для охвата всех полиморфных вариантов белка CD47.

"SIRP $\alpha$ " - в контексте настоящего изобретения термин "SIRP $\alpha$ " относится к "Сигнал-регуляторному белку альфа", который также известен как SHP субстрат 1 (SHPS-1), Ig-подобная молекула мозга с мотивами активации на основе тирозина (Bit), член A CD172 антиген-подобного семейства, ингибиторный рецептор SHPS-1, рецептор слияния макрофагов, MyD-1 антиген, SIRP $\alpha$ 1, SIRP $\alpha$ 2, SIRP $\alpha$ 3, p84 и CD172a. SIRP $\alpha$  является членом суперсемейства иммуноглобулинов и представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый на фагоцитарных клетках, включая макрофаги и дендритные клетки. Он представляет собой рецептор для CD47. Человеческий гомолог SIRP $\alpha$ , кодируемый геномным локусом SIRP $\alpha$ , имеет длину 504 аминокислот (<http://www.uniprot.org/uniprot/P78324>). Термин SIRP $\alpha$ , используемый в настоящем изобретении, предназначен для охвата всех полиморфных вариантов белка SIRP $\alpha$ .

"Слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела" - В контексте настоящего изобретения термин "слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела" предназначен для обозначения слитого белка, включающего SIRP $\alpha$  белок или его фрагмент и молекулу антитела. Молекула антитела может представлять собой молекулу полноразмерного антитела, как определено в настоящем изобретении, например полноразмерное IgG антитело. Альтернативно, молекула антитела может представлять собой антиген-связывающий фрагмент антитела, как определено в настоящем изобретении. SIRP $\alpha$  белок или его фрагмент может быть слит с молекулой антитела в любом подходящем положении на молекуле антитела. Например, SIRP $\alpha$  белок или его фрагмент может быть слит с N-концом или C-концом тяжелой цепи или легкой цепи молекулы антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела не будет включать полноразмерный SIRP $\alpha$  белок, но будет включать его фрагмент, в частности фрагмент, способный к связыванию с CD47. Например, слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела может включать одну или несколько копий иммуноглобулинового V-подобного домена SIRP $\alpha$ , где иммуноглобулиновый V-подобный домен определяется положениями аминокислот 32-137 состоящего из 504 аминокислот полноразмерного человеческого SIRP $\alpha$  белка.

"IL1RAP" - в контексте настоящего изобретения термин "IL1RAP" или "IL-1RAP", или "IL1RAsP", или "IL-1RAsP" относится к "аксессуарному белку рецептора интерлейкина-1". IL1RAP также известен как "рецептор 3 интерлейкина-1" или "IL-1R3" или "IL1R3". IL1RAP представляет собой ко-рецептор для типа I рецептора интерлейкина-1 (IL1R1), и он необходим для передачи сигналов, опосредованных цитокином IL-1. Он также служит в качестве ко-рецептора для IL1R4 и IL1R3 для опосредования передачи сигналов через IL-33 и IL-36, соответственно. IL-1, например, опосредует свои эффекты на пути ниже от комплекса рецепторов IL-1 клеточной поверхности (IL-1+IL1R1+IL1RAP) через активацию различных внутриклеточных сигнальных путей, включая NF- $\kappa$ B путь. Человеческий гомолог IL1RAP, кодируемый геномным локусом IL1RAP, имеет длину 570 аминокислот (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NPH3>).

"LILRB2" - в контексте настоящего изобретения термин "LILRB2" относится к "члену 2 субсемейства В лейкоцитарных иммуноглобулин-подобных рецепторов". LILRB2 также известен как "Лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор 2" или "LIR-2", "член D CD85 антиген-подобного семейства", или "CD85d", "Имуноглобулин-подобный транскрипт 4", или "ILT-4", и "Моноцитарный/макрофагальный иммуноглобулин-подобный рецептор 10" или "MIR-10". LILRB2 вовлечен в даун-регуляцию иммунного ответа и развитие толерантности. Человеческий гомолог LILRB2, кодируемый геномным локусом LILRB2, имеет длину 598 аминокислот (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8N423>).

"Миелоидное злокачественное заболевание" - В контексте настоящего изобретения термин "миелоидное злокачественное заболевание" относится к любому клональному заболеванию гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников. Миелоидные злокачественности или миелоидные злокачественные заболевания включают хронические и острые состояния. Хронические состояния включают миелодиспластические синдромы (MDS), миелопролиферативные новообразования (MPN) и хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), а острые состояния включают острый миелоидный лейкоз (AML).

"Острый миелоидный лейкоз" - используемый в настоящем изобретении термин "острый миелоидный лейкоз" или "AML" относится к гемопоэтическому новообразованию с вовлечением миелоидных клеток. У пациентов с AML наблюдается аккумуляция бластных клеток в костном мозге. Термины "бластные клетки" или просто "бласты" в контексте настоящего изобретения относятся к клональным миелоидным клеткам-предшественникам, проявляющим нарушенный потенциал дифференцировки. Бластные клетки обычно также аккумулируются в периферической крови пациентов с AML. Обычно AML диагностируется, если у пациента обнаруживается 20% или более бластных клеток в костном мозге или периферической крови.

"Противораковое средство" - используемый в настоящем изобретении термин "противораковое средство" относится к любому средству, которое способно прямо или косвенно предотвращать, ингибировать или лечить рост рака. Такие средства включают химиотерапевтические средства, иммунотерапевтические средства, антиангиогенные средства, радионуклиды и т.д., многие примеры которых известны специалистам в данной области.

В. Комбинированная терапия с использованием анти-CD70 и анти-LSC антител.

Настоящее изобретение относится к комбинированным терапиям и их применению в лечении злокачественных заболеваний, в частности миелоидных злокачественных заболеваний, предпочтительно острого миелоидного лейкоза (AML). Комбинации или комбинированные терапии, описанные в настоящем изобретении, основаны на применении молекул антител, которые связываются с CD70, в комбинации с другими средствами.

В первом аспекте комбинации или комбинированные терапии по изобретению включают или состоят из молекул антител, которые связываются с разными мишенями. Комбинации включают молекулу антитела, которая связывается с CD70, и по меньшей мере одну молекулу антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке.

Все комбинации в соответствии с настоящим изобретением включают молекулу антитела, которая связывается с CD70. Как описано в настоящем изобретении, CD70 является членом суперсемейства белков факторов некроза опухоли (TNF) и представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II. Это лиганд для TNF рецептора CD27. CD70 транзиторно экспрессируется на антиген-активированных Т- и В-клетках и зрелых дендритных клетках, и сигнальный путь CD70-CD27 играет важную роль в регуляции иммунного ответа.

Конститутивная экспрессия CD70 наблюдалась на многих типах гематологических злокачественных новообразований и солидных карцином, что делает этот белок привлекательной мишенью для разработки противораковых терапий. CD70 был идентифицирован как особенно интересная мишень для разработки лечений миелоидных злокачественных новообразований, особенно острого миелоидного лейкоза (AML), см., например, Perna et al. (2017) *Cancer Cell* 32:506-519, и Riether et al. (2017) *J Exp Med.* 214 (2): 359-380, оба включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

Считается, что CD70 способствует прогрессированию рака несколькими способами, включая непосредственные эффекты, способствующие пролиферации и выживанию опухолевых клеток. Также полагают, что повышенная регуляция экспрессии CD70 играет роль в иммуносупрессии в опухолевом микроокружении путем активации Т-регуляторных клеток и снижения активности опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL). На основании этой иммуносупрессивной активности опухоли CD70 можно классифицировать как мишень иммунной контрольной точки. При AML экспрессия CD70 и его рецептора CD27 обнаружена на AML бластах, и передачу сигналов через путь CD70-CD27 связывают с поведением стволовых клеток в AML бластных популяциях (Riether et al. (2017), *ibid*).

В первом аспекте настоящего изобретения молекулу антитела, которая связывается с CD70, комбинируют с по меньшей мере одной молекулой антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке. Комбинации могут включать или состоять из молекулы антитела, которая связывается с CD70, вместе с молекулами антител, которые связываются с по меньшей мере двумя разными мишенями на лейкозных стволовых клетках, по меньшей мере тремя разными мишенями на лейкозных стволо-

вых клетках, по меньшей мере четырьмя разными мишенями на лейкозных стволовых клетках или по меньшей мере пятью разными мишенями на лейкозных стволовых клетках.

Лейкозные стволовые клетки или "LSC" представляют собой отдельную популяцию лейкозных клеток, которые обладают свойствами, подобными свойствам стволовых клеток, например способностью к самообновлению. В конкретных вариантах осуществления LSC мишени, с которыми связываются молекулы антител комбинации, независимо выбраны из группы, состоящей из: TIM-3; галектина-9; CD47; IL1RAP; LILRB2; CLL-1; CD123; CD33; SAIL; GPR56; CD44; E-селектина; CXCR4; CD25; CD32; PR1; WT1; ADGRE2; CCR1; TNFRSF1B и CD96 ((Al-Mawali. (2013) *J Stem Cell Res Ther.* 3(4): 1-8; Dana et al. (2016) *Leukemia* 30:1734-1741; Rashildi & Walter (2016) *Expert Review of Hematology* 9(4):335-350; Cho et al. (2017) *Korean J Intern Med.* 32(2):248-257)).

В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с LSC мишенью, выбранной из: TIM-3 или галектина-9. В предпочтительных вариантах осуществления LSC мишень представляет собой TIM-3.

TIM-3 представляет собой рецептор, экспрессируемый на продуцирующих IFN- $\gamma$  Т-клетках, FoxP3+ Treg-клетках и врожденных иммунных клетках (макрофагах и дендритных клетках). Подобно CD70, TIM-3 также был классифицирован как мишень иммунной контрольной точки при раке, поскольку взаимодействие TIM-3 с его лигандами играет важную роль в ингибировании ответов Th1 (Das et al. (2017) *Immunol Rev.* 276 (1):97-111). Было обнаружено, что при развитии рака высокий уровень экспрессии TIM-3 коррелирует с подавлением ответов Т-клеток и дисфункцией Т-клеток, что указывает на важную роль TIM-3 в ослаблении противоопухолевого иммунного ответа организма (Japp et al. (2015) *Cancer Immunol Immunother.* 64:1487-1494). В подтверждение этого было обнаружено, что ингибирование передачи сигналов TIM-3 в доклинической опухолевых моделях восстанавливает противоопухолевый иммунитет (Sakuishi et al. (2010) *J Exp Med.* 207: 2187-2194). TIM-3 также был идентифицирован как перспективная терапевтическая мишень, экспрессируемая непосредственно на поверхности лейкозных стволовых клеток, в частности AML стволовых клеток (Jan et al. (2011) *Proc Natl Acad Sci.* 108: 5009-5014; Kikushige et al. (2010) *Cell Stem Cell.* 7:708-717; Kikushige & Miyamoto (2013) *Int J Hematol.* 98: 627-633; Goncalves Silva et al. (2015) *Oncotarget* 6:33823-33833; Kikushige et al. (2015) *Cell Stem Cell* 17:341-352).

Без ограничения какой-либо теорией, комбинированные терапии по настоящему изобретению, включающие молекулы антител, которые связываются с CD70, и молекулы антител, которые связываются с TIM-3, считаются особенно эффективными для лечения злокачественных заболеваний, в частности миелоидных злокачественных заболеваний, в силу объединенного эффекта на уровне лейкозных стволовых клеток. Большое количество доказательств говорит о том, что LSC имеют решающее значение для возникновения и поддержания лейкоза. Поэтому считается, что нацеливание на эту клеточную популяцию посредством антител против CD70 и антител, которые специфически связываются со второй LSC мишенью, такой как TIM-3, является эффективным способом, при помощи которого можно целенаправленно воздействовать на критическую популяцию опухолевых клеток. CD70 и LSC мишени, описанные в настоящем изобретении, в частности TIM-3, также служат важными регуляторами противоопухолевого ответа, т.е. они представляют собой белки иммунных контрольных точек, на которые можно воздействовать, чтобы стимулировать противоопухолевый ответ организма. Из этого следует, что комбинированные терапии, описанные в настоящем изобретении, способны опосредовать прямые терапевтические эффекты на уровне опухолевых клеток, в частности миелоидных лейкозных клеток, а также косвенные эффекты посредством стимуляции противоопухолевого иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с LSC мишенью CD47.

CD47 представляет собой трансмембранный белок, который демонстрирует относительно убиквитинный характер экспрессии. CD47 связывается со своим рецептором SIRP $\alpha$ , экспрессируемым на фагоцитарных клетках, и это связывающее взаимодействие передает сигнал "не ешь меня", который ингибирует фагоцитоз CD47-экспрессирующей клетки. Подобно CD70 и TIM-3, CD47 был классифицирован как важная мишень иммунной контрольной точки при раке, поскольку взаимодействие между CD47 на опухолевых клетках и его рецептором SIRP $\alpha$  на фагоцитарных клетках идентифицировано как средство, посредством которого опухолевые клетки избегают фагоцитоза, опосредованного макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками, присутствующими в опухолевом окружении. Было обнаружено, что CD47 экспрессируется на высоком уровне в различных типах опухолевых клеток, включая клетки AML (Ponce et al. (2017) *Oncotarget* 8 (7): 11284-11301), и было обнаружено, что нарушение передачи сигналов CD47-SIRP $\alpha$  с использованием SIRP $\alpha$ -Fc слияния уничтожает стволовые клетки AML в модели ксенотрансплантата (Theocharides et al. (2012) *J. Exp. Med.* 209 (10): 1883-1899).

Без ограничения какой-либо теорией, комбинированные терапии по настоящему изобретению, включающие молекулы антител, которые связываются с CD70, и молекулы антител, которые связываются с CD47, считаются особенно эффективными для лечения злокачественных заболеваний, в частности миелоидных злокачественных заболеваний, в силу их совместного эффекта на уровне лейкозных стволо-

вых клеток и врожденной иммунной системы. Молекула антитела, которая связывается с CD70, может служить в качестве опсонизирующего антитела, а молекула антитела, которая связывается с CD47, может усиливать фагоцитоз CD70-экспрессирующих опухолевых клеток, блокируя взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ .

В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с LSC мишенью IL1RAP.

IL1RAP представляет собой рецептор суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессируемый в печени, коже, плаценте, тимусе и легких. Он служит в качестве корецептора для IL1R1 для опосредования передачи сигналов через цитокин IL-1 и в качестве корецептора для IL1R4 и IL1R3 для опосредования передачи сигналов через IL-33 и IL-36, соответственно. Сверхэкспрессия IL1RAP была обнаружена на стволовых клетках-кандидатах хронического миелоидного лейкоза и мононуклеарных клетках пациентов с острым миелолейкозом. Кроме того, сообщалось, что антитела, направленные против IL1RAP, имеют полезные терапевтические эффекты в моделях ксенотрансплантатов CML и AML (Agerstam et al. (2015) Proc Natl Acad Sci USA 112 (34): 10786-91; Agerstam et al. (2016) Blood 128 (23):2683-2693).

Без ограничения какой-либо теорией, комбинированные терапии по настоящему изобретению, включающие молекулы антител, которые связываются с CD70, и молекулы антител, которые связываются с IL1RAP, считаются особенно эффективными для лечения злокачественных заболеваний, в частности миелоидных злокачественных заболеваний, в силу их совместного эффекта на уровне лейкозных стволовых клеток. Было обнаружено, что антитела, направленные против IL1RAP, особенно эффективны для уничтожения CML и AML стволовых клеток (Jaras et al. (2010) Proc Natl Acad Sci USA 107 (37): 16280-16285; Askmyr et al. (2013) Blood 121 (18):3709-3713. Кроме того, известно, что рецепторный комплекс IL-1 передает сигналы через сигнальный путь NF- $\kappa$ B, и этот путь уже был идентифицирован как привлекательная мишень при лечении AML (см. Bosman et al. (2016) Crit Rev Oncol Hematol. 98:35-44). Из этого следует, что комбинация молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с IL1RAP, может быть особенно эффективной на основании двойного нацеливания/ингибирования сигнального пути NF- $\kappa$ B в LSC.

В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с LSC мишенью LILRB2.

LILRB2 представляет собой рецептор суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессируемый на различных типах иммунных клеток, включая гемопоэтические стволовые клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки. LILRB2 вовлечен в развитие рака, и сообщалось о его экспрессии на различных раковых клетках, включая AML и CML клетки (Kang et al. (2015) Nat Cell Biol. 17:665-677; Colovai et al. (2007) Cytometry B Clin Cytom. 72:354-62).

Без ограничения какой-либо теорией, комбинированные терапии по настоящему изобретению, включающие молекулы антител, которые связываются с CD70, и молекулы антител, которые связываются с LILRB2, считаются особенно эффективными для лечения злокачественных заболеваний, в частности миелоидных злокачественных заболеваний, в силу их совместного эффекта на уровне лейкозных стволовых клеток. Поскольку LILRB2 также идентифицирован как белок, который взаимодействует с TIM-3, эффект антител к LILRB2 также может быть опосредован через сигнальный путь TIM-3.

В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с первой мишенью на лейкозной стволовой клетке, и молекулы антитела, которая связывается с второй мишенью на лейкозной стволовой клетке, где первая и вторая мишени на лейкозной стволовой клетке являются разными. Первая и вторая мишени на лейкозной стволовой клетке могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из: TIM-3; галектина-9; CD47; IL1RAP; LILRB2; CLL-1; CD123; CD33; SAIL; GPR56; CD44; E-селектина; CXCR4; CD25; CD32; PR1; WT1; ADGRE2; CCR1; TNFRSF1B и CD96. В предпочтительных вариантах осуществления первая и вторая мишени на лейкозной стволовой клетке могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из: TIM-3; галектина-9; CD47; IL1RAP и LILRB2.

В предпочтительных вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с TIM-3, и молекулы антитела, которая связывается с CD47. В других предпочтительных вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с TIM-3, и молекулы антитела, которая связывается с IL1RAP. В других предпочтительных вариантах осуществления комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с TIM-3, молекулы антитела, которая связывается с CD47, и молекулы антитела, которая связывается с IL1RAP.

Молекулы антител комбинаций по настоящему изобретению, т.е. молекулы антител, которые связываются с CD70, и молекулы антител, которые связываются с одной или несколькими LSC мишенями, могут быть выбраны из любых подходящих молекул антител, демонстрирующих иммунореактивность в отношении их соответствующей мишени. Как отмечается выше, термин "молекула антитела" используется для обозначения полноразмерных антител в дополнение к их антиген-связывающим фрагментам.

Антитела комбинаций, описанных в настоящем изобретении, предназначены для применения в лечении человека и поэтому, как правило, должны быть IgA, IgD, IgE, IgG, IgM типа, часто IgG типа, в этом случае они должны принадлежать к одному из четырех подклассов IgG1, IgG2a и b, IgG3 или IgG4. В предпочтительных вариантах осуществления антитела комбинаций, описанных в настоящем изобретении, представляют собой IgG антитела, предпочтительно IgG1 антитела.

Антитела могут быть моноклональными, поликлональными, мультиспецифическими (например биспецифические антитела) антителами, при условии, что они демонстрируют соответствующую иммунологическую специфичность в отношении их мишени. Моноклональные антитела являются предпочтительными, поскольку они являются высокоспецифическими, будучи направленными против одного антигенного сайта.

Антиген-связывающие фрагменты комбинаций, описанных в настоящем изобретении, типично будут включать часть полноразмерного антитела, как правило, его антиген-связывающий или переменный домен. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, биспецифические Fab и Fv фрагменты, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител (см. Holliger and Hudson (2005) *Nature Biotechnol.* 23:1126-36, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки).

Молекулы антител комбинаций, описанных в настоящем изобретении, могут демонстрировать высокую гомологию с человеческими. Такие молекулы антител, имеющие высокую гомологию с человеческими, могут включать антитела, включающие VH и VL домены природного нечеловеческого антитела, которые демонстрируют достаточно высокий % идентичности последовательностей с последовательностями человеческой зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления молекулы антител представляют собой гуманизированные или модифицированные на уровне генов зародышевой линии варианты нечеловеческих антител, например антител, включающих VH и VL домены традиционных антител верблюдовых, сконструированные так, чтобы они представляли собой гуманизированные или модифицированные на уровне генов зародышевой линии варианты исходных антител.

В не ограничивающих вариантах осуществления молекулы антител комбинаций могут включать CH1 домены и/или CL домены (из тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно), аминокислотная последовательность которых является полностью или по существу человеческой. Для молекулы антител, предназначенных для применения в терапии человека, типично, когда вся константная область антитела, или по меньшей мере ее часть, имеет полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. Поэтому один или несколько, или любая комбинация, из CH1 домена, шарнирного участка, CH2 домена, CH3 домена и CL домена (и CH4 домен, если присутствует) может быть полностью или по существу человеческим, что касается его аминокислотной последовательности.

Преимущественно, CH1 домен, шарнирный участок, CH2 домен, CH3 домен и CL домен (и CH4 домен, если присутствует) могут все иметь полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. В контексте константной области гуманизированного или мишерного антитела или фрагмента антитела термин "по существу человеческая" относится к аминокислотной последовательности, имеющей идентичность по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99% с человеческой константной областью. Термин "человеческая аминокислотная последовательность" в данном контексте относится к аминокислотной последовательности, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, который включает гены зародышевой линии, перестроенные и соматически мутированные гены. Изобретение также предусматривает полипептиды, включающие константные домены "человеческой" последовательности, которые были изменены путем одной или нескольких добавок, делеций или замен аминокислот относительно человеческой последовательности, за исключением тех вариантов осуществления, где явно необходимо присутствие "полностью человеческой" шарнирной области.

Молекулы антител комбинаций могут иметь одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций в константной области тяжелой и/или легкой цепи, особенно в Fc области. Аминокислотные замены могут приводить к замене замещаемой аминокислоты другой встречающейся в природе аминокислотой или неприродной или модифицированной аминокислотой. Также допускаются другие структурные модификации, такие как, например, изменения паттерна гликозилирования (например, путем добавления или делеций N- или O-связанных сайтов гликозилирования).

Молекулы антител комбинаций могут быть модифицированы в отношении их свойств связывания с Fc-рецепторами, например, для модуляции эффекторной функции. Например, цистеиновый остаток (остатки) могут быть введены в Fc область, что обеспечивает возможность образования межцепочечных дисульфидных связей в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или повышенным комплемент-опосредованным коллингом клеток и антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). См. Caron et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 и Shopes, B (1992) *J. Immunol.* 148: 918-2922, включенные в настоящее изобретение посредством ссылки.

Молекулы антител также могут быть модифицированы так, чтобы образовывать иммуноконъюгаты, включающие антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтиче-

ское средство, токсином (например, ферментативно активным токсином бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагментами) или радиоактивным изотопом (т.е. радиоконъюгат). Fc области также могут быть сконструированы для увеличения времени полужизни, как описано в публикации Chan and Carter (2010) *Nature Reviews: Immunology* 10: 301-316, включенной в настоящее изобретение посредством ссылки.

В еще одном варианте осуществления Fc область модифицирована для увеличения способности молекулы антитела опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела к рецептору Fc $\gamma$  путем модификации одной или нескольких аминокислот.

В конкретных вариантах осуществления Fc область может быть сконструирована таким образом, чтобы не было эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления молекулы антител по изобретению могут иметь Fc область, происходящую из природных изоформ IgG, имеющих пониженную эффекторную функцию, например IgG4. Fc области, происходящие из IgG4, могут быть дополнительно модифицированы для повышения терапевтической пользы, например, путем введения модификаций, которые минимизируют обмен плечами между молекулами IgG4 *in vivo*. Fc области, происходящие из IgG4, могут быть модифицированы для включения S228P замены.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител комбинаций модифицированы в отношении гликозилирования. Например, можно получить агликозилированное антитело (т.е. антитело с отсутствием гликозилирования). Гликозилирование можно изменить, например, для повышения аффинности антитела к антигену-мишени. Такие углеводные модификации можно осуществить, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществить одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к элиминированию одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасного участка варибельной области, чтобы таким образом элиминировать гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может повысить аффинность антитела к антигену.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител в комбинациях изменяют таким образом, чтобы они были гипофукозилированными, т.е. имели уменьшенные количества фукозильных остатков, или полностью или частично де-фукозилированными (как описано Natsume et al. (2009) *Drug Design Development and Therapy* 3:7-16), или имели увеличенные бисектные GlcNac структуры. Было показано, что такие измененные паттерны гликозилирования повышают ADCC активность антител, типично обеспечивая 10-кратное усиление ADCC по сравнению с эквивалентным антителом, включающим "нативный" человеческий Fc домен. Такие углеводные модификации можно осуществить, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным ферментативным механизмом гликозилирования (как описано в Yamane-Ohnuki and Satoh (2009) *mAbs* 1 (3):230-236). Примерами нефукозилированных антител с повышенной ADCC функцией являются антитела, полученные с использованием технологии Potelligent™ от BioWa Inc.

Молекулы антител описанных в изобретении комбинаций могут обладать эффекторной функцией антитела, например, одной или несколькими из антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

Молекулы антител этих комбинаций могут быть модифицированы в области Fc для увеличения аффинности связывания с неонатальным рецептором FcRn. Повышенную аффинность связывания можно измерить при кислотном pH (например, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Повышенную аффинность связывания также можно измерить при нейтральном pH (например, от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,4). Под "повышенной аффинностью связывания" подразумевается повышенная аффинность связывания с FcRn по сравнению с немодифицированной Fc областью. Обычно немодифицированная Fc область будет обладать аминокислотной последовательностью дикого типа человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В таких вариантах осуществления повышенная аффинность связывания с FcRn молекулы антитела, имеющей модифицированную Fc область, будет измеряться относительно аффинности связывания IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа в отношении FcRn.

В предпочтительных вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков в Fc области могут быть заменены другой аминокислотой, чтобы увеличить связывание с FcRn. Сообщалось о нескольких заменах в Fc, которые увеличивают связывание с FcRn и тем самым улучшают фармакокинетику антител. Такие замены описаны, например, в Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28 (2): 157-9; Hinton et al. (2006) *J. Immunol.* 176:346-356; Yeung et al. (2009) *J. Immunol.* 182:7663-7671; Presta LG (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20: 460-470; и Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (10): 1283-88, содержание которых включено в настоящее изобретение во всей полноте.

В предпочтительных вариантах осуществления одна или несколько молекул антител в описанных в настоящем изобретении комбинациях включают модифицированный Fc домен человеческого IgG, содержащий или состоящий из аминокислотных замен H433K и N434F, где нумерация для Fc домена соответствует нумерации ЕС. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления одна или несколько молекул антител в описанных комбинациях содержат модифицированный Fc домен челове-

ского IgG, содержащий или состоящий из аминокислотных замен M252Y, S254T, T256E, H433K и N434F, где нумерация для Fc домена соответствует нумерации ЕС.

Антитела к CD70.

Молекулы антител, связывающиеся с CD70, которые могут быть включены в любую из комбинаций, описанных в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим: CD70 антитела, которые ингибируют взаимодействие CD70 с CD27; CD70 антитела, которые конкурируют с CD27 за связывание CD70; CD70 антитела, которые ингибируют CD70-индуцируемую передачу сигналов CD27; антитела к CD70, которые ингибируют активацию и/или пролиферацию Treg; антитела к CD70, которые истощают CD70-экспрессирующие клетки; антитела к CD70, которые индуцируют лизис CD70-экспрессирующих клеток; антитела к CD70, которые обладают ADCC, CDC функциональностью и/или индуцируют ADCP.

Примерами антител к CD70 являются ARGX-110, описанный в WO2012/123586 (включенной в настоящее изобретение посредством ссылки), SGN-70 (WO2006/113909 и McEarChern et al. (2008) Clin Cancer Res. 14(23):7763, оба документа включены в настоящее изобретение посредством ссылки) и антитела к CD70, описанные в WO2006/044643 и WO2007/038637 (каждая из этих заявок включена в настоящее изобретение посредством ссылки).

WO 2006/044643 описывает антитела к CD70, содержащие эффекторный домен антитела, который может опосредовать одно или несколько из ADCC, ADCP, CDC или ADC и проявлять либо цитостатический, либо цитотоксический эффект на CD70-экспрессирующий рак, или проявлять иммуносупрессивный эффект на CD70-экспрессирующее иммунологическое расстройство в отсутствие конъюгации с цитостатическим или цитотоксическим средством. Антитела, проиллюстрированные в этой заявке, основаны на антиген-связывающих областях двух моноклональных антител, обозначенных как 1F6 и 2F2.

WO 2007/038637 описывает полностью человеческие моноклональные антитела, которые связываются с CD70. Эти антитела характеризуются связыванием с человеческим CD70 с  $K_D$ , равной  $1 \times 10^{-7}$  М или меньше. Антитела также связываются, и интернализуются ими, с клеточными линиями почечно-клеточной карциномы, которые экспрессируют CD70, такими как 786-0.

ARGX-110 представляет собой IgG1 анти-CD70-антитело, которое, как было показано, ингибирует взаимодействие CD70 с его рецептором CD27 (Silence et al. (2014) MAbs. Mar-Apr; 6(2):523-32, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки). В частности, было показано, что ARGX-110 ингибирует CD70-индуцированную передачу сигналов CD27. Уровни сигналов CD27 могут быть определены, например, путем измерения растворимого в сыворотке CD27, как описано в Riether et al. (ibid) или экспрессии IL-8, как описано в Silence et al. (ibid). Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что ингибирование передачи сигналов CD27 уменьшает активацию и/или пролиферацию Treg клеток, тем самым уменьшая ингибирование противоопухолевых эффекторных Т-клеток. Также было продемонстрировано, что ARGX-110 истощает CD70-экспрессирующие опухолевые клетки. В частности, было показано, что ARGX-110 лизирует экспрессирующие CD70 опухолевые клетки через антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), а также усиливает антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) CD70-экспрессирующих клеток (Silence et al., ibid).

Аминокислотные последовательности CDR, VH и VL ARGX-110 показаны в таблице ниже.

Таблица 1

ARGX-110	Последовательность	SEQ ID NO.
HCDR1	VYYMN	1
HCDR2	DINNEGTTYYADSVKG	2
HCDR3	DAGYSNHVPIFDS	3
VH	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSVYYMNW VRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKGRFTISR DNSKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARDAGYSNHVPI FDSWGQGLTVTVSS	4
LCDR1	GLKSGSVTSDNFPT	5
LCDR2	NTNTRHS	6
LCDR3	ALFISNPSVE	7
VL	QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGLKSGSVTSDNFPTW YQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHSGVPDRFSGSILGNKAA	8
	LTITGAQADDEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG	

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD70, включает переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где VH и VL домены включают или состоят из последовательности CDR:

HCDR3, содержащая или состоящая из SEQ ID NO: 3;

HCDR2, содержащая или состоящая из SEQ ID NO: 2;

HCDR1, содержащая или состоящая из SEQ ID NO: 1;  
 LCDR3, содержащая или состоящая из SEQ ID NO: 7;  
 LCDR2, содержащая или состоящая из SEQ ID NO: 6; и  
 LCDR1, содержащая или состоящая из SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD70, включает переменный домен тяжелой цепи (VH домен), содержащий или состоящий из последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 4, и переменный домен легкой цепи (VL домен), содержащий или состоящий из последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD70, включает переменный домен тяжелой цепи (VH домен), содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4, и переменный домен легкой цепи (VL домен), содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 8.

CD70 молекулы антител, которые могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC). ADC представляют собой антитела, связанные с активными веществами, например ауристатидами и майтансинами или другими цитотоксическими средствами. Некоторые ADC поддерживают блокирующую и/или эффекторную функцию (например, ADCC, CDC, ADCP) антитела, при этом также доставляя конъюгированное активное вещество к клеткам, экспрессирующим мишень (например, CD70). Примеры анти-CD70 ADC включают ворсетузумаб мафодотин (также известный как SGN-75, Seattle Genetics), SGN-70A (Seattle Genetics) и MDX-1203/BMS936561 (Bristol-Myers Squibb), каждый из которых можно использовать в соответствии с изобретением. Подходящие анти-CD70 ADC также описаны в WO 2008074004 и WO 2004073656, каждая из которых включена в настоящее изобретение посредством ссылки.

Молекулы антител к CD70, которые могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении, также включают слитые белки SIRP $\alpha$ -молекула антитела или "licMABs" (локально ингибирующие контрольные точки моноклональные антитела), как описано, например, в Ponce et al. (2017) *ibid*. Эти слитые белки SIRP $\alpha$ -молекула антитела или licMABs включают антитело или молекулу антитела (в данном случае антитело к CD70 или молекулу антитела), слитую с доменом SIRP $\alpha$  белка, в частности, внеклеточным иммуноглобулиновым V-подобным доменом.

Антитела к LSC мишеням.

Антитела к TIM-3 и галектину-9.

Молекулы антител, связывающиеся с LSC мишенями, которые могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают молекулы антител, которые опосредуют свои эффекты через TIM-3. Эти эффекты могут быть опосредованы через непосредственное связывание с TIM-3 или через связывание с LSC мишенью, связанной с передачей сигналов TIM-3. В некоторых вариантах осуществления молекулы антител к LSC мишеням в комбинациях, описанных в настоящем изобретении, ингибируют взаимодействие TIM-3 с одним или несколькими взаимодействующими с TIM-3 белками. Взаимодействующие с TIM-3 белки могут быть выбраны из: CEACAM-1; HMGB-1; фосфатидилсерина; галектина-9; LILRB2; и их комбинаций. В одном варианте осуществления включенная в комбинацию молекула антитела к LSC мишени ингибирует взаимодействие TIM-3 с его лигандом, галектином-9. В одном варианте осуществления включенная в комбинацию молекула антитела к LSC мишени ингибирует взаимодействие TIM-3 с его лигандом LILRB2.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к LSC мишени в комбинациях связывается с галектином-9. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к LSC мишени в комбинациях связывается с TIM-3. Для вариантов осуществления, где LSC мишень представляет собой TIM-3, молекула антитела может достигать одного или нескольких из следующих эффектов: пониженная передача сигналов NF- $\kappa$ B; пониженная передача сигналов Wnt/ $\rho$ -катенин; пониженная стволовость AML клеток; или комбинация вышеперечисленных. Что касается молекул антител, которые связываются с TIM3, молекулы антител могут ингибировать взаимодействие TIM-3 с одним или несколькими взаимодействующими с TIM-3 белками. Взаимодействующие с TIM-3 белки могут быть выбраны из: CEACAM-1; HMGB-1; фосфатидилсерина; галектина-9; и их комбинаций. В одном варианте осуществления молекула антитела, которая связывается с TIM-3, ингибирует взаимодействие TIM-3 с его лигандом галектином-9.

В некоторых вариантах осуществления включенная в комбинации молекула антитела к LSC мишени ингибирует взаимодействие TIM-3 и LILRB2. В таких вариантах осуществления молекула антитела предпочтительно связывается с TIM-3 и ингибирует связывание TIM-3 с LILRB2.

Молекулы антител, которые связываются с TIM-3 и которые могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, антитела к TIM-3, описанные в любом из следующих: US 8647623; US 8552156; US 9605070; US 8841418; US 9631026; US 9556270; WO 2016/111947, каждый из которых включен в настоящее изобретение посредством ссылки. Молекулы антител, которые связываются с TIM-3 и которые могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении, также включают, но не ограничиваются этим: клон F38-2E2; MBG453

(Novartis); АТІК2а (Kyowa Kirin).

Молекулы антител, которые связываются с Галектином-9 и которые могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, клон 9M1-3.

Антитела к CD47.

В некоторых вариантах осуществления комбинации по изобретению включают молекулу антитела, которая связывается с CD47. Молекулы антител к CD47 для применения в комбинациях, описанных в настоящем изобретении, представляют собой молекулы антител, которые ингибируют взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ . Как указано в настоящем изобретении, взаимодействие между лигандом CD47, экспрессируемым LSC, и рецептором SIRP $\alpha$ , экспрессируемым фагоцитарными клетками, передает сигнал "не ешь меня" по нисходящему пути от SIRP $\alpha$  рецептора. Молекулы антител к CD47 комбинаций, описанных в настоящем изобретении, поэтому могут повышать фагоцитоз опухолевых клеток, в частности LSC.

Известны различные антитела к CD47, в том числе антитела к CD47 на разных стадиях клинической разработки. Специалистам в данной области будет понятно, что любое антитело к CD47, подходящее для применения в лечении человека, может быть включено в комбинации, описанные в настоящем изобретении. Примеры антител к CD47 включают, но не ограничиваются этим, Hu5F9-G4; CC-90002; ALX148 и клон B6H12.2.

Антитела к IL1RAP.

В некоторых вариантах осуществления комбинации по изобретению включают молекулу антитела, которая связывается с IL1RAP. Молекулы антител к IL1RAP для применения в комбинациях, описанных в настоящем изобретении, предпочтительно представляют собой молекулы антител, которые связываются с IL1RAP и ингибируют передачу сигналов через комплекс IL-1 рецептора на клеточной поверхности.

Антитела к IL1RAP были описаны, см. Agerstam et al. (2015) *ibid*, а также WO 2012/098407 и WO 2014/100772. Специалистам в данной области будет понятно, что любое антитело к IL1RAP, подходящее для применения в лечении человека, может быть включено в комбинации, описанные в настоящем изобретении.

Происходящие от верблюдовых антитела к LSC мишеням.

Молекулы антител, специфически связывающиеся с LSC мишенями, в частности, молекулы антител специфически связывающиеся с TIM-3, галектином-9, CD47, IL1RAP и/или LILRB2, могут происходить от верблюдовых.

Например, молекулы антител могут быть выбраны из иммунных библиотек, полученных способом, включающим стадию иммунизации животного из семейства верблюдовых LSC мишенью, представляющей интерес. Животное из семейства верблюдовых можно иммунизировать LSC белком-мишенью или его полипептидным фрагментом, или молекулой мРНК или молекулой кДНК, экспрессирующей белок или его полипептидный фрагмент. Способы продуцирования антитела в животных семейства верблюдовых и выбора антител против предпочтительных мишеней из иммунных библиотек верблюдовых описаны, например, в Международной патентной заявке № WO2010/001251, включенной в настоящее изобретение посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител могут происходить от верблюдовых в том смысле, что они включают по меньшей мере одну гипервариабельную петлю или определяющую комплементарность область, полученную из VH домена или VL домена вида семейства верблюдовых. В частности, молекула антитела может включать VH и/или VL домены, или их CDRs, полученные путем активной иммунизации аутобредных животных семейства верблюдовых, например лам, например TIM-3, Галектином-9, CD47 или IL1RAP.

Термин "полученный из" в данном контексте подразумевает структурную взаимосвязь в том смысле, что области HV или CDR молекулы антитела включают аминокислотную последовательность (или ее минорные варианты), которая первоначально была кодирована геном иммуноглобулина животного семейства верблюдовых. Однако это не обязательно подразумевает определенную взаимосвязь с точки зрения производственного процесса, используемого для получения молекулы антитела.

Происходящие от верблюдовых молекулы антител могут быть получены из любого вида верблюдовых, включая, среди прочего, ламу, дромадера, альпаку, викунию, гуанако или верблюда.

Молекулы антител, включающие происходящие от верблюдовых VH и VL домены или их CDR, обычно являются рекомбинантно экспрессируемыми полипептидами и могут быть химерными полипептидами. Термин "химерный полипептид" относится к искусственному (не встречающемуся в природе) полипептиду, который создан путем соединения двух или более пептидных фрагментов, которые иначе не встречаются в смежном положении. В это определение включены "видовые" химерные полипептиды, созданные путем соединения пептидных фрагментов, кодируемых двумя или более видами, такими как верблюд и человек.

В некоторых вариантах осуществления весь VH домен и/или весь VL домен можно получить из вида семейства верблюдовых. В конкретных вариантах осуществления происходящий от верблюдовых VH домен может включать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID No: 9, 11, 13, 15, 17,

19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 121 и 123, тогда как происходящий от верблюдовых VL домен может включать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID No: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 122 и 124. Происходящий от верблюдовых VH домен и/или происходящий от верблюдовых VL домен затем можно подвергнуть методу белковой инженерии, в котором одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций вводят в аминокислотную последовательность, происходящую от животного из семейства верблюдовых. Эти сконструированные изменения предпочтительно включают замены аминокислот по сравнению с последовательностью, происходящей от животного из семейства верблюдовых. Такие изменения включают "гуманизацию" или "приведение к зародышевой линии", где один или несколько аминокислотных остатков в кодируемом происходящей от верблюдовых последовательностью VH или VL домене заменены эквивалентными остатками из гомологичного кодируемого человеческой последовательностью VH или VL домена. В некоторых вариантах осуществления происходящий от верблюдовых VH домен может демонстрировать по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, показанной как SEQ ID No: 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 121 и 123. Альтернативно, или в дополнение, происходящий от верблюдовых VL домен может демонстрировать по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, показанной как SEQ ID No: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 122 и 124.

Выделенные VH и VL домены верблюдовых, полученные путем активной иммунизации животного из семейства верблюдовых (например, ламы) LSC антигеном-мишенью (например), можно использовать в качестве основы для конструирования молекул антител для применения в комбинациях, описанных в настоящем изобретении. Исходя из интактных VH и VL доменов верблюдовых, можно сконструировать одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций, которые отличаются от исходной последовательности верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления такие замены, вставки или делеций могут присутствовать в каркасных областях VH домена и/или VL домена.

В других вариантах осуществления обеспечиваются "химерные" молекулы антител, включающие происходящие от верблюдовых VH и VL домены (или их сконструированные варианты) и один или несколько константных доменов из антитела не верблюдовых, например кодируемые человеческой последовательностью константные домены (или их сконструированные варианты). В таких вариантах осуществления предпочтительно, чтобы оба VH домен и VL домен были получены от одного и того же вида верблюдовых, например оба VH и VL могут быть от ламы *glama*, или оба VH и VL могут быть от ламы *rasos* (до внедрения сконструированного варианта аминокислотной последовательности). В таких вариантах осуществления оба VH и VL домен могут происходить от одного животного, в частности одного животного, которое было активно иммунизировано антигеном, представляющим интерес.

В качестве альтернативы конструированию изменений в первичной аминокислотной последовательности VH и/или VL доменов верблюдовых, отдельные происходящие от верблюдовых гипервариантные петли или CDRs, или их комбинации, можно выделить из VH/VL доменов верблюдовых и перенести в альтернативный (т.е. не от верблюдовых) каркас, например человеческий VH/VL каркас, путем CDR прививки.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител, которые связываются с TИМ-3, выбраны из молекул антител, включающих комбинацию CDR3 переменного домена тяжелой цепи (HCDR3), CDR2 переменного домена тяжелой цепи (HCDR2) и CDR1 переменного домена тяжелой цепи (HCDR1), CDR3 переменного домена легкой цепи (LCDR3), CDR2 переменного домена легкой цепи (LCDR2) и CDR1 переменного домена легкой цепи (LCDR1), выбранную из следующих:

- (i) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 41; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 40; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 39; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 80; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 79; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 78;
- (ii) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 43; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 42; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 39; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 83; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 82; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 81;
- (iii) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 46; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 45; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 44; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 86; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 85; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 84;
- (iv) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 49; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 48; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 47; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 88; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 82; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 87;
- (v) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 51; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 50; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 91; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 90; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 89;
- (vi) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 55; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 54; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 53; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 94; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 93; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 92;
- (vii) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 58; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 57; HCDR1, содержащая



или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей;

(x) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей;

(xi) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей;

(xii) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей;

(xiii) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей;

(xiv) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей;

(xv) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител, которые связываются с IL1RAP, выбраны из молекул антител, включающих комбинацию CDR3 переменного домена тяжелой цепи (HCDR3), CDR2 переменного домена тяжелой цепи (HCDR2) и CDR1 переменного домена тяжелой цепи (HCDR1), CDR3 переменного домена легкой цепи (LCDR3), CDR2 переменного домена легкой цепи (LCDR2) и CDR1 переменного домена легкой цепи (LCDR1), выбранную из следующих:

(i) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 127; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 126; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 125; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 133; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 132; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 131; и

(ii) HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 130; HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 129; HCDR1, содержащая SEQ ID NO: 128; LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 136; LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 135; и LCDR1, содержащая SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител, которые связываются с IL1RAP, выбраны из молекул антител, включающих или состоящих из переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранных из следующих:

(i) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей; и

(ii) VH домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей, и VL домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей.

Для вариантов осуществления, где домены антител или антиген-связывающие фрагменты определены по конкретному проценту идентичности последовательности с референсной последовательностью, VH и/или VL домены могут сохранять последовательности CDR, идентичные тем, которые присутствуют в референсной последовательности, чтобы таким образом изменение присутствовало только в каркасных областях.

Молекулы антител, включающие происходящие от верблюдовых домены VH и VL, или их CDR, могут принимать множество различных форм антител, в которых присутствуют оба VH домен и VL домен. Антитела и антиген-связывающие фрагменты, охватываемые определением "молекула антитела", используемым в контексте заявленных комбинаций, описаны в настоящем изобретении.

Формулирование комбинации.

Различные молекулы антител, используемых в комбинациях, можно комбинировать или формулировать любым способом, обеспечивающим возможность введения комбинированной терапии субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом, предпочтительно субъекту-человеку или пациенту. Комбинацию

можно сформулировать для однократного введения или для введения в виде нескольких доз.

Для вариантов осуществления, где молекулы антител представляют собой антиген-связывающие фрагменты, молекулы антител можно комбинировать в виде мультиспецифического антитела, например биспецифического антитела. Например, если комбинация включает Fab фрагмент, который связывается с CD70, и Fab фрагмент, который связывается с LSC мишенью, эти два Fab фрагмента могут быть включены в одну биспецифическую молекулу антитела, имеющую две Fab области, конъюгированные с IgG Fc частью. В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из мультиспецифического антитела, предпочтительно биспецифического антитела, включающего молекулу антитела, которая связывается с CD70, и молекулу антитела, которая связывается с TIM-3. В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из мультиспецифического антитела, предпочтительно биспецифического антитела, включающего молекулу антитела, которая связывается с CD70, и молекулу антитела, которая связывается с CD47. В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из мультиспецифического антитела, предпочтительно биспецифического антитела, включающего молекулу антитела, которая связывается с CD70, и молекулу антитела, которая связывается с CD47. В некоторых вариантах осуществления комбинация включает или состоит из мультиспецифического антитела, предпочтительно биспецифического антитела, включающего молекулу антитела, которая связывается с CD70, и молекулу антитела, которая связывается с IL1RAP.

Биспецифические или мультиспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконфигурированы в соответствии с любым подходящим форматом биспецифического/мультиспецифического антитела, как описано в настоящем изобретении. Например, молекулы антител комбинации могут быть объединены в формат биспецифического или мультиспецифического антитела так, чтобы антитело связывалось с разными мишенями в "транс" положении, например, ситуация, где каждое Fab плечо Y-образного антитела имеет разную специфичность связывания. В альтернативных вариантах осуществления молекулы антител могут быть объединены в формат биспецифического или мультиспецифического антитела так, чтобы мишени связывались в "цис" положении. Например, Fab области или их варибельные домены могут быть расположены на противоположных концах Fc части IgG. В некоторых вариантах осуществления молекулы антител могут быть объединены в формат асимметричного биспецифического IgG антитела, где первая молекула антитела представляет собой Fab фрагмент, образующий одно плечо "Y"-образного антитела, а вторая молекула антитела представляет собой VHH домен.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител комбинации являются отдельными молекулами, которые совместно сформулированы, т.е. сформулированы в виде одной фармацевтической композиции. Для вариантов осуществления, где молекулы антител совместно сформулированы, комбинация или композиция является подходящей для одновременного введения двух компонентов. Композицию можно сформулировать для однократного введения или для введения в виде нескольких доз. Для вариантов осуществления, в которых молекулы антител совместно сформулированы, молекулы антител могут быть сформулированы в эквивалентных количествах, например в соответствии с 1:1 соотношением для комбинации, включающей первую и вторую молекулы антител, связывающиеся с разными мишенями. Альтернативно, молекулы антител можно сформулировать так, чтобы соотношение разных молекул антител не было 1:1. Например, для вариантов осуществления, где комбинация включает или состоит из первой и второй молекулы антител, связывающихся с разными мишенями, соотношение первой и второй молекулы антител может быть 2:1, при необходимости 3:1, при необходимости 4:1. Альтернативно, молекулы антител могут быть сформулированы в соответствии с соотношением 1:2, при необходимости 1:3, при необходимости 1:4.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител комбинации сформулированы отдельно, например в виде отдельных композиций. Для вариантов осуществления, в которых молекулы антитела сформулированы отдельно, существует возможность одновременного или раздельного введения различных компонентов или композиций. Если молекулы антител или отдельные композиции, содержащие их, вводят отдельно, это может быть последовательное введение молекул или композиций антител в любом порядке. Например, молекула антитела, которая связывается с CD70, может быть введена первой, а затем молекула антитела, которая связывается с мишенью на лейкозных стволовых клетках, или наоборот. Интервал между введением молекул или композиций антител может быть любым подходящим временным интервалом. Введение различных композиций можно осуществлять один раз (для введения одной дозы) или многократно (для введения нескольких доз).

Для вариантов осуществления, в которых молекулы антитела сформулированы совместно, и/или для вариантов осуществления, в которых молекулы антител представлены в виде отдельных композиций, молекулы антител могут быть сформулированы с использованием любых подходящих фармацевтических носителей или эксципиентов. Способы формулирования композиций антител для терапевтического применения для человека хорошо известны в данной области и рассматриваются, например, в Wang et al. (2007) *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96:1-26, содержание которого включено в настоящее изобретение во всей полноте. Для вариантов осуществления, в которых молекулы антител сформулированы отдельно, фармацевтические носители или эксципиенты могут быть разными для разных композиций или одинаковыми.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, которые можно использовать для формулирования композиций, включают, но не ограничиваются этим, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюми-

ния, лецитин, белки сыворотки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, динатрийгидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы (например, натрий карбоксиметилцеллюлоза), полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропилен блок-сополимеры, полиэтиленгликоль и ланолин.

В некоторых вариантах осуществления композиции формулируют для введения субъекту любым подходящим путем введения, включая, но не ограничиваясь этим, внутримышечную, внутривенную, внутрикожную, интраперитонеальную инъекцию, подкожное, эпидуральное, назальное, пероральное, ректальное, местное, ингаляционное, буккальное (например, сублингвальное) и трансдермальное введение. Для вариантов осуществления, в которых молекулы антител сформулированы отдельно, каждая композиция может быть сформулирована для введения другим путем.

Для комбинаций по изобретению, включающих или состоящих из средств в дополнение к молекуле антитела к CD70 и молекуле антитела к LSC мишени, одно или несколько дополнительных средств могут быть сформулированы для введения тем же путем или другим путем по сравнению с первой и второй молекулами антител. Например, в вариантах осуществления, где комбинация включает молекулу антитела, которая связывается с CD70, молекулу антитела, которая связывается с LSC мишенью, и азацидин, молекулы антитела можно вводить внутривенно, в то время как азацидин можно вводить подкожно посредством инъекции.

### С. Комбинированная терапия с анти-CD70 антителами и ингибиторами SIRP $\alpha$ .

Во втором аспекте комбинации или комбинированные терапии по изобретению включают или состоят из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и средства, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ . Молекулы антител, которые связываются с CD70 и которые подходят для использования в комбинациях по настоящему изобретению, описаны выше, и все варианты осуществления, представленные в контексте первого аспекта изобретения, в равной степени применимы к этому второму аспекту.

В комбинациях или комбинированной терапии второго аспекта изобретения молекулу антитела, которая связывается с CD70, объединяют с средством, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ . Как объясняется выше, SIRP представляет собой рецептор, экспрессируемый на поверхности фагоцитарных клеток, включая, в частности, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки. SIRP $\alpha$  является рецептором для лиганда CD47, и этот лиганд экспрессируется на поверхности множества различных типов клеток. Связывание CD47 с SIRP $\alpha$  запускает внутриклеточный сигнальный путь ниже SIRP $\alpha$  внутри фагоцита, который служит для даун-регуляции фагоцитарной активности. Следствием этого является то, что сигнальная ось CD47-SIRP $\alpha$  способствует выживанию CD47-экспрессирующих клеток, предотвращая клиренс этих клеток фагоцитарными клетками иммунной системы.

В контексте настоящего изобретения термин "средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ " предназначен для обозначения любого средства, которое влияет на ось передачи сигналов CD47-SIRP $\alpha$  таким образом, что сигнал "не ешь меня", генерируемый этим путем, подавляется. В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой молекулу антитела, которая связывает CD47 и ингибирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ . В других вариантах осуществления средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой молекулу антитела, которая связывает SIRP $\alpha$  и ингибирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ . Антитела, которые связываются с CD47 и SIRP $\alpha$ , соответственно, известны в данной области и могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении. Примеры антител против SIRP, подходящих для использования в описанных в настоящем изобретении комбинациях, включают, но не ограничиваются этим: клон KWAR23; клон B4B6; и клон OX-119.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела. Как определено выше, слитые белки SIRP $\alpha$ -молекула антитела включают SIRP $\alpha$  или его фрагмент вместе с антителом или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела включает по меньшей мере одну копию иммуноглобулинового V-подобного домена SIRP $\alpha$ , при необходимости множественные копии этого иммуноглобулинового V-подобного домена SIRP $\alpha$ .

В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , включает SIRP $\alpha$  или его иммуноглобулин V-подобный домен, ковалентно связанный с Fc-областью антитела, например антитела IgG1. В одном варианте осуществления средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой TTI-621 (Trillium Therapeutics Inc).

В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , включает SIRP $\alpha$  или его иммуноглобулиновый V-подобный домен, ковалентно связанный с полноразмерным антителом IgG, например полноразмерным антителом IgG1.

В предпочтительных вариантах осуществления комбинации в соответствии с этим вторым аспектом

изобретения комбинация включает или состоит из молекулы антитела, которая связывается с CD70, где молекула антитела связана с SIRP $\alpha$  или связана по меньшей мере с одной копией иммуноглобулинового V-подобного домена SIRP $\alpha$ . Связь предпочтительно является ковалентной. Молекула антитела против CD70 может быть связана с несколькими копиями иммуноглобулин V-подобного домена SIRP $\alpha$ , например, двумя, тремя, четырьмя или более копиями. Молекула антитела против CD70 может быть связана прямо или косвенно с доменом SIRP $\alpha$  через линкер, например, полиглицин-сериновый линкер.

Для вариантов осуществления, в которых молекула антитела CD70 связана, предпочтительно ковалентно связана, по меньшей мере с одной копией иммуноглобулинового V-подобного домена SIRP $\alpha$ , молекула антитела к CD70 предпочтительно включает переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL включают последовательности CDR:

HCDR3, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 3;  
 HCDR2, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 2;  
 HCDR1, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 1;  
 LCDR3, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 7;  
 LCDR2, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 6; и  
 LCDR1, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD70 и которая связана с по меньшей мере одной копией иммуноглобулинового V-подобного домена SIRP $\alpha$ , включает переменный домен тяжелой цепи (VH домен), содержащий или состоящий из последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 4, и переменный домен легкой цепи (VL домен), содержащий или состоящий из последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD70 и которая связана с по меньшей мере одной копией иммуноглобулинового V-подобного домена SIRP $\alpha$ , включает переменный домен тяжелой цепи (VH домен), содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4, и переменный домен легкой цепи (VL домен), содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 8.

#### D. Дополнительные средства.

Комбинации в соответствии с первым и вторым аспектами изобретения могут включать, в дополнение к молекулам антител и средствам, описанным выше, одно или несколько дополнительных противоопухолевых средств. Например, комбинации могут включать по меньшей мере одно дополнительное средство для лечения миелоидного злокачественного заболевания, в частности для лечения AML.

В некоторых вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают нуклеозидный метаболический ингибитор (или NMI). Например, комбинации могут включать гипометилирующее средство, например азациитидин (также указанный в настоящем изобретении как азациитидин, AZA или аза) или децитабин. Азациитидин является аналогом цитидина, а децитабин представляет собой его дезокси-производное. AZA и децитабин являются ингибиторами ДНК метилтрансфераз (DNMT), которые известны как активирующие экспрессию генов путем гипометилирования промотора. Такое гипометилирование нарушает клеточную функцию, приводя, таким образом, к цитотоксическим эффектам.

В конкретных вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают или состоят из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с TIM-3, и азациитидина. В конкретных вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают или состоят из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с TIM-3, и децитабина. В конкретных вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают или состоят из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с CD47, и азациитидина. В конкретных вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают или состоят из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с CD47, и децитабина. В конкретных вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают или состоят из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с IL1RAP, и азациитидина. В конкретных вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают или состоят из молекулы антитела, которая связывается с CD70, и молекулы антитела, которая связывается с IL1RAP, и децитабина.

Без ограничения какой-либо теорией, комбинации, включающие молекулу антитела к CD70, молекулу антитела, которая связывается с LSC мишенью, и гипометилирующее средство, например азациитидин или децитабин, считаются особенно эффективными для лечения злокачественного заболевания, в частности миелоидного злокачественного заболевания, благодаря совместным действиям активных веществ. Как описано выше, CD70, TIM-3, CD47 и IL1RAP все были идентифицированы как мишени с повышенным уровнем экспрессии на лейкозных стволовых клетках. Также было обнаружено, что экспрессия CD70 повышена на поверхности AML бластах и лимфоцитах пациентов, которых лечили нук-

леозидным метаболическим ингибитором азациитидином (см. Richardson & Patel (2014) *Nat Rev Rheumatol.* 10:72-74; Riether et al. (2015) *Science Transl Med.* 7:1-12; Zhou et al. (2011) *Lupus* 20:1365-1371, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки). Из этого следует, что азациитидин, добавленный к комбинациям, описанным в настоящем изобретении, например в виде тройной комбинации, может служить для повышающей регуляции экспрессии CD70 на LSC-мишенях, повышая таким образом эффективность двойной комбинированной терапии, нацеленной на CD70-LSC.

В некоторых вариантах осуществления комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают ингибитор PD-1 (также известный как "белок 1 запрограммированной клеточной гибели" или "CD279"). Альтернативно или в дополнение, комбинации, описанные в настоящем изобретении, могут включать ингибитор PD-L1 или PD-L2 (лиганды PD-1).

PD-1 и его лиганды, в частности PD-L1, были относительно хорошо охарактеризованы как регуляторы иммунных контрольных точек, и нарушение регуляции сигнального пути PD-1-PD-L1 в раковом микроокружении было идентифицировано как важное средство, посредством которого опухоли подавляют иммунный ответ. Рецептор PD-1 обычно экспрессируется на множестве иммунных клеток, включая моноциты, Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и опухоль-инфильтрующие лимфоциты, и было обнаружено, что лиганд PD-L1 активируется на ряде различных типов опухолевых клеток (см. Ohaegbulam et al. (2015) *Trends Mol. Med.* 21 (1):24-33, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки). Взаимодействие между PD-L1 на опухолевых клетках и PD-1 на иммунных клетках, в частности на Т-клетках, создает иммуносупрессивное опухолевое микроокружение посредством эффектов на уровне CD8+ цитотоксических Т-клеток, а также посредством генерации Treg клеток (см. Alsaab et al. (2017) *Front Pharmacol.* Aug 23 (8):561, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки).

Без ограничения какой-либо теорией, считается, что комбинации, включающие или состоящие из молекулы антитела к CD70, молекулы антитела к TIM-3 и ингибитора PD-1 или ингибитора PD-L1, особенно эффективны для лечения злокачественных новообразований, особенно миелоидного злокачественного новообразования, благодаря совместным действиям активных веществ. Как отмечено выше, CD70 и TIM-3 являются мишенями иммунных контрольных точек, и поэтому объединение молекул антител, специфически связывающихся с этими мишенями, со средством или средствами, которые ингибируют третью мишень иммунной контрольной точки, может быть особенно эффективным для лечения злокачественной опухоли. На модели солидных опухолей было также показано, что комбинированное таргетирование TIM-3 и PD-1 является особенно эффективным терапевтическим подходом (Sakushi et al. 2010. *J Exp Med.* 207 (10):2187-2194). Отсюда следует, что ингибиторы PD-1 и/или PD-L1, добавленные к комбинациям, описанным в настоящем изобретении, например, в качестве стратегии тройной комбинации, могут дополнительно повысить эффективность двойной комбинированной терапии CD70-TIM3.

Средство, способное ингибировать PD-1 или PD-L1, может представлять собой любое подходящее противораковое средство или ингибитор, обладающий специфичностью в отношении PD-1, PD-L1 или сигнальной оси PD1-PD-L1. Было разработано множество средств, способных ингибировать активность PD-1, PD-L1 или сигнальной оси PD1-PD-L1, как описано, например, в Alsaab et al. *ibid* (включен посредством ссылки), и любое из этих средств может быть включено в комбинации по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 и/или PD-L1 может представлять собой молекулу антитела, например моноклональное антитело.

Ингибиторы PD-1 для включения в комбинации, описанные в настоящем изобретении, могут быть выбраны из группы, включающей, но не ограничиваясь этим: ниволумаб; пембролизумаб; пидилизумаб, REGN2810; AMP-224; MEDI0680; и PDR001. Ингибиторы PD-L1 для включения в комбинации, описанные в настоящем изобретении, могут быть выбраны из группы, включающей, но не ограничиваясь этим: атезолизумаб; и авелумаб.

В некоторых вариантах осуществления комбинации по изобретению включают или состоят из четырех активных средств: (i) первая молекула антитела, специфически связывающаяся с CD70; (ii) вторая молекула антитела, специфически связывающаяся с TIM-3; (iii) гипометилирующее средство; и (iv) средство, способное ингибировать либо PD-1, либо PD-L1. Гипометилирующее средство предпочтительно представляет собой азациитидин. Будет понятно, что каждое из четырех активных средств может быть выбрано из любого из конкретных вариантов осуществления, описанных в настоящем изобретении для каждого активного средства.

Комбинации, описанные в настоящем изобретении, могут также включать одно или несколько дополнительных противораковых средств. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько дополнительных противораковых средств являются ингибиторами дополнительных мишеней иммунных контрольных точек.

Для вариантов осуществления в соответствии с первым аспектом изобретения комбинации могут дополнительно включать средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ . Средства, способные ингибировать передачу сигналов SIRP $\alpha$ , описаны выше в контексте комбинаций второго аспекта изобретения. Любое из этих средств может быть включено в качестве дополнительного компонента комбинаций, описанных в соответствии с первым аспектом изобретения. Для вариантов осуществления, в кото-

рых средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой слитый белок SIRP $\alpha$ -молекула антитела, молекула антитела, с которой связан белок SIRP $\alpha$  или его домен, предпочтительно представляет собой молекулу антитела комбинации, т.е. молекулу антитела, которая связывается с CD70, или молекулу антитела, которая связывается с LSC мишенью. В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой иммуноглобулиновый V-подобный домен SIRP $\alpha$  белка, и по меньшей мере одна копия этого домена слита с молекулой антитела к CD70 комбинации.

В некоторых вариантах осуществления комбинации как первого, так и второго аспектов изобретения содержат одно или несколько противораковых средств для применения при лечении миелоидных злокачественных новообразований, например одно или несколько средств, подходящих для применения при лечении AML. Средства, которые могут быть включены в комбинации, описанные в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим: Venetoclax; Vuxeos; Idhi (или эназидениб - ингибитор IDH); и Rydapt (мидостаурин - ингибитор FLT3). В некоторых вариантах осуществления комбинации дополнительно включают Venetoclax. В некоторых вариантах осуществления комбинации дополнительно включают Vuxeos.

Любая из комбинаций, описанных в настоящем изобретении, может быть упакована в виде набора, необязательно включающего инструкции по применению.

Е. Способы лечения.

Комбинированные терапии, описанные в настоящем изобретении, предназначены для применения в способах лечения злокачественного заболевания у субъекта-человека.

Настоящее изобретение обеспечивает молекулу антитела, которая связывается с CD70, для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где молекулу антитела вводят в комбинации с второй молекулой антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке. Настоящее изобретение также относится молекулу антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где молекулу антитела вводят в комбинации второй молекулой антитела, которая связывается с CD70. Изобретение также относится молекулу антитела, которая связывается с CD70, для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где молекулу антитела вводят в комбинации со средством, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ .

Изобретение также относится средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека, где средство вводят в комбинации с молекулой антитела, которая связывается с CD70.

Настоящее изобретение также относится комбинации в соответствии с первым и вторым аспектами изобретения для применения в лечении злокачественного заболевания у субъекта-человека. Еще в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ для лечения злокачественного заболевания у субъекта-человека, содержащий введение субъекту комбинации в соответствии с первым или вторым аспектом изобретения. Все варианты осуществления, описанные выше в связи с комбинациями первого и второго аспектов изобретения, в равной мере применимы к способам, описанным в настоящем изобретении.

Термин "злокачественное заболевание" охватывает заболевания, при которых аномальные клетки пролиферируют неконтролируемым образом и проникают в окружающие ткани. Злокачественные клетки, попавшие в кровеносную и лимфатическую системы организма, способны проникать в дистальные участки тела и образовывать метастазы во вторичных местах.

В определенном варианте осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, предназначены для лечения злокачественных новообразований, включающих продуцирование раковых клеток-предшественников или стволовых клеток, экспрессирующих CD70, CD27 или оба. Как отмечено в настоящем изобретении, повышенная экспрессия CD70 была обнаружена при различных типах рака, включая почечно-клеточный рак, метастатический рак молочной железы, опухоли головного мозга, лейкозы, лимфомы и назофарингеальные карциномы. Коэкспрессия CD70 и CD27 была также обнаружена в злокачественных заболеваниях гемопоэтической линии, включая острую лимфобластную лимфому и Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, предназначены для лечения любой из вышеуказанных злокачественных опухолей, связанных с экспрессией CD70, экспрессией CD27 или обоими.

В определенном варианте осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, предназначены для лечения злокачественных заболеваний, включающих продуцирование раковых клеток-предшественников или стволовых клеток, экспрессирующих одну или несколько LSC мишеней, с которыми связывается молекула антитела из комбинации. Например, комбинации, включающие молекулу антитела, которая связывается с TIM-3, можно использовать для лечения TIM-3-экспрессирующих злокачественных заболеваний. Комбинации, включающие молекулу антитела, которая связывается с CD47, можно использовать для лечения CD47-экспрессирующих злокачественных заболеваний. Комбинации, включающие молекулу антитела, которая связывается с IL1RAP, можно использовать для лечения злокачественных заболеваний, экспрессирующих IL1RAP.

В конкретных вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, предназначены для лечения миелоидных злокачественных заболеваний, где миелоидное злокачественное заболевание относится к любому клональному заболеванию гемопоэтических стволовых или прогениторных клеток. Миелоидное злокачественное заболевание, которое лечат в соответствии со способами по изобретению, может быть впервые диагностированным миелоидным злокачественным заболеванием или рецидивирующим/рефрактерным миелоидным злокачественным заболеванием.

Как описано в настоящем изобретении, считается, что комбинации по настоящему изобретению особенно эффективны для лечения миелоидных злокачественных заболеваний по той причине, что CD70, TIM-3, ось CD47-SIRP $\alpha$  и IL1RAP были определены как ключевые терапевтические мишени в миелоидных злокачественных заболеваниях, особенно остром миелоидном лейкозе, см. Kikushige et al. (2015), *ibid*, Riether et al. (2017) *Ibid*, Theocharides et al. (2012) *Ibid*, Понсе и соавт. (2017) *ibid*, Agerstam et al. (2015) *ibid*.

В некоторых вариантах осуществления миелоидное злокачественное заболевание выбрано из: острого миелоидного лейкоза (AML); миелодиспластических синдромов (MDS); миелопролиферативных новообразований (MPN); хронического миелоидного лейкоза (CML); и хронических миеломоноцитарных лейкозов (CMML). В предпочтительных вариантах осуществления миелоидное злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML).

Миелоидные злокачественные заболевания можно классифицировать и диагностировать в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 года, взятой в сочетании с обновлением этой классификации в 2016 году, см., в частности, Arber et al. (2016) *Blood* 127 (20):2391-2405, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки.

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

Согласно классификации ВОЗ, AML в целом включает следующие подтипы: AML с рецидивирующими генетическими отклонениями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; связанные с терапией миелоидные новообразования; миелоидная саркома; миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна; бластное плазмцитоидное новообразование из 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 (миеломоноцитарный вместе с эозинофилией костного мозга); M5 (острый монобластный лейкоз (M5a) или острый моноцитарный лейкоз (M5b));

M6 (острые эритроидные лейкозы, включая эритролейкоз (M6a) и очень редкий чистый эритроидный лейкоз (M6b)); или M7 (острый мегакариобластный лейкоз).

В контексте настоящего изобретения 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 имеют промежуточный прогноз, а некоторые имеют плохой прогноз. Специалист в данной области понимает, какие подтипы попадают в какую категорию риска.

Миелодиспластический синдром (MDS) характеризуется дисплазией, цитопенией и/или аномальными изменениями насыщенности клетками костного мозга и/или миелоидной дифференцировкой, например повышенной инфильтрацией бластных клеток. Согласно классификации ВОЗ, MDS в целом включает следующие подтипы: MDS с дисплазией одной линии (ранее называемый "рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией", которая включает рефрактерную анемию, рефрактерную нейтропению и рефрактерную тромбоцитопению), MDS с кольцевыми сидеробластами, которые включают подгруппы с однолинейной дисплазией и многолинейной дисплазией (ранее называемый "рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами"); MDS с многолинейной дисплазией (ранее называемый "рефрактерная цитопения с многолинейной дисплазией"); MDS с избытком бластов (MDS-EB, ранее называемый "рефрактерная анемия с избытком бластов"), который можно далее подразделить на MDS-EB-1 и MDS-EB-2 на основе процента бластов; MDS с изолированным del (5q); и не классифицированный MDS.

MDS также можно классифицировать в соответствии с Франко-Американо-Британской (FAB) классификацией, включающей подтипы: M9980/3 (рефрактерная анемия (RA)); M9982/3 (рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (RARS)); M9983/3 (рефрактерная анемия с избытком бластов (RAEB)); M9984/3 (рефрактерная анемия с избытком бластов в процессе трансформации (RAEB-T)); и M9945/3 (хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML)).

В контексте настоящего изобретения 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 изобретении предпочтительна классификация ВОЗ.

Миелопролиферативные новообразования (MPN) сходны с MDS, но согласно классификации ВОЗ, MPN в целом включает следующие подтипы: хронический миелоидный лейкоз (CML); хронический нейтрофильный лейкоз (CNL); истинная полицитемия (PV); первичный миелофиброз (PMF); эссенциальная тромбоцитемия (ET); хронический эозинофильный лейкоз, без дополнительных уточнений; и неклассифицируемое MPN.

Хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML) и атипичный хронический миелолейкоз (aCML) попадают в категорию MDS/MPN расстройств в соответствии с классификацией ВОЗ по той причине, что они представляют собой миелоидные новообразования с клиническими, лабораторными и морфологическими признаками, которые перекрываются между MDS и MPN.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, включают контроль количества бластов у пациента, т.е. количества бластных клеток. В контексте настоящего изобретения термин "бластные клетки" или "бласты" относится к миелобластам или миелоидным бластам, которые представляют собой миелоидные клетки-предшественники в костном мозге. У здоровых людей бласты не обнаруживаются в периферическом кровообращении, и в костном мозге должно быть менее 5% бластных клеток. У субъектов с миелоидными злокачественными новообразованиями, особенно с AML и MDS, наблюдается повышенная продукция аномальных бластов с нарушенным потенциалом дифференцировки, и сверхпродукцию этих аномальных бластов можно обнаружить путем мониторинга количества бластов у пациента в периферическом кровообращении или в костном мозге, или и там и там.

Доля бластных клеток в костном мозге или периферической крови может быть оценена способами, известными в данной области, например, методом проточной цитометрии или путем оценки клеточной морфологии клеток, полученных из биопсии костного мозга субъекта или мазка периферической крови. Доля бластов определяется по отношению к общему количеству клеток в образце. Например, проточную цитометрию можно использовать для определения доли бластных клеток с использованием количества  $CD45^{dim}$ ,  $SSC^{low}$  клеток относительно общего количества клеток. В качестве другого примера, оценку клеточной морфологии можно использовать для определения количества морфологически идентифицированных бластов относительно общего количества клеток в исследуемом поле зрения.

В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы снижения доли бластных клеток в костном мозге до менее чем 25%, менее чем 20%, например менее чем 10%. В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы снижения доли бластных клеток в костном мозге до менее чем 5%. В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы снижения доли бластных клеток в костном мозге до примерно 5-25%, при этом процент бластных клеток костного мозга также снижается более чем на 50% по сравнению с процентом бластных клеток костного мозга до осуществления этого способа (или предварительного лечения).

В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы снижения доли бластных клеток в периферической крови до менее чем 25%, менее чем 20%, например менее чем 10%. В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы снижения доли бластных клеток в периферической крови до менее чем 5%. В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы снижения доли бластных клеток в периферической крови до примерно 5-25%, при этом процент бластных клеток в периферической крови также снижается более чем на 50% по сравнению с процентом периферических бластных клеток до осуществления этого способа (или предварительного лечения).

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

В конкретных вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, вызывают полный ответ. В контексте лечения AML полный ответ или "полная ремиссия" определяется как: количество бластов в костном мозге <5%; отсутствие циркулирующих бластов и бластов с палочками Ауэра; отсутствие экстрамедуллярного заболевания;  $ANC \geq 1,0 \times 10^9/\text{л}$  (1000 мкл); количество тромбоцитов  $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$  (100000 мкл), см. Döhner et al. (2017) Blood 129 (4): 424-447.

Способы могут достигать полного ответа с восстановлением тромбоцитов, т.е. ответа, при котором количество тромбоцитов составляет  $>100 \times 10^9/\text{л}$  (100000/мкл). Способы могут достигать полного ответа с восстановлением нейтрофилов, то есть ответа, при котором количество нейтрофилов составляет  $>1,0 \times 10^9/\text{л}$  (1000/мкл). Альтернативно или в дополнение, способы могут индуцировать отсутствие потребности в трансфузиях эритроцитов или тромбоцитов, или и тех и других, в течение 8 недель или дольше, 10 недель или дольше, 12 недель или дольше.

В конкретных вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, индуцируют статус минимального остаточного заболевания (или MRD), который является отрицательным.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, вызывают полный ответ без минимального остаточного заболевания ( $CR_{MRD}$ ), см. Döhner et al. *ibid*.

Способ может достигать частичного ответа или вызывать частичную ремиссию. В контексте лече-

ния AML частичный ответ или частичная ремиссия включают снижение процента бластов в костном мозге от 5% до 25% и уменьшение количества бластов в костном мозге, которое было до лечения, как минимум на 50%, см. Döhner et al. *ibid*.

Способы, описанные в настоящем изобретении, могут повышать выживаемость. В контексте настоящего изобретения термин "выживаемость" может относиться к общей выживаемости, 1-летней выживаемости, 2-летней выживаемости, 5-летней выживаемости, выживаемости без событий, выживаемости без прогрессирования. Способы, описанные в настоящем изобретении, могут повышать выживаемость по сравнению с золотым стандартом лечения для конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению. Золотой стандарт лечения также можно определить как лучшую практику, стандарт медицинской помощи, стандартную медицинскую помощь или стандартную терапию. Для любого конкретного заболевания может быть один или несколько золотых стандартов лечения в зависимости от различной клинической практики, например, в разных странах. Лечение, уже доступное для миелоидных злокачественных заболеваний, разнообразно и включает химиотерапию, лучевую терапию, трансплантацию стволовых клеток и некоторые таргетные терапии. Кроме того, клинические руководства как в США, так и в Европе регулируют стандартное лечение миелоидных злокачественных заболеваний, например AML, см. O'Donnell et al. (2017) *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 15(7):926-957 и Döhner et al. (2017) *Blood* 129(4):424-447, оба включены посредством ссылки.

Способы по настоящему изобретению могут увеличивать или улучшать выживаемость по сравнению с пациентами, подвергающимися любому стандартному лечению миелоидного злокачественного заболевания.

Пациенты или субъекты, которых лечат в соответствии с описанными в настоящем изобретении способами, особенно те, которые имеют AML, могут иметь впервые диагностированное заболевание, рецидив заболевания или первичное рефрактерное заболевание. Стандартным подходом к лечению пациентов с впервые диагностированным AML является подход "стандартная 7+3 интенсивная химиотерапия", характеризующийся 7-дневной высокой дозой цитарабина и 3-дневным введением антрациклина (например, даунорубицина или идарубицина). Интенсивную химиотерапию осуществляют с целью вызвать полную ремиссию AML, обычно с намерением пациента, подвергающегося трансплантации 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. Этих пациентов называют "не подходящими для стандартной интенсивной химиотерапии". Пациент может не подходить для стандартной интенсивной химиотерапии, потому что, например, у него проявляется одно или несколько сопутствующих заболеваний, указывающих на то, что он не переносит токсичность, или прогностические факторы, характеризующие его заболевание, указывают на неблагоприятный результат стандартной интенсивной химиотерапии. Годность отдельного пациента для стандартной интенсивной химиотерапии будет определять клиницист с учетом истории болезни отдельного пациента и клинических руководств (например, руководящих принципов National Comprehensive Cancer Network (NCCN), включенных в настоящее изобретение посредством ссылки). Пациенты с AML 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, который лечат.

Пациент, который не подходит для стандартной интенсивной химиотерапии, может вместо этого получать химиотерапию пониженной интенсивности, такую как низкие дозы цитарабина (LDAC). Пациенты, не подходящие для стандартной интенсивной химиотерапии и для которых не подходит LDAC, могут получить наилучшее поддерживающее лечение (BSC), включая гидроксимочевину (HU) и трансфузионную поддержку.

Пациенты или субъекты, которых лечат в соответствии с описанными в настоящем изобретении способами, могут быть отнесены к категории "не подходящих для стандартной интенсивной химиотерапии". Комбинации по изобретению включают таргетные терапии, которые, как можно прогнозировать, будут иметь меньше побочных эффектов. Таким образом, пациентов, считающихся не подходящими для стандартной интенсивной химиотерапии по любой из указанных выше причин, можно лечить комбинациями в соответствии с настоящим изобретением.

Способы, описанные в настоящем изобретении, могут включать дополнительную стадию трансплантации костного мозга пациенту или субъекту. Способы, описанные в настоящем изобретении, также можно использовать для подготовки пациента или субъекта, имеющего миелоидное злокачественное заболевание, к трансплантации костного мозга. Как описано выше, способы по настоящему изобретению можно осуществить таким образом, чтобы уменьшить абсолютное или относительное количество бластных клеток в костном мозге или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют таким образом, чтобы уменьшить количество бластных клеток в костном мозге и/или периферической крови перед трансплантацией. Способы можно использовать для уменьшения количества бластных клеток до менее чем 5% для подготовки пациента или субъекта к трансплантации костного мозга.

Способы, описанные в настоящем изобретении, могут включать введение дополнительных терапев-

тических средств, например, дополнительных противораковых средств. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение одного или нескольких средств для применения при лечении миелоидных злокачественных заболеваний, например средств, подходящих для применения при лечении AML. Такие средства включают, но не ограничиваются этим: Venetoclax; Vuxeo; Idhifa (или эназидениб - ингибитор IDH); и Rydapt (мидостаурин - ингибитор FLT3)

Включение посредством ссылки.

В представленном выше описании, а также в следующих примерах имеются ссылки на различные публикации, каждая из которых включена в настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте.

#### Примеры

Изобретение будет более понятно со ссылкой на следующие не ограничивающие примеры.

Пример 1.

Антитела, специфически связывающиеся с TIM-3, получали путем иммунизации ламы рекомбинантным человеческим TIM-3-Fc химерным белком (R&D Systems; Human TIM-3 Ser22 - Arg200; 2365-TM; Lot HKG081212A) при дозах 80 мкг (1<sup>-ая</sup> и 2<sup>-ая</sup> инъекция) и 40 мкг (инъекции 3-6) и создания библиотеки Fab для скрининга, как описано, например, в WO2010/001251, включенной в настоящее изобретение посредством ссылки.

Последовательности CDR, VH и VL клонов Fab, выбранных из библиотеки, показаны в таблицах 2, 3 и 4 ниже.

Таблица 2

VH и VL последовательности Fab, связывающихся с TIM-3

Клон Fab	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
1A11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGPWEVVS HINSGGGNTKYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNLTLPEDTAVYYCAK DVSGGYYGTYALDAWGQGTQVVVSS	9	SYELTQSPSVSVALKQTAHAБOPCGGDNIGSKSAQ WYQQKPGQAPVLVIYADSRPSPGIPERFSGSNSGNT ATLTISGAQAЕDEADYYCQVWDSSAAVFGGGTHLTVL	10
2A2	EVQVQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVVS DINSGGGSTVYTDVSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNLSKPDPTAVYYCATG GSYYSYRLFDYWGQGTQVTVSS	11	DIQMTQSPSSVIVSAGEKVTINCKSSQSVLDSSNQK NYLAWYQRLGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFSGS GSTTDFTLTISSFQPEDAAVYYCQQGYSVPVTFGQGT TKVELKR	12
2A6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYWYWRQAPGKGLEWVVS TINTNGAITLYADNVKDRFTVSRDN AKNTLYLQMNLSKSEDVAVYYCAK VKLSGYPHPHYAMDYWGKGLTVTVSS	13	NFMLTQPPSLSGSLGQSARLTCTLGSGNSIGAHTIS WYQQKAGSPPRYLLNYSDSSNHQASGVPSRFSGS KDDSTNAGLLISGLQPEDEADYYCAAGDGSQTVF GGGTKLTVL	14
2A9	QVQLVESGPGLVKPSQTLSTCTVSG GSITSDDAWSWIRQAPAGKLEWVG	15	EIVLTQSPSSVTASVGEKVTINCKSSQSVLSSNQKN YLSWYQRLGQSPRLITWASTRESGVPDRFSGSGS	16

	VIA YD GSTR YSPSLQSR TSI SRDTSKN QFSLQLSSVTPEDTAVYYCARTKGV GGTWALDAWGQGLVTVSS		TTDFTLTISSFPEDA AVYYCQQGYGAPLTFGQGTK VELKR	
2B6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFAFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVS TINSGGGSTNYADSMKGRFTISR DNA KNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAR SPYYTRVPLYDYWGQGTQVTVSS	17	QAVVTQEPSLSVSLGGTVTLTCGLRSGSVTTSNYPG WFKQTPGQAPRTLIFGASSRHSVPSRYSGSISGNK AALTITGAEPED EADYYCALNKGT YTDVFGGGTKL TVL	18
2B9	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG ASVTRYNYWSWIRQPPGKLEWVM GAITYSGSTYSPSLKSR TSI SRDTSK NQFTLQLSSVTPEDTAVYYCATEGSS STGVSRYSFSGWGQGTQVTVSS	19	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKASQSLTHTDGTT ALYWLQKPGQRPLLIEVSVRASGVDRFTGSG SGSDFTLKINGVKAEDAGVYYCAQVAYYPTFGQGT KVELK	20
2B10	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG GSITNRYLWTWIRQTPGKGLEWVG AIAYSGRTYSPSLKSR TSI SRDTSKN QFTLQLSSVTPEDTAVYYCAHFTGW GGYYWGQGTQVTVSS	21	QSALTQPPSVSGTLGKTVTISCACTSSDIGGYNVS WYQQLPGTAPKLLIEV NKRASGIPDRFSGSKSGNT ASLSISGLQSEDEADYYCASYRSANNVVFSGGKTL TVL	22
2C6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFAFSSYDMSWVRQAPGKGP EWVS TINSGGGSTYADSVKGRFTISR DNA KNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAR SLYYTRVPMYDYWGQGTQVTVSK	23	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSG SVTNNYPG WFKQTPGQAPRTLIYSSRHSVPSRFSGSISGNKA ALTITGAQPEDEADYYCALDIGSYTAVFGGGTHLT VL	24
2D11	EVQLVQPGAELRNPGASVKVSKAS GYFTMYIDWVRQAPGQGLEWVMG RIDPEDGGTKYAQK FQGRVFTADT STSTAYVELSSLRSED TAVYYCARIP NGGSYYTPYDYDYWGQGTQVTVS S	25	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLTSGSVTSSNYPG WYRQTPGQAPRPLIYNTNSRHPGVPSRYSGSISENK ATLTITGAEPED EADYYCALHKGSY TAVFGGGTHL TVL	26
2D6	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFFFSYAMS WVRQAPGKGLEWVSS ISAGGGTSYYADSVKGRFTISR DSAK NLTVLQMNSLKPEDTAVYYCAKKR QNFWSEGYDSWGQGTQVTVSS	27	HSAVTQPPSVSGSPGKAVTISCVGSSSDVGYGDYVS WYQQLPGMAPKLLIYDVEKRASGIPDRFSGSKSGN TASLTISGLQSEDEADYYCASYRSDSNVVFSGGTHL AVL	28
2E2	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFGSYDMSWVRQAPGKGP EWVS RITSGGGSTYADSVKGRFTISR DNA NLTSLQMNSLKSED TAVYYCAAGQ YSDGYYPYDYWGQGTQVTVSS	29	DIVMTQSPSSLASLGDRVTITCQASQSISSYLAWYQ QKPGQGP KLLIYGASRLEPGVPSRFSGS GTSFTLT ISGVEADLATYYCLQDYSWPYSFSGSTRLEIK	30
2E7	ELQVVEGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFGSYDMSWVRQAPRKGPEWVS TISAGGRTYYADSVKGRFTISR DNA KNTLYLQMNSLKPEDTAVYFCTKIV LDSWGQGTQVTVSS	31	DVVLTPGSLSVVPGESASISCKASQSLIHIDGKTY LYWLLQKPGRRPELLIYQVSNHESGVDRFTGSGSG TDFTLKISGVKAEDAGVYYCAQATYYPSFGSGTRL EIK	32
2E9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFDDYTMSWVRQVPGKLEWISG	33	DIVMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSSQSVVSGSNQK SYLNWYQQRPGQPPRLIYYASTQESGIPDRFSGSG	34

	ISGNGGRDYEVEIEGRFTISRDN AKNTLYLQMNLSKSEDTAVYYCAKTSP QSLDYWGQGTQVTVSS		STTDFTLTISSVQPEDAAVYYCQQA YSAPYNFSGSTRLEIK	
2F8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGSYDMSWVRQAPGK GPEWVSTISAGGRITYYADSVK DRFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCAKVVIDYWGQGT QVTVSS	35	DVVLTPGSLSVVPGESASISCK ASQSLVHTDGKTYVYWLLQK PGQRPHLLIYQVSNHESGV PDRFTGSGSGTDFTLKISG VKAEDAGVYYCAQATYYPS FGSGTRLEIK	36
2G6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KPEWVSGINTSGGTTSYAASV KGRFTVSRDNKNTLSLQMN SLEPEDTAVYYCVKHIRW SGSNYYYYGMDYWGKGLVTV SS	37	QAVLTQPPSVSGSPGQRFTIS CTGSNRNIGNNYVNWYQQL PGTAPKLLIYSDNLR TSGVPARFSASKSGTSS LTISGLQAEDEAVYYC SSWDDSLSGAVFGGG THLTVL	38

Таблица 3

## Последовательности CDR тяжелых цепей Fab, связывающихся с TIM-3

Клон Fab	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
1A11	SYAMS	39	HINSGGGNTKYADSV KG	40	DVSGGYGYALD A	41
2A2	SYAMS	39	DINSGGGSTVYTD SVKG	42	GGSYYSYRLFDY	43
2A6	NYWMY	44	TINTNGAITLYAD NVKD	45	VKLSGYPHPYA MDY	46
2A9	TSDDAWS	47	VIAYDGSTRYSP LSQS	48	TKGVGGT WALDA	49
2B6	SYDMS	50	TINSGGGSTNYA DSMKG	51	RSPYYTRV PLYDY	52
2B9	TRYNYWS	53	AITYSGSTYYSP SLKS	54	EGSSSTGVS RYSFGS	55
2B10	TNRYLWT	56	AIAYSGRTYYSP SLKS	57	FTGWGGYY	58
2C6	SYDMS	50	TINSGGGSTYAD SVK G	59	RSLYYTRV PMDY	60
2D11	MYYID	61	RIDPEDGGTKYA QKF QG	62	IPNGGSYYTP YDY DY	63
2D6	SYAMS	39	SISAGGTSYYAD SVK KG	64	KRQNF WSEGYS	65
2E2	SYDMS	50	RITSGGGSTYAD SVK G	66	GQYSDGY PYDY	67
2E7	SYDMS	50	TISAGGRITYYAD SVK KG	68	IVLDS	69
2E9	DYTMS	70	GISGNGGRDYE VEIE G	71	TSPQSLDY	72
2F8	SYDMS	50	TISAGGRITYYAD SVK KD	73	VVIDY	74
2G6	SYSMS	75	GINTSGGTTSYA ASV KG	76	HIRWSGS NYYYYG MDY	77

Таблица 4

## Последовательности CDR легких цепей Fab, связывающихся с TIM-3

Клон Fab	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
1A11	GGDNIGSKSAQ	78	ADSRRPS	79	QVWDSSAAV	80
2A2	KSSQSVLDSSNQKNY	81	WASTRES	82	QQGYSVPVT	83
	LA					
2A6	TLGSGNSIGAHTIS	84	YYSDSSNHQAS GV	85	AAGDGSGTV	86
	KSSQSVLSSNQKNY					
2A9	LS	87	WASTRES	82	QQGYGAPLT	88
2B6	GLRSGSVTTSNYPG	89	GASSRHS	90	ALNKGTYTDV	91
2B9	KASQSLTHTDGTAL	92	EVSVRAS	93	AQVAYYPT	94
	Y					
2B10	AGTSSDIGYNSVS	95	EVNKRAS	96	ASYRSANNVV	97
2C6	GLSSGSVTNNYPG	98	STSSRHS	99	ALDIGSYTAV	100
2D11	GLTSGSVTSSNYPG	101	NTNSRHP	102	ALHKGSYTAV	103
2D6	VGSSSDVGYGDYVS	104	DVEKRAS	105	ASYRSDSNFV	106
2E2	QASQSISSYLA	107	GASRLEP	108	LQDYSWPYS	109
2E7	KASQSLIHIDGKTYLY	110	QVSNHES	111	AQATYYPS	112
2E9	KSSQSVVSGSNQKSY	113	YASTQES	114	QQAYSAPYN	115
	LN					
2F8	KASQSLVHTDGKTYV	116	QVSNHES	111	AQATYYPS	117
	Y					
2G6	TGSRNIGNNYVN	118	SDNLRTS	119	SSWDDSLSGAV	120

Fab, показанные в таблицах выше, были охарактеризованы в отношении их связывания с TIM-3 с использованием Вiasоге анализа и ELISA. Результаты показаны в табл. 5 ниже.

Таблица 5

## Связывание клонов Fab с TIM-3, измеренное методом Вiasоге или ELISA

Клон Fab	Скорость диссоциации KD (1/сек)	EC50 (нг/мл)
2G6	3,72E-05	13,3
2D11	<i>очень высокая</i>	n/a
2A6	1,51E-04	10,36
2B9	4,87E-05	8,505
1A11	2,48E-05	10,05
2C6	1,04E-05	8,212
2B6	3,64E-05	8,518
2D6	1,66E-04	7,169
2E2	<i>очень высокая</i>	121,1
2A9	<i>высокая</i>	11,39
2A2	4,41E-05	8,047
2B10	1,85E-05	14,01
2E9	6,64E-05	14,86
2E7	7,62E-05	13,29
2F8	8,53E-05	18,07

## Пример 2.

Антитела, специфически связывающиеся с IL1RAP, получали путем иммунизации ламы рекомбинантным человеческим IL-1RAP/IL-1 R3 Fc химерным белком (R&D Systems: Ser21 Glu359/C-конца HIS-tagged; Cat No. 676-CP) и создания библиотеки Fab для скрининга, как описано, например, в WO 2010/001251, включенной в настоящее изобретение посредством ссылки.

Последовательности CDR, VH и VL клонов Fab, выбранных из библиотеки, показаны в таблицах 6, 7 и 8 ниже.

Таблица 6

## VH и VL последовательности Fab, связывающихся с IL1RAP

Клон Fab	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
1F10	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFIFINYGMHWVRQAPGKGLEWVSA VNSGGASTDYADSVKGRFTISRDDA KNTLYLQMNLSKSEDTAVYYCVKGG WVFGIHYWGKGLTVTVSS	121	QAVLTQLPSVSGSPGQHAБOPISCTGSSSNIGGG YSVQWFQHLPGTPPKLLIYGNSNRASGVPDRFS GSKSGSSASLTITGLQAEDEADYYCESYDDWL KGRGFGGSKLTVL	122
1C1	QVQLVESGPGLVKPSQTLSTCTVSG GSITTNYYSWIWRQPPGKGLEWMMG ASVYSGSTFYSPSLKNTSISKDTAQN QFTLQLRSVTPEDTAVYYCARASSA HWGSSFISIDYWGQGTQVTVSS	123	QSVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGN YVSWYQQLPGMAPKLLIYDVIDRASGIADRFSG SKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRTNNA VFGGGTHLTVL	124

Таблица 7

## Последовательности CDR тяжелых цепей Fab, связывающихся с IL1RAP

Клон Fab	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
1F10	NYGMH	125	AVNSGGASTDYADSV KG	126	GWFGIHY	127
1C1	TNYYSWI	128	ASVYSGSTFYSPSLKN	129	ASSAHWGSSFISID Y	130

Таблица 8

## Последовательности CDR тяжелых цепей Fab, связывающихся с IL1RAP

Клон Fab	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
1F10	TGSSSNIGGGYSVQ	131	GNSNRAS	132	ESYDDWLKGR G	133
1C1	AGTSSDVGYGNYVS	134	DVIDRAS	135	ASYRTNNNAV	136

Пример 3. Объединенная эффективность анти-TIM-3 и анти-CD70 антител, измеренная по ADCP активности.

Объединенную эффективность анти-TIM-3 и анти-CD70 антител оценивали путем измерения киллинга AML-происходящей клеточной линии BDCM, опосредованного антитело-зависимым клеточным фагоцитозом (ADCP). BDCM клетки с PKH26-мечеными клеточными мембранами обрабатывали разными концентрациями CD70-таргетирующего антитела ARGX-110 отдельно или в комбинации с 10 мкг/мл анти-TIM-3 антител, клоны 1A11 и 2B10 (человеческий IgG1) - см. пример 1. Способные к фагоцитозу макрофаги выделяли из моноцитарной THP-1 клеточной линии путем PMA обработки. Активированные макрофаги добавляли к BDCM клеткам, предварительно обработанным антителами, и коинкубировали с раковыми клетками в течение одного часа при 37°C. После промывки макрофаги окрашивали анти-CD11b-FITC антителами и осуществляли анализ проточной цитометрии для определения количества макрофагов с захваченными раковыми клетками (PKH26<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> дважды положительные макрофаги).

Как показано на фиг. 1, предварительная обработка CD70 и TIM-3-экспрессирующих BDCM клеток ARGX-110 и анти-TIM3 антителами вызывала значительное повышение фагоцитоза раковых клеток макрофагами. Это повышение наблюдали по сравнению с обработкой клеток только ARGX-110. Объединенная эффективность анти-TIM3 и анти-CD70 антител в ADCP-опосредованном киллинге AML клеток была показана дозозависимым образом.

Пример 4. Объединенная эффективность анти-IL1RAP и анти-CD70 антител, измеренная по ADCP активности.

Объединенную эффективность анти-IL1RAP и анти-CD70 антител оценивали путем измерения киллинга AML клеточных линий (MV4-11, U937 и THP-1), опосредованного антитело-зависимым клеточным фагоцитозом (ADCP). PKH126-окрашенные AML клеточные линии (MV4-11, U937, THP-1) обрабатывали разными концентрациями ARGX-110 отдельно или в комбинации с 10 мкг/мл или 1 мкг/мл анти-IL1RAP антитела (мышинные IgG1 клон 89412; IgG2a клон 7E4G1E8 mAbs; и человеческие моноклональные IgG1 антитела - клоны 1C1 и 1F10, см. пример 2). Анализ осуществляли, как описано в примере 3 выше. Результаты показаны на фиг. 2. Исходные значения фагоцитоза, измеренные в отсутствие какой-либо обработки, вычитали.

Как показано в фиг. 2, предварительная обработка CD70- и IL1RAP-экспрессирующих AML клеточных линий ARGX-110 и анти-IL1RAP антителами вызывала значительные повышения фагоцитоза раковых клеток макрофагами. Эти повышения наблюдали по сравнению с условиями, где раковые клетки обрабатывали только ARGX-110. Объединенные эффекты совместной обработки были показаны дозо-

зависимым образом. Кроме того, наблюдали синергическую эффективность, когда MV4-11 клетки обрабатывали комбинациями 1 или 10 мкг/мл ARGX-110 плюс 1C1 или IF10 антитела.

Пример 5. Объединенная эффективность анти-CD47 и анти-CD70 антител, измеренная по ADCP активности.

Объединенную эффективность анти-CD47 и анти-CD70 антител оценивали таким же способом, как описано выше в Примерах 3 и 4. РKN126-окрашенные AML клеточные линии (MV4-11, THP-1, GDM-1, U937 и MC-1010) обрабатывали разными концентрациями ARGX-110 отдельно или в комбинации с 10 мкг/мл или 1 мкг/мл анти-CD47 антител (мышинное IgG1 клон B6H12 и клон CC2C6, и мышинное IgG2b клон BRIC126). ADCP анализ осуществляли, как описано выше.

Как показано на фиг. 3А, предварительная обработка CD70- и CD47-экспрессирующих AML клеток ARGX-110 и анти-CD47 антителами вызывала повышение фагоцитоза раковых клеток макрофагами в случае некоторых из AML клеточных линий. Эффект совместной обработки ARGX-110 и блокирующим B6H12 антителом (которое блокирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ , промотируя таким образом фагоцитоз) также был показан дозозависимым образом с использованием MC-1010 клеток (Фиг. 3В).

Пример 6. Объединенная эффективность анти-TIM-3 и анти-CD70 антител, измеренная по CDC активности.

Объединенную эффективность анти-TIM-3 и анти-CD70 антител оценивали путем измерения комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). BDCM клетки обрабатывали разными концентрациями ARGX-110 отдельно или в комбинации с 10 мкг/мл анти-TIM-3 антителами (1A11 и 2B10 клоны - см. Пример 1). Предварительно обработанные клетки инкубировали с 10% раствором комплемента крольчонка (COM) в течение одного часа при комнатной температуре. Добавляли один объем PBS с пропидий иодидом (PI) и образцы инкубировали в темноте в течение пятнадцати минут для окрашивания мертвых клеток. Определение количества клеток и пропидий иодид-положительных клеток осуществляли методом проточной цитометрии (FACS Canto II). Результаты показаны на фиг. 4.

Совместная обработка BDCM клеток ARGX-110 и анти-TIM3 антителами вызывала повышение комплемент-зависимой клеточной гибели. Синергические эффекты комбинаций ARGX-110 и анти-TIM-3 антител наблюдали при концентрациях ARGX-110 между 0,37 и 0,125 мкг/мл, тогда как ARGX-110 отдельно могло индуцировать клеточную гибель, начиная с 1,11 мкг/мл концентрации. Эти синергические эффекты совместной обработки были показаны дозозависимым образом. Ни одно из анти-TIM-3 антител не было способно вызывать комплемент-зависимый лизис, когда его использовали отдельно в анализе.

Пример 7. Объединенная эффективность анти-IL1RAP и анти-CD70 антител, измеренная по CDC активности.

Объединенную эффективность анти-IL1RAP и анти-CD70 антител оценивали путем измерения комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). AML клеточные линии (MV4-11 и NOMO-1) обрабатывали разными концентрациями ARGX-110 отдельно или в комбинации с 10 мкг/мл анти-IL1RAP антителами (1C1 и IF10 клоны) и CDC анализ осуществляли, как описано в Примере 6. Результаты показаны на фиг. 5.

Совместная обработка ARGX-110 и анти-IL1RAP антителами повышала комплемент-зависимую клеточную гибель (фиг. 5, темные столбцы) обеих клеточных линий. MV4-11 клеточная линия была резистентной к обработке ARGX-110 и анти-IL1RAP, используемыми отдельно. Однако наблюдали синергический эффект при совместной обработке, вызывающей лизис MV4-11 клеток дозозависимым образом. ARGX-110-чувствительная клеточная линия NOMO-1 показала дозозависимый эффект после совместной обработки ARGX-110 и анти-IL1RAP антителами по сравнению с обработкой ARGX-110, используемым отдельно. В случае NOMO-1 клеток, монотерапия анти-IL1RAP антителами индуцировала ограниченную комплемент-зависимую цитотоксичность, когда антитела использовали при концентрации 10 мкг/мл.

Пример 8. Объединенная эффективность анти-CD47 и анти-CD70 антитела, измеренная по CDC активности.

Объединенную эффективность анти-CD47 и анти-CD70 антител оценивали путем измерения комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). MV4-11 и NOMO-1 клеточные линии обрабатывали разными концентрациями ARGX-110 и CDC-способного анти-CD47 антитела BRIC126 (мышинное IgG2b) отдельно или в комбинациях. CDC анализ осуществляли, как описано выше. Результаты показаны на фиг. 6.

Совместная обработка AML клеточных линий антителами ARGX-110 и BRIC126 повышала комплемент-зависимую клеточную гибель в обеих клеточных линиях, тогда как анти-CD47 блокирующее мышинное IgG1 антитело не было способно индуцировать ответ комплемента (B6H12 клон) (данные не показаны). Эффект совместной обработки антителами ARGX-110 и BRIC126 наблюдали дозозависимым образом с оптимальной концентрацией BRIC126 между 0,041 и 0,123 мкг/мл. Клеточная линия MV4-11 только слабо реагирует на ARGX-110, и поэтому необходима такая высокая концентрация, как 10 мкг/мл, для достижения объединенного эффекта. В ARGX-110-чувствительной клеточной линии, NOMO-1, клетки лизировали комплементом при в десять раз меньшей концентрации ARGX-110, используемым отдельно. Кроме того, добавление BRIC126, при около 0,1 мкг/мл, еще больше повышало лизис клеток комплементом. Монотерапия с BRIC126 при более высоких концентрациях также была способна

индуцировать комплемент-зависимую цитотоксичность.

Пример 9. Объединенная эффективность анти-TIM-3, анти-IL1RAP или анти-CD47 антител и анти-CD70 антител, измеренная по ADCC активности.

Эффективность анти-CD70 антитела ARGX-110 в комбинации с любым из анти-TIM-3 антител, анти-IL1RAP антител или анти-CD47 антител измеряли по антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Исследовали ADCC активность следующих комбинаций антител:

- 1) ARGX-110 (анти-CD70) и 2B10 (анти-TIM-3);
- 2) ARGX-110 (анти-CD70) и 1F10 (анти-IL1RAP);
- 3) ARGX-110 (анти-CD70) и CC2C6 (анти-CD47).

Для всех испытанных комбинаций, ADCC измеряли в соответствии со следующим протоколом. Здоровые мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) обрабатывали рекомбинантным IL-2 (200 МЕд./мл) в течение 15 часов. Клеточные линии BDCM и NOMO-1 использовали в качестве CD70-положительных клеток-мишеней, также экспрессирующих CD47 и TIM-3 или IL1RAP1, соответственно. Клетки-мишени (3E4 клетки) совместно культивировали с PBMC (3E5 клетки) в присутствии антител в RPMI 1640 среде с 10% FCS (96-луночный планшет). Мишень/эффектор (E/T) соотношение было 1/1. Применяли серию разведений ARGX-110 (0-10 мкг/мл) отдельно или в комбинации с антителами 2B10 (анти-TIM-3), 1F10 (анти-IL1RAP) или CC2C6 (анти-CD47) при концентрации 10 и 1 мкг/мл. Все антитела, за исключением CC2C6 (мышинное IgG1), были человеческого IgG1 изотипа. После 48 часов инкубации клетки анализировали методом проточной цитометрии и % лизиса измеряли на основании количества оставшихся клеток-мишеней (CD33<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup>). Результаты показаны на фиг. 7 (анти-CD70+анти-TIM-3), фиг. 8 (анти-CD70+анти-IL1RAP) и фиг. 9 (анти-CD70+анти-CD47).

Как показано на фиг. 7, оба анти-CD70 и анти-TIM-3 антитела показали сильную ADCC активность при отдельном применении и достигали максимального лизиса клеток 50-70% при концентрации 1 мкг/мл или выше. Объединенную активность наблюдали при более низкой концентрации ARGX-110 (<0,1 мкг/мл).

Как показано на фиг. 8, объединенная ADCC активность достигалась в диапазоне доз ARGX-110 при объединении с анти-IL1RAP антителом 1F10 при 1 мкг/мл. Эта комбинация достигала максимального лизиса клеток 70% при самой высокой испытанной концентрации ARGX-110 (10 мкг/мл). Анти-IL1RAP антитело 1F10 отдельно показало сильную ADCC активность при 10 мкг/мл, которая приводила к лизису клеток 60-70%.

Как показано на фиг. 9, объединенная ADCC активность достигалась в диапазоне доз ARGX-110 при объединении с анти-CD47 антителом CC2C6 при 1 или 10 мкг/мл. Эта комбинация достигала максимального лизиса клеток 80% при концентрациях ARGX-110 0,1 мкг/мл или выше.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая комбинация, содержащая молекулу антитела, которая связывается с CD70, и по меньшей мере одну молекулу антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке,

где мишень на лейкозной стволовой клетке выбрана из группы, состоящей из: TIM-3; CD47; и IL1RAP, и

где молекула антитела, которая связывается с CD70, содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домены VH и VL содержат последовательности CDR:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:3;

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:2;

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:1;

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:7;

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:6; и

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

2. Комбинация по п.1, где молекула антитела, которая связывается с CD70, содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID NO:4, и

домен VL, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID NO:8.

3. Комбинация по п.1 или 2, где молекула антитела, которая связывается с CD70, представляет собой ARGX-110.

4. Комбинация по любому из пп.1-3, где мишенью на лейкозной стволовой клетке является TIM-3.

5. Комбинация по любому из пп.1-3, где мишенью на лейкозной стволовой клетке является CD47.

6. Комбинация по любому из пп.1-3, где мишенью на лейкозной стволовой клетке является IL1RAP.

7. Комбинация по любому из пп.1-3, где комбинация включает молекулу антитела, которая связывается с первой мишенью на лейкозной стволовой клетке, и молекулу антитела, которая связывается со

второй мишенью на лейкозной стволовой клетке,

где первая и вторая мишени на лейкозных стволовых клетках являются разными.

8. Комбинация по п.7, где первая мишень на лейкозной стволовой клетке выбрана из группы, состоящей из: TIM-3; CD47; и IL1RAP, и вторая мишень на лейкозной стволовой клетке выбрана из группы, состоящей из: TIM-3; галектин-9; CD47; IL1RAP; LILRB2; CLL-1; CD123; CD33; SAIL; GPR56; CD44; E-селектин; CXCR4; CD25; CD32; PR1; WT1; ADGRE2; CCR1; TNFRSF1B и CD96.

9. Комбинация по п.7, где

первая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой TIM-3, и вторая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой CD47, или

первая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой TIM-3, и вторая мишень на лейкозной стволовой клетке представляет собой IL1RAP.

10. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, содержащая молекулу антитела, которая связывается с IL1RAP и/или молекулу антитела, которая связывается с TIM-3,

где указанная молекула антитела приводит к подавлению передачи сигналов NF-κB; к подавлению передачи сигналов WNT/передачи сигналов β-катенина; к снижению стволовости клеток AML; или к их комбинации.

11. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, содержащая молекулу антитела, которая связывается с TIM-3, где указанная молекула антитела ингибирует взаимодействие TIM-3 с одним или более взаимодействующими с TIM-3 белками.

12. Комбинация по п.11, где взаимодействующие с TIM-3 белки выбраны из: CEACAM-1; HMGB-1; фосфатидилсерина; галектина-9; LILRB2; или их комбинаций.

13. Комбинация по п.11, где

молекула антитела, которая связывается с TIM-3, ингибирует взаимодействие TIM-3 с галектином-9, или

молекула антитела, которая связывается TIM-3, ингибирует взаимодействие TIM-3 с LILRB2.

14. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, где молекула антитела или молекулы, которые связываются с мишенями на лейкозных стволовых клетках, выбраны из одной или более иммунных библиотек, полученных способом, включающим стадию иммунизации ламы мишенью(ями) на лейкозной стволовой клетке,

где ламу иммунизируют LSC белком-мишенью или его полипептидным фрагментом, или молекулой мРНК или молекулой кДНК экспрессирующей белок-мишень LSC или его полипептидный фрагмент.

15. Комбинация по любому из пп.1-4 и 7-14, содержащая молекулу антитела, которая связывается с TIM-3,

где указанная молекула антитела выбрана из группы, состоящей из молекул антитела, содержащих комбинацию CDR3 варибельной тяжелой цепи (HCDR3), CDR2 варибельной тяжелой цепи (HCDR2) и CDR1 варибельной тяжелой цепи (HCDR1), CDR3 варибельной легкой цепи (LCDR3), CDR2 варибельной легкой цепи (LCDR2) и CDR1 варибельной легкой цепи (LCDR1), выбранных из следующего:

(i) HCDR3, содержащей SEQ ID NO:41; HCDR2, содержащей SEQ ID NO:40; HCDR1, содержащей SEQ ID NO:39; LCDR3, содержащей SEQ ID NO:80; LCDR2, содержащей SEQ ID NO:79; и LCDR1, содержащей SEQ ID NO:78;

(ii) HCDR3, содержащую SEQ ID NO:43; HCDR2, содержащую SEQ ID NO:42; HCDR1, содержащую SEQ ID NO:39; LCDR3, содержащую SEQ ID NO:83; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:82; и LCDR1, содержащую SEQ ID NO:81;

(iii) HCDR3, содержащую SEQ ID NO:46; HCDR2, содержащую SEQ ID NO:45; HCDR1, содержащую SEQ ID NO:44; LCDR3, содержащую SEQ ID NO:86; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:85; и LCDR1, содержащую SEQ ID NO:84;

(iv) HCDR3, содержащую SEQ ID NO:49; HCDR2, содержащую SEQ ID NO:48; HCDR1, содержащую SEQ ID NO:47; LCDR3, содержащую SEQ ID NO:88; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:82; и LCDR1, содержащую SEQ ID NO:87;

(v) HCDR3, содержащую SEQ ID NO:52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO:51; HCDR1, содержащую SEQ ID NO:50; LCDR3, содержащую SEQ ID NO:91; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:90; и LCDR1, содержащую SEQ ID NO:89;

(vi) HCDR3, содержащую SEQ ID NO:55; HCDR2, содержащую SEQ ID NO:54; HCDR1, содержащую SEQ ID NO:53; LCDR3, содержащую SEQ ID NO:94; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:93; и LCDR1, содержащую SEQ ID NO:92;

(vii) HCDR3, содержащую SEQ ID NO:58; HCDR2, содержащую SEQ ID NO:57; HCDR1, содержащую SEQ ID NO:56; LCDR3, содержащую SEQ ID NO:97; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:96; и LCDR1, содержащую SEQ ID NO:95;

(viii) HCDR3, содержащую SEQ ID NO:60; HCDR2, содержащую SEQ ID NO:59; HCDR1, содержащую SEQ ID NO:50; LCDR3, содержащую SEQ ID NO:100; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:99; и LCDR1, содержащую SEQ ID NO:98;





тична ей, и домена VL, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:124 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентична ей.

19. Комбинация по любому из пп.1-3, 5, 7-9 и 14, содержащая молекулу антитела, которая связывается с CD47,

где указанная молекула антитела ингибирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ , и/или

где указанная молекула антитела повышает фагоцитоз опухолевых клеток, и/или

где указанная молекула антитела выбрана из: Hu5F9-G4; CC-90002; и ALX148.

20. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, где молекулу антитела, связывающуюся с CD70, и молекулу антитела, связывающуюся с мишенью на лейкозной стволовой клетке, объединяют в биспецифическое антитело.

21. Комбинация по любому из пп.1-19, где комбинация представляет собой композицию молекул антител.

22. Комбинация по п.21, где молекула антитела, которая связывается с CD70, и молекула антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке, находятся в соотношении 1:1 или 1:2 или 2:1.

23. Комбинация по любому из пп.1-19, где молекулы антител представлены раздельно.

24. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере одна из молекул антитела полностью или частично блокирует функцию своей мишени.

25. Комбинация по любому из предшествующих пунктов,

где по меньшей мере одна из молекул антитела обладает ADCC активностью, и

где одна из молекул антитела содержит дефукозилированный домен антитела и/или

где по меньшей мере одна из молекул антитела обладает CDC активностью, и/или

где по меньшей мере одна из молекул антитела обладает ADCP активностью.

26. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, где комбинация дополнительно содержит агент, который ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ .

27. Комбинация по п.26, где средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой молекулу антитела, которая связывается с SIRP $\alpha$  и ингибирует взаимодействие между CD47 и SIRP $\alpha$ .

28. Комбинация по п.27,

где средство, которое ингибирует передачу сигналов SIRP $\alpha$ , представляет собой слитый белок молекулы SIRP $\alpha$ -антитела,

где молекула SIRP $\alpha$ -антитела представляет собой слитый белок SIRP $\alpha$ -Fc.

29. Комбинация по п.28,

где слитый белок молекулы SIRP $\alpha$ -антитела содержит по меньшей мере одну из молекул антитела комбинации,

где слитый белок молекулы SIRP $\alpha$ -антитела содержит молекулу антитела комбинации, которая связывается с CD70.

30. Комбинация по любому из предшествующих пунктов,

где комбинация содержит по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое средство,

где противоопухолевое средство представляет собой средство для лечения AML.

31. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, где комбинация дополнительно содержит азациитидин.

32. Комбинация по любому из предшествующих пунктов,

где комбинация дополнительно содержит ингибитор PD-1 и/или ингибитор PD-L1,

где ингибитор представляет собой антитело, или

где ингибитор PD-1 и/или PD-L1 выбран из: ниволумаба; пембролизумаба; пидилизумаба, REGN2810; AMP-224; MEDI0680; PDR001; атезолизумаба; или авелумаба.

33. Применение комбинации по любому из пп.1-32 в качестве лекарства для лечения злокачественного заболевания у человека.

34. Применение молекулы антитела, которая связывается с CD70 в качестве лекарства для лечения злокачественного заболевания у человека,

где молекулу антитела вводят в комбинации с молекулой антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке,

где мишень на лейкозной стволовой клетке выбрана из группы, состоящей из: TIM-3; CD47; и IL1RAP, и

где молекула антитела, которая связывается с CD70, содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат последовательности CDR:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:3;

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:2;

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:1;

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:7;  
 LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:6; и  
 LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:5.

35. Применение молекулы антитела, которая связывается с мишенью на лейкозной стволовой клетке в качестве лекарства для лечения злокачественного заболевания у человека,

где молекулу антитела вводят в комбинации с молекулой антитела, которая связывается с CD70,

где мишень на лейкозной стволовой клетке выбрана из группы, состоящей из: TIM-3; CD47; и IL1RAP, и

где молекула антитела, которая связывается с CD70, содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домены VH и VL содержат последовательности CDR:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:3;

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:2;

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:1;

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:7;

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:6; и

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

36. Способ лечения злокачественного заболевания у человека, где указанный способ включает введение человеку эффективного количества комбинации по любому из пп.1-32 или отдельных компонентов комбинации как части комбинированной терапии.

37. Способ по п.36, где злокачественное заболевание представляет собой злокачественное заболевание, включающее продукцию раковых клеток-предшественников или стволовых клеток, экспрессирующих CD70, CD27 или оба.

38. Способ по п.36 или 37, где злокачественное заболевание представляет собой злокачественное заболевание, включающее продуцирование раковых клеток-предшественников или стволовых клеток, экспрессирующих мишень LSC, с которой связывается по меньшей мере одна из молекул антител комбинации.

39. Способ по любому из пп.36-38, где злокачественное заболевание представляет собой миелоидное злокачественное заболевание,

где миелоидное злокачественное заболевание выбрано из впервые диагностированных или рецидивирующих/рефрактерных миелоидных злокачественных заболеваний.

40. Способ по п.39, где миелоидное злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML).

41. Способ по п.40, дополнительно включающий мониторинг количества бластов у пациента,

где количество бластов в костном мозге пациента снижается до менее чем 5%, или

где количество бластов у пациента уменьшается до 5-25%, и процентное содержание бластов в костном мозге снижается более чем на 50% по сравнению с содержанием до лечения.

42. Способ по любому из пп.36-41,

который индуцирует частичный ответ или полный ответ,

который индуцирует полный ответ с восстановлением тромбоцитов, или

который индуцирует полный ответ с восстановлением нейтрофилов.

43. Способ по любому из пп.36-42, который индуцирует отсутствие потребности в трансфузиях эритроцитов или тромбоцитов, или тех и других, в течение 8 недель или больше.

44. Способ по любому из пп.36-43,

который повышает выживаемость,

повышает выживаемость по сравнению с препаратами стандартного лечения, используемыми для лечения миелоидных злокачественных заболеваний, и/или

который индуцирует статус минимального остаточного заболевания, который является отрицательным.

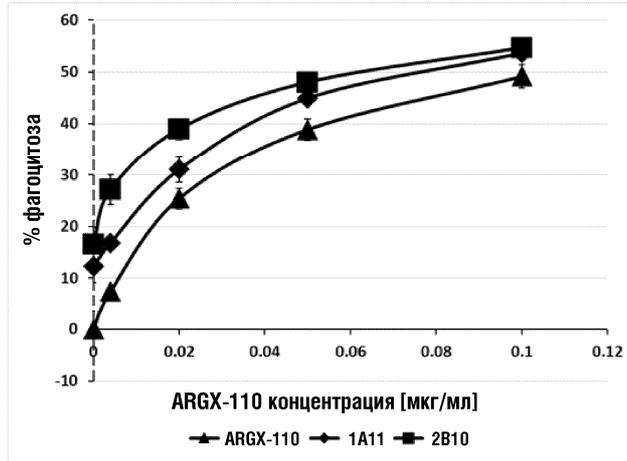
45. Способ по любому из пп.36-43, дополнительно включающий трансплантацию костного мозга индивиду.

46. Способ по любому из пп.36-45, дополнительно включающий введение одного или нескольких дополнительных противораковых средств,

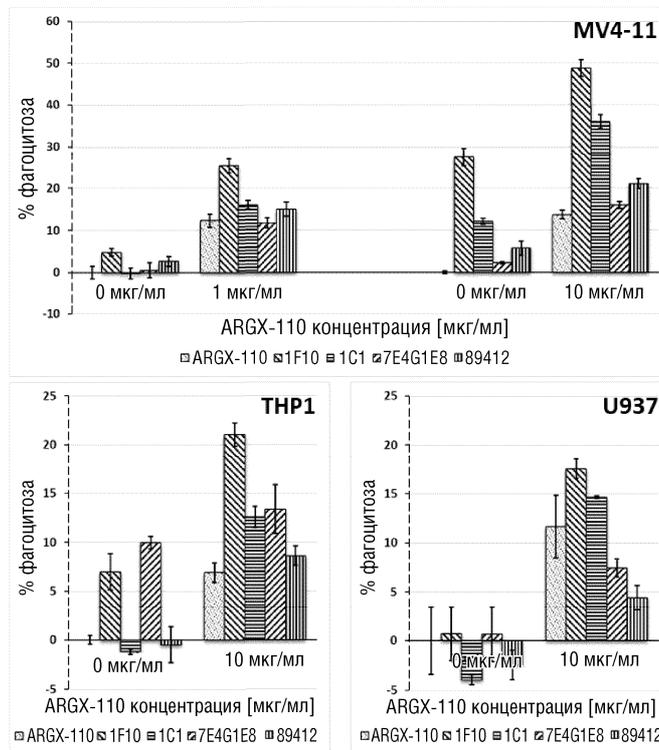
где один или более дополнительных противораковых средств выбраны из средств, подходящих для лечения миелоидных злокачественных заболеваний.

47. Способ по п.46, где одно или несколько дополнительных противораковых средств выбраны из средств, подходящих для лечения AML,

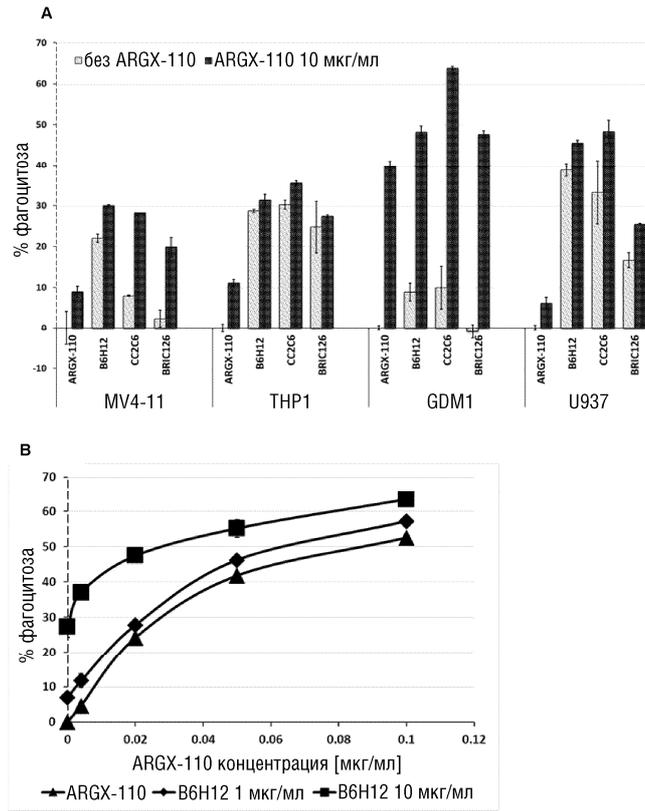
где одно или несколько дополнительных противораковых средств выбраны из: Venetoclax; Vuxeo; Idhifa (Энаседениб); и Rydapt (мидостаурин).



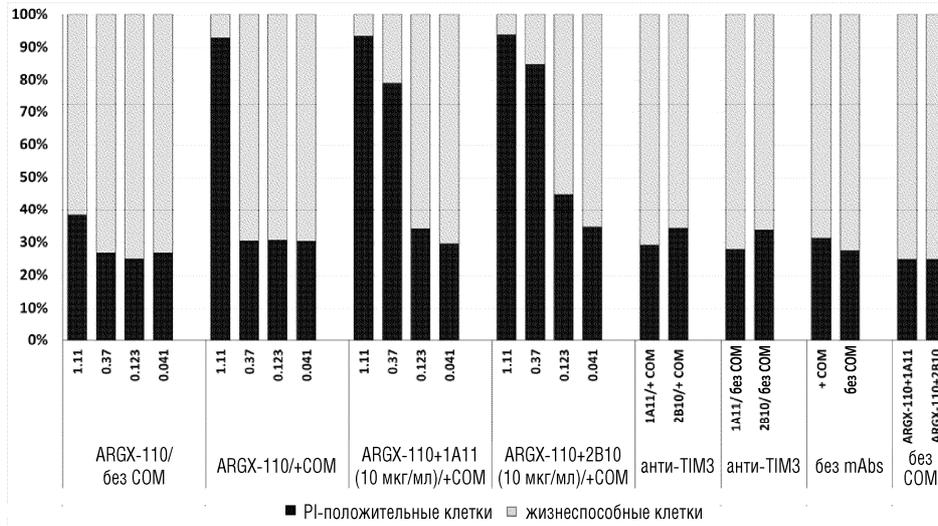
Фиг. 1



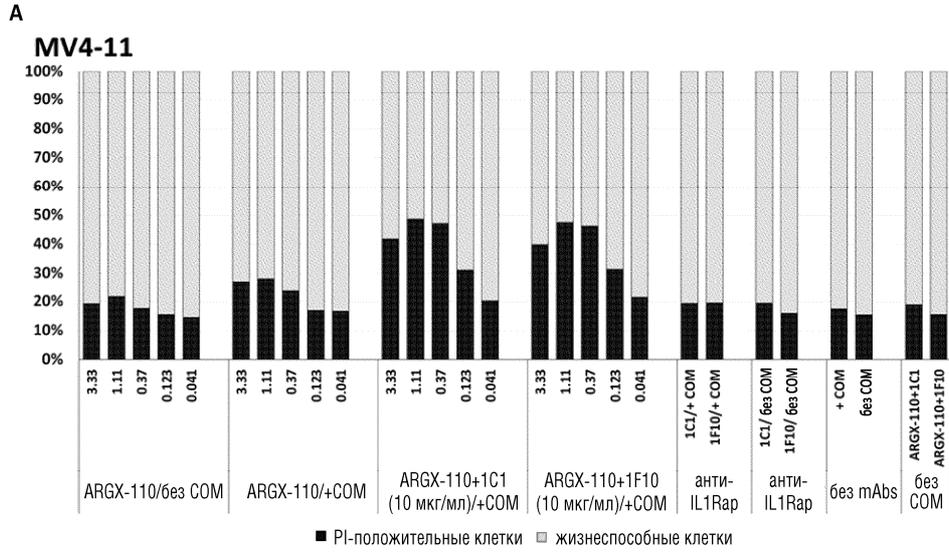
Фиг. 2



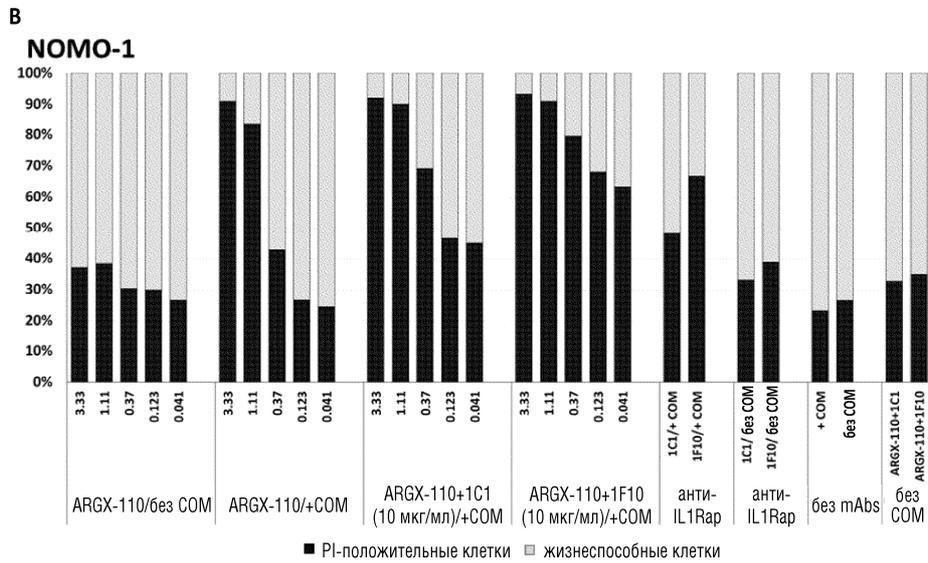
Фиг. 3



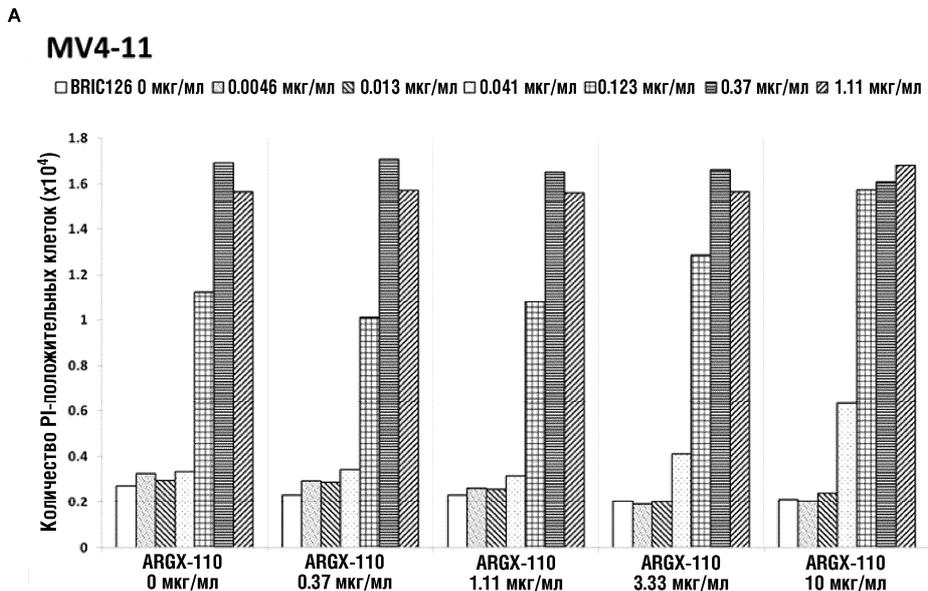
Фиг. 4



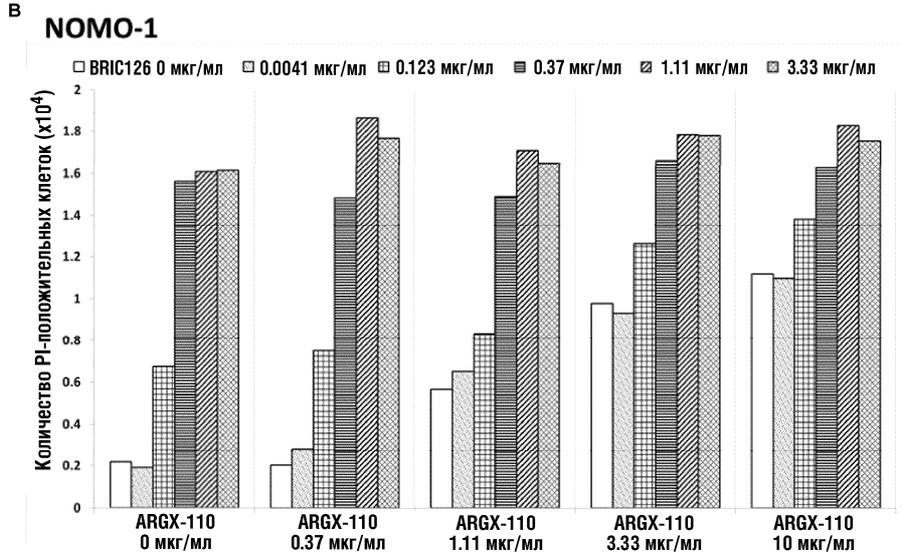
Фиг. 5



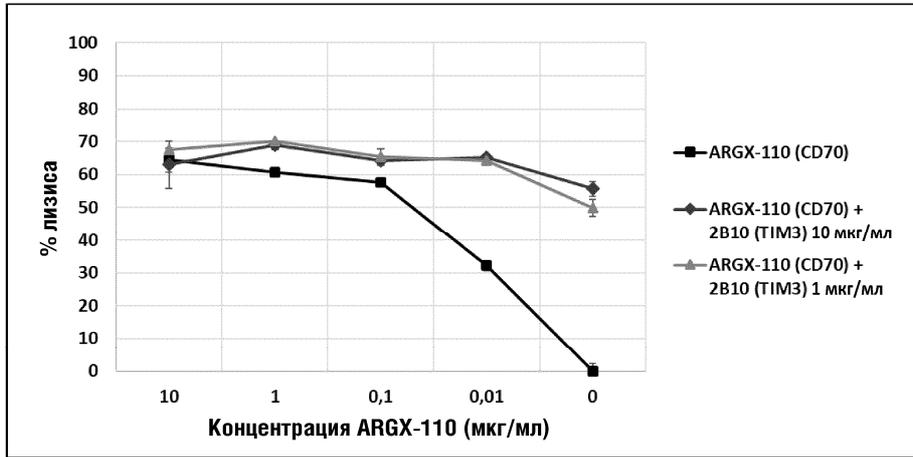
Фиг. 5, продолжение



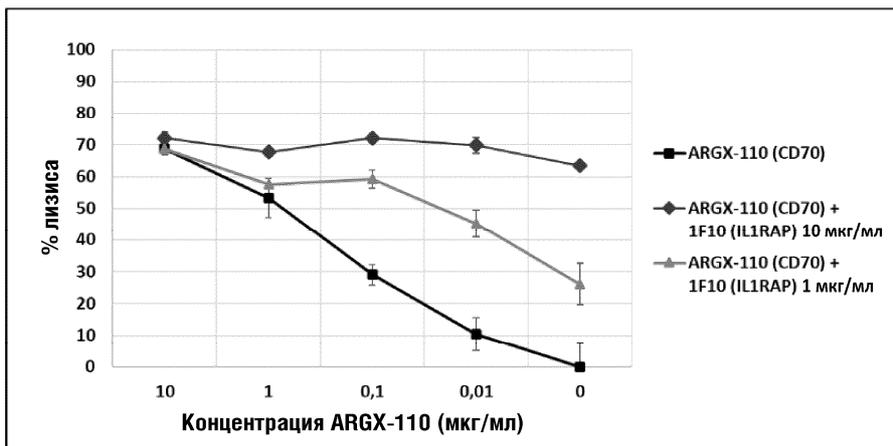
Фиг. 6



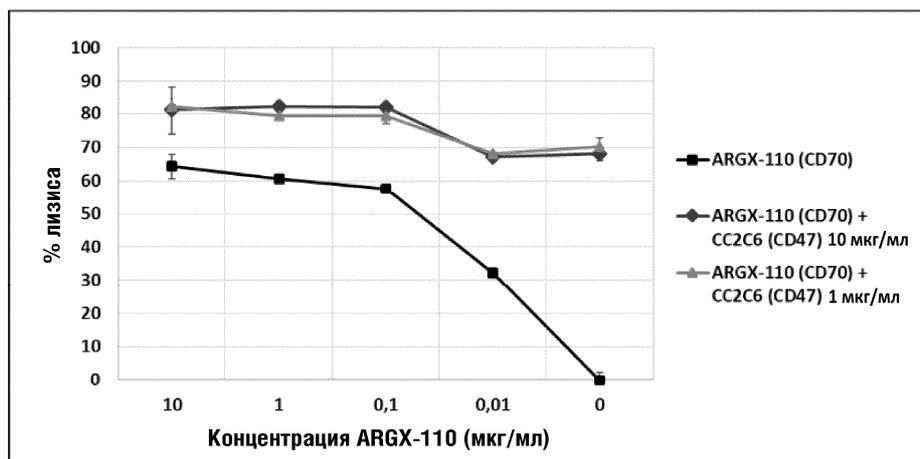
Фиг. 6, продолжение



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

