

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390716** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.19

(22) Дата подачи заявки
2021.08.27

(51) Int. Cl. *A61P 35/02* (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ПОНИЖЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ИНГИБИТОРУ BCL-2

(31) **63/072,113**

(32) **2020.08.29**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2021/073816**

(87) **WO 2022/043538 2022.03.03**

(71) Заявитель:

**АРДЖЕНКС БВ (ВЕ); ДЗЕ
РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КОЛОРАДО, Э
БОДИ КОРПОРЕЙТ (US)**

(72) Изобретатель:

**Де Хард Йоханнес (NL), Хультберг
Анна (US), Якобс Жюли, Заброцкий
Пётр (ВЕ), Смит Клейтон, Джордан
Крейг (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CD70, для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у человека, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2, и к способам лечения миелоидного злокачественного новообразования у субъекта, где указанный способ включает (а) выбор человека, имеющего миелоидное злокачественное новообразование, который имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к ингибитору BCL-2; и (b) введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70. В конкретных вариантах осуществления миелоидное злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML). В конкретных вариантах осуществления антитело, которое связывается с CD70, представляет собой кусатузумаб. В конкретных вариантах осуществления ингибитор BCL-2 вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70. В конкретных вариантах осуществления ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс.

A1

202390716

202390716

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577273EA/55

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ПОНИЖЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ИНГИБИТОРУ VCL-2 СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который подан в электронной форме в формате ASCII, и полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам терапии, включая виды комбинированной терапии, для лечения злокачественных опухолей, в частности, рецидивирующего или невосприимчивого миелоидного злокачественного новообразования. Виды терапии являются особенно эффективными для лечения острого миелоидного лейкоза (AML), включая моноцитарный AML. Виды комбинированных лекарственных средств включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, и ингибитор VCL-2, например, венетоклак, или его фармацевтически приемлемую соль.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДЛЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В последние годы, развитие новых видов лечения злокачественных опухолей было сфокусировано на молекулярных мишенях, в частности белках, вовлеченных в прогрессирование злокачественных опухолей. Список молекулярных мишеней, вовлеченных в рост, инвазию и метастазирование опухолей, продолжает расширяться, и включает белки, сверхэкспрессированные клетками опухолей, так же как мишени, ассоциированные с системами, поддерживающими рост опухолей, такими как сосудистая система и иммунная система. Количество терапевтических или противораковых средств, разработанных для взаимодействия с этими молекулярными мишенями, также продолжает увеличиваться. Большое количество направленных противораковых лекарственных средств в настоящее время одобрено для клинического применения, с намного большим количеством в портфеле разрабатываемых препаратов.

CD70 идентифицирован в качестве молекулярной мишени, представляющей особый интерес, из-за 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 фактора некроза опухоли (TNF), который опосредует свои эффекты посредством связывания с родственным ему рецептором клеточной поверхности, CD27. Как CD70, так и CD27 экспрессируются множеством типов клеток иммунной системы, и путь передачи сигналов

CD70-CD27 вовлечен в регуляцию нескольких различных аспектов иммунного ответа. Это отражено в том факте, что сверхэкспрессия CD70 возникает 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) *Armpum Rheum.* 50(6): 1850-1860.

Экспрессия CD70 была связана с плохим прогнозом для нескольких злокачественных опухолей, включая В-клеточную лимфому, почечноклеточный 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 была также обнаружена на метастазирующей ткани в высоком проценте случаев, что указывает на ключевую роль этой молекулы в прогрессировании злокачественной опухоли. Jacobs et al. (2015) *Oncotarget* 6(15): 13462-13475. Конститутивная экспрессия CD70 и его рецептора CD27 на клетках опухолей гематопоэтической линии была связана с ролью оси передачи сигналов CD70-CD27 в непосредственной регуляции пролиферации и выживаемости клеток опухоли. 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.

Подвергнутая повышающей регуляции экспрессия CD70 на опухолях, в частности, солидных опухолях, которые не экспрессируют совместно CD27, также вносит вклад в иммуносупрессию в микроокружении опухолей множеством способов. Например, показано, что связывание CD70 с CD27 на регуляторных Т-клетках (Трег) увеличивает частоту Трег, уменьшает опухолеспецифические ответы Т-клеток, и стимулирует рост опухолей у мышей. Claus et al. (2012) *Cancer Res.* 72(14): 3664-3676. Передача сигналов CD70-CD27 может также притуплять иммунный ответ посредством индуцированного опухолью апоптоза Т-лимфоцитов, как показано для клеток почечноклеточного рака, глиомы и глиобластомы. Chahnavi 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, экспрессия CD70 также была связана с истощением Т-клеток, в результате которого лимфоциты принимают более дифференцированный фенотип и неспособны уничтожать клетки опухолей. Wang et al. (2012) *Cancer Res* 72(23): 6119-6129; Yang et al. (2014) *Leukemia* 28(9): 1872-1884.

BCL-2 (белок 2 В-клеточной лимфомы) представляет собой встроенный во внешнюю мембрану митохондрий белок, который блокирует апоптотическую смерть некоторых клеток, таких как лимфоциты. Сверхэкспрессия BCL-2 в клетках злокачественных опухолей придает устойчивость к апоптозу, и таким образом, ингибирование этого белка может стимулировать смерть клеток опухоли. В недавних клинических исследованиях опубликовано, что добавление высоко специфического ингибитора BCL-2 венетоклакса к являющейся современным стандартом лечения терапии острого миелоидного лейкоза (AML), например, гипометилирующим средствам (HMA),

может сильно увеличивать частоты ответов и общую выживаемость для пациентов с впервые диагностированным АМЛ (75 лет или старше, или с сопутствующими заболеваниями), что предохраняет их от интенсивной индукционной химиотерапии (Dinardo (2020), *New England Journal of Medicine*). Эти обнаружения привели к недавнему одобрению FDA этого режима для этой популяции, и его в настоящее время считают стандартом лечения.

Комбинация венетоклакса и НМА азацитидина приводит к частоте ремиссии приблизительно 70% при АМЛ. Однако, значительное меньшинство пациентов не достигают ремиссии и являются невосприимчивыми. Кроме того, большинство пациентов, достигших ремиссии, в конечном счете испытывают рецидив.

Таким образом, все еще существует необходимость в улучшенных видах терапии для лечения злокачественных опухолей, включая экспрессирующие CD70 злокачественные опухоли, такие как миелоидные злокачественные новообразования.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте, настоящее изобретение относится к антителу против CD70 или его связывающему CD70 фрагменту для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у человека, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2.

Следующий аспект изобретения представляет собой способ лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека. Способ включает стадии:

(а) выбора человека, имеющего миелоидное злокачественное новообразование, который имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к ингибитору BCL-2; и

(b) введения человеку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающегося с CD70.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластических синдромов (MDS), миелопролиферативных неоплазий (MPN), хронического миелоидного лейкоза (CML) и миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML.

В конкретных вариантах осуществления, AML представляет собой моноцитарный AML.

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой MDS.

В конкретных вариантах осуществления, стадия (а) включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-

2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека.

В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере один из BCL-2 и CD117 подвергнут понижающей регуляции, и по меньшей мере один из CD11b, CD68, CD64, CD70, BCL2A1 и MCL1 подвергнут повышающей регуляции.

В конкретных вариантах осуществления, стадия (а) включает определение уровня экспрессии CD70 злокачественных миелоидных клеток человека.

В конкретных вариантах осуществления, CD70 подвергнут повышающей регуляции, по сравнению с уровнем экспрессии CD70, как измерено до или во время лечения ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, в клиническом анамнезе человека, присутствует:

- (а) лечение ингибитором BCL-2; и
- (b) отсутствие ремиссии в ответ на лечение ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

В конкретных вариантах осуществления, в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

- (а) лечение ингибитором BCL-2;
- (b) частичную или полную ремиссию; и
- (c) частичный или полный рецидив.

В конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

В конкретных вариантах осуществления, гипометилирующее средство (HMA) вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

- аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;
- аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2;
- аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3;
- аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;
- аминокислотная последовательность LCDR2 состоит из SEQ ID NO: 5; и
- аминокислотная последовательность LCDR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную

SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления, аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична VH, состоящему из SEQ ID NO: 7, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2; и

аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3; и

где аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична VL, состоящему из SEQ ID NO: 8, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;

аминокислотная последовательность LCDR2 состоит из SEQ ID NO: 5; и

аминокислотная последовательность LCDR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

В конкретных вариантах осуществления, HMA выбрано из группы, состоящей из азациитидина, децитабина и гуадецитабина.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретных вариантах осуществления, антитело, которое связывается с CD70, представляет собой кусатузумаб.

Один аспект изобретения представляет собой способ идентификации и лечения пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование, включающий стадии:

(i) измерения статуса миелоидной дифференцировки пациента;

(ii) определения того, имеет ли пациент дифференцированный моноцитарный AML, где пациента, имеющего дифференцированный моноцитарный AML, идентифицируют как пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом; и

(iii) введения антитела против CD70 или его связывающего CD70 фрагмента пациенту, идентифицированному как пациент, подлежащий лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

Один аспект изобретения представляет собой антитело против CD70 или его связывающий CD70 фрагмент для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у пациента, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2.

Следующий аспект изобретения представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у пациента, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, пациента подвергали предшествующему лечению ингибитором BCL-2 или ингибитором BCL-2 плюс гипометилирующее средство (HMA).

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование выбрано из: острого миелоидного лейкоза (AML); миелодиспластических синдромов (MDS); миелопролиферативных неоплазий (MPN); хронического миелоидного лейкоза (CML); и миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML или MDS.

В конкретных вариантах осуществления, пациента идентифицируют, на основании различных уровней экспрессии, как имеющего дифференцированный моноцитарный AML.

В конкретных вариантах осуществления, лечению предшествует отбор, включающий стадии:

- (i) измерения статуса миелоидной дифференцировки пациента, и
- (ii) определения того, имеет ли пациент дифференцированный моноцитарный AML,

и

где терапевтически эффективную дозу антитела против CD70 или его связывающего фрагмента против CD70 вводят указанному пациенту, имеющему дифференцированный моноцитарный AML.

В конкретных вариантах осуществления, пациента идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании дифференциального уровня(ей) экспрессии по меньшей мере одного из моноцитарных маркеров, выбранных из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1.

В конкретных вариантах осуществления, для пациента показана подвергнутая понижающей регуляции экспрессия по меньшей мере одного из BCL-2 и CD117, и подвергнутая повышающей регуляции экспрессия по меньшей мере одного из CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1.

В конкретных вариантах осуществления, в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

- (a) лечение ингибитором BCL-2; и
- (b) отсутствие ремиссии в ответ на лечение ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

В конкретных вариантах осуществления, в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

- (a) лечение ингибитором BCL-2;

(b) частичную или полную ремиссию; и

(c) частичный или полный рецидив.

В конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

В конкретных вариантах осуществления, гипометилирующее средство (HMA) вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 и гипометилирующее средство (HMA) вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

В конкретных вариантах осуществления, измеряют уровень экспрессии CD70 у пациента.

В конкретных вариантах осуществления, CD70 подвергнут повышающей регуляции, по сравнению с уровнем экспрессии CD70, как измерено до или во время лечения ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, устойчивый к ингибитору BCL-2 пациент представляет собой имеющего рецидивы или невосприимчивого к ингибитору BCL-2 пациента.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретных вариантах осуществления, гипометилирующее средство (HMA) представляет собой азациитидин, децитабин или гуадецитабин.

В конкретных вариантах осуществления, пациент является устойчивым к комбинированному лечению ингибитором BCL-2 плюс HMA.

В конкретных вариантах осуществления, пациент является устойчивым к комбинированному лечению венетоклаксом плюс азациитидин.

В конкретных вариантах осуществления, антитело против CD70 или его связывающий CD70 фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат последовательности CDR:

HCDR1, состоящую из SEQ ID NO: 1;

HCDR2, состоящую из SEQ ID NO: 2;

HCDR3, состоящую из SEQ ID NO: 3;

LCDR1, состоящую из SEQ ID NO: 4;

LCDR2, состоящую из SEQ ID NO: 5; и

LCDR3, состоящую из SEQ ID NO: 6.

В конкретных вариантах осуществления, антитело против CD70 или его связывающий фрагмент против CD70 содержит переменный домен тяжелой цепи (VH),

состоящий из SEQ ID NO: 7 или по меньшей мере на 90% идентичный ей, и переменный домен легкой цепи (VL) состоящий из SEQ ID NO: 8 или по меньшей мере на 90% идентичный ей.

В конкретных вариантах осуществления, отличие аминокислоты в аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична VH, состоящему из SEQ ID NO: 7, не находится в последовательностях CDR VH; и отличие аминокислоты в аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична VL, состоящему из SEQ ID NO: 8, не находится в последовательностях CDR VL.

В конкретных вариантах осуществления, антитело против CD70 представляет собой кусатузумаб.

В конкретных вариантах осуществления, гипометилирующее средство (HMA) вводят совместно с антителом против CD70 или его связывающим фрагментом против CD70.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 вводят совместно с антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

Один аспект изобретения представляет собой способ идентификации пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование и выбран в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) измерения статуса миелоидной дифференцировки пациента, и
 (ii) определения того, имеет ли пациент дифференцированный моноцитарный AML, где пациента, имеющего дифференцированный моноцитарный AML, идентифицируют как пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В конкретных вариантах осуществления, стадии (i) и (ii) проводят в образце, полученном от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием.

В конкретных вариантах осуществления, образец костного мозга пациента содержит клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD38⁺/CD34⁻/CD33⁺/CD11b⁺/CD70⁺ или клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD34⁻/CD117⁻/CD11b⁺/CD68⁺/CD14⁺/CD64⁺.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1A изображен анамнез лечения пациента Pt-51 и проточный анализ образцов костного мозга (BM) при диагностике. На графиках CD45/SSC, отборы Моноц., Прим. и Лимф. обозначают моноцитарные, примитивные и лимфоцитарные субпопуляции, соответственно. На графиках CD34/CD117 и CD68/CD11b показан иммунофенотип отобранных примитивных субпопуляций. Стрелками выделены представляющие интерес популяции. Фигура 1 адаптирована из Pei et al. 2020.

На фигуре 1B изображен анамнез лечения пациента Pt-72 и проточный анализ образцов костного мозга (BM) при диагностике. На графиках CD45/SSC, отборы Моноц., Прим. и Лимф. обозначают моноцитарные, примитивные и лимфоцитарные субпопуляции, соответственно. На графиках CD34/CD117 и CD68/CD11b показан иммунофенотип

отобранных моноцитарных субпопуляций. Стрелками выделены представляющие интерес популяции. Фигура 1 адаптирована из Pei et al. 2020.

На фигуре 1С изображены графики-скрипки, показывающие медианную интенсивность флуоресценции (MFI) CD117, CD11b, CD68, и CD64 для моноц-AML ($N=5$) и прим-AML ($N=7$), количественно оцененную посредством анализа проточной цитометрии. Каждая точка представляет уникальный AML. Критерий Манна-Уитни использовали для определения значимости. Фигура 1 адаптирована из Pei et al. 2020.

На фигуре 1D изображена жизнеспособность отсортированных ROS-низкий LSC из моноц-AML ($N=5$) и прим-AML ($N=7$) после 24 часов обработки *in vitro* с использованием VEN отдельно или в комбинации с фиксированной дозой 1,5 мкмоль/л AZA. Среднее \pm SD для трех технических повторов. Все данные жизнеспособности нормализованы по контролю без обработки (UNT). VEN, венетоклак. AZA, азацитидин. Фигура 1 адаптирована из Pei et al. (2020).

Фигура 2А представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую экспрессию *BCL2* при ROS-низкий прим-AML ($N=7$) и ROS-низкий моноц-AML ($N=5$). Каждая точка представляет уникальный AML. Среднее \pm SD. Фигура 2 адаптирована из Pei et al. (2020).

Фигура 2В представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую экспрессию *BCL2* для подклассов AML FAB-M0 ($N=16$), M1 ($N=44$), M2 ($N=40$), M0/1/2 ($N=100$) и M5 ($N=21$) из базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas). Каждая точка представляет уникальный AML. Фигура 2 адаптирована из Pei et al. (2020).

Фигура 2С представляет собой изображение результатов Вестерн-блоттинга, показывающих, на уровне белка, экспрессию BCL-2 при прим-AML ($N=5$) и моноц-AML ($N=4$). Актин использован в качестве контроля нанесения. Фигура 2 адаптирована из Pei et al. (2020).

На фигуре 3А изображен анамнез лечения пациента Pt-12 и проточный анализ его образцов при диагностике (Dx) и рецидиве (R1). На графиках CD45/SSC, отборы Моноц., Прим. и Лимф. идентифицируют моноцитарную, примитивную и лимфоцитарную популяции, соответственно. На графиках CD34/CD117 и CD68/CD11b показан иммунофенотип отобранных примитивных субпопуляций (P-AML) и моноцитарных субпопуляций (M-AML). Стрелками выделены представляющие интерес популяции на графиках CD45/SSC, в частности, моноцитарная субпопуляция. Фигура 3 адаптирована из Pei et al. (2020).

На фигуре 3В изображен анамнез лечения пациента Pt-65 и проточный анализ его образцов при диагностике (Dx) и рецидиве (R1). На графиках CD45/SSC, отборы Моноц., Прим. и Лимф. идентифицируют моноцитарную, примитивную и лимфоцитарную популяции, соответственно. На графиках CD34/CD117 и CD68/CD11b показан иммунофенотип отобранных примитивных субпопуляций (P-AML) и моноцитарных субпопуляций (M-MAL). Стрелками выделены представляющие интерес популяции на графиках CD45/SSC, в частности, моноцитарная субпопуляция. Фигура 3 адаптирована из Pei et al. (2020).

Фигура 4 представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую уровни экспрессии мРНК CD70 для подклассов AML FAB-M0 ($N=13$), M1 ($N=39$), M2 ($N=37$), M3 ($N=14$), M4 ($N=32$) и M5 ($N=18$). Пациенты с самой высокой экспрессией CD70 принадлежат к подтипу M5, содержащему более 80% клеток моноцитарного AML в костном мозге.

Фигура 5 представляет собой анализ проточной цитометрии образцов костного мозга для невосприимчивого к VEN+AZA моноцитарного заболевания (A) и для невосприимчивого к VEN+AZA заболевания, имеющего смешанный фенотип с клетками моноцитарного и примитивного AML (B). Отбор моноцитарных клеток по CD34, CD11b, CD14 и CD64 показал более высокие уровни экспрессии CD70 на моноцитарных клетках AML, в отличие от примитивных клеток (A и B). Для примитивных клеток также показана экспрессия CD70 (B).

На фигуре 6A изображены сравнение медианной интенсивности флуоресценции (MFI) для CD70 на клетках примитивного и моноцитарного AML на столбчатой диаграмме (слева), и парный анализ экспрессии для образца, показывающий более высокий уровень экспрессии CD70 на клетках моноцитарного AML, чем на клетках примитивного AML, присутствующих в образце от того же самого пациента (справа).

На фигуре 6B изображены сравнение процента положительных по CD70 клеток примитивного и моноцитарного AML на столбчатой диаграмме (слева), и парный анализ положительных по CD70 злокачественных клеток для образца, показывающий более высокий процент экспрессирующих CD70 клеток в популяциях клеток моноцитарного AML (справа). Уровни экспрессии CD70 на клетках моноцитарного злокачественного AML выше, чем на клетках примитивного AML.

Фигура 7A представляет собой анализ проточной цитометрии образцов для AML смешанного фенотипа и моноцитарного AML, используемый для оценки NK-зависимого уничтожения посредством кусатузумаба. В обоих образцах, моноцитарная CD38+ /CD33+ /CD11b+ субпопуляция экспрессировала высокие уровни CD70 на плазматической мембране.

Фигура 7B представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую эффект на клетки моноцитарного и примитивного AML после введения кусатузумаба, антитела 41D12 FcDead и контрольного носителя. Кусатузумаб является способным значимо опосредовать NK-зависимое уничтожение клеток для чувствительного к VEN+AZA смешанного фенотипа AML с клетками моноцитарного и примитивного AML. Однофакторный тест ANOVA использовали для определения значимости. * $p < 0,05$.

Фигура 7C представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую эффект на клетки моноцитарного AML после введения кусатузумаба, антитела 41D12 FcDead и контрольного носителя. Кусатузумаб является способным значимо опосредовать NK-зависимое уничтожение клеток для клеток устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML. Однофакторный тест ANOVA использовали для определения значимости. *** $p < 0,001$.

Фигура 8 представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую медианную экспрессию CD70 из транскриптомного анализа экспрессии генов, проведенного для примитивных и моноцитарных ROS-низкий LSC из образцов AML из костного мозга. Непарный критерий Уилкоксона использовали для сравнения обеих субпопуляций LSC. * $p < 0,05$.

Фигура 9 представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую эффект обработки антителами на лейкозные стволовые клетки из образцов костного мозга для положительного по CD70 устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML. Данные нормализованы на количество колониеобразующих единиц (КОЕ) для контроля без антитела, для контроля изотипа, блокирующего антитела против CD70 41D12 FcDead и кусатузумаба. Образцы костного мозга для устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML инкубировали с NK-клетками (соотношение Т:Е 1:5) в присутствии антител (10 мкг/мл) и затем культивировали в среде CFU, для определения того, подвергались ли LSC также эффективному нацеливанию посредством опосредованной кусатузумабом NK-зависимой ADCC. Только кусатузумаб, но не контрольное или блокирующее антитело, являлся способным к значимому уменьшению количества LSC, приводящих к образованию колоний в среде. На графике показаны данные из 3 независимых экспериментов для 3 различных образцов костного мозга при AML, для устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML. Однофакторный тест ANOVA использовали для определения значимости. **** $p < 0,0001$.

Фигура 10 представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую эффективность обработки антителом против CD70 в присутствии NK-клеток в модели на мышах с использованием происходящего от пациента ксенотрансплантата. Мышам NSGS трансплантировали образец костного мозга для устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML. Когда уровень приживления в костном мозге достигал около 25% лейкозных клеток, животных подвергали обработке 3 раза каждые 3 суток с использованием кусатузумаба или VEN+AZA, в присутствии или в отсутствие однократной инфузии $1,5 \times 10^6$ NK-клеток. Через 9 суток животных умерщвляли, выделяли костный мозг из бедренной кости, и определяли количество злокачественных моноцитарных клеток в костном мозге. Для животных, подвергнутых обработке с использованием кусатузумаба в комбинации с NK-клетками, но не кусатузумаба отдельно, VEN+AZA или VEN+AZA с NK-клетками, показаны значимо уменьшенные уровни клеток моноцитарного AML в костном мозге мыши. Критерий Манна-Уитни использовали для определения значимости. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

А. Определения

Если не определено иное, все технические и научные термины используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области техники, к которой относится изобретение.

Острый миелоидный лейкоз - в рамках изобретения, «острый миелоидный лейкоз» или «AML» относится к гематопозитическим неоплазиям, вовлекающим миелоидные клетки. AML характеризуется клональной пролиферацией миелоидных предшественников с уменьшенной способностью к дифференцировке. Для пациентов с AML показано накопление бластных клеток в костном мозге. «Бластные клетки», или просто «бласты», в рамках изобретения относится к клональным миелоидным клеткам-предшественникам, имеющим нарушенный потенциал к дифференцировке. Бластные клетки, как правило, также накапливаются в периферической крови пациентов с AML. Как правило, AML диагностируют, если для пациента показано 20% или более бластных клеток в костном мозге или периферической крови. В рамках изобретения, термины «пациент» и «человек» использованы взаимозаменяемо.

В соответствии со схемой классификации Всемирной организации здравоохранения (WHO), AML, как правило, включает следующие подтипы: AML с рецидивирующими генетическими аномалиями; AML со связанными с миелодисплазией изменениями; связанные с терапией миелоидные неоплазии; миелоидная саркома; виды миелоидной пролиферации, связанные с синдромом Дауна; неоплазия бластных плазмацитоидных дендритных клеток; и AML, не категоризированный иным образом (например, острый мегакариобластный лейкоз, острый базофильный лейкоз).

AML можно также категоризировать, в соответствии с Франко-американско-британской классификационной системой (FAB), включающей подтипы: M0 (острый миелобластный лейкоз, минимально дифференцированный); M1 (острый миелобластный лейкоз, без созревания); M2 (острый миелобластный лейкоз, с созреванием гранулоцитов); M3 (промиелоцитарный или острый промиелоцитарный лейкоз (APL)); M4 (острый миеломоноцитарный лейкоз); M4eo (миеломоноцитарный в сочетании 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).

Антитело - в рамках изобретения, термин «антитело» предназначен для включения полноразмерных антител и их вариантов, включая, но без ограничения, модифицированные антитела, гуманизированные антитела, модифицированные на уровне генов зародышевой линии антитела. Термин «антитело», как правило, используют в настоящем описании для обозначения полипептидов иммуноглобулинов, имеющих комбинацию из двух тяжелых и двух легких цепей, где полипептид имеет значительную специфическую иммунореактивность по отношению к представляющему интерес антигену (в настоящем описании CD70). В случае антител класса IgG, антитела содержат две идентичные легкие полипептидные цепи молекулярной массы приблизительно 23000 Дальтон, и две идентичные тяжелые цепи молекулярной массы 53000-70000. Эти четыре цепи соединены посредством дисульфидных связей в конфигурации «Y», где легкие цепи охватывают тяжелые цепи, начиная с сужения «Y» и продолжая на протяжении вариабельной области. Легкие цепи иммуноглобулинов классифицируют как либо каппа, либо лямбда (κ, λ).

Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой цепью либо каппа, либо лямбда. Как правило, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, когда иммуноглобулины получены посредством гибридом, В-клеток или полученных с помощью генной инженерии клеток-хозяев. В тяжелой цепи, аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенном конце конфигурации Y до C-конца внизу каждой цепи.

Специалисту в данной области понятно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, (γ , μ , α , δ , ϵ) с некоторыми подклассами среди них (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа этой цепи является тем, что определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы (изотипов) иммуноглобулинов, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д. хорошо охарактеризованы и как известно, придают функциональную специализацию. Термин «антитело», в рамках изобретения, охватывает антитело из любого класса или подкласса антитела.

Антигенсвязывающий фрагмент - Термин «антигенсвязывающий фрагмент», в рамках изобретения, относится к фрагментам, представляющим собой части или порции полноразмерного антитела или цепи антитела, содержащей меньше аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело, в то же время сохраняющей активность связывания антигена. Антигенсвязывающий фрагмент антитела включает пептидные фрагменты, проявляющие специфическую иммунореактивность по отношению к такому же антигену, что и антитело (например, CD70). Термин «антигенсвязывающий фрагмент», в рамках изобретения, предназначен для включения фрагментов антител, выбранных из: переменного домена легкой цепи антитела (VL); переменного домена тяжелой цепи антитела (VH); одноцепочечного антитела (scFv); фрагмента F(ab')₂; фрагмента Fab; фрагмента Fd; фрагмента Fv; одноплечевого (моновалентного) антитела; диател, триател, тетрател или любой антигенсвязывающей молекулы, сформированной посредством комбинации, сборки или конъюгации таких антигенсвязывающих фрагментов. Термин «антигенсвязывающий фрагмент», в рамках изобретения, может также включать фрагменты антител, выбранных из группы, состоящей из: антител unibody; доменных антител; и наноантител. Фрагменты можно получать, например, посредством химической или ферментной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела, или посредством рекомбинантных способов.

BCL-2 - в рамках изобретения, «BCL-2» или «белок BCL-2», или «BCL2» относится к первому члену семейства белков BCL-2, идентифицированному у человека, т.е., белку В-клеточной лимфомы 2. кДНК, кодирующая BCL-2 человека, клонирована в 1986 г., и ключевая роль этого белка в ингибировании апоптоза установлена в 1988 г. Обнаружено, что BCL-2 подвергается повышающей регуляции в нескольких различных типах злокачественных опухолей. Например, BCL-2 активируется посредством хромосомной транслокации t(14;18) в фолликулярной лимфоме. Также была опубликована амплификация гена BCL-2 в различных злокачественных опухолях, включая лейкозы (такие как CLL),

лимфомы (такие как В-клеточная лимфома) и некоторые солидные опухоли (например, мелкоклеточную карциному легкого). BCL-2 человека кодируется геном *BCL2* (UniProtKB - P10415) и имеет аминокислотные последовательности, показанные в эталонных последовательностях в NCBI NP_000624.2 и NP_000648.2.

Семейство BCL-2 - в рамках изобретения, термин «семейство BCL-2» или «семейство белков BCL-2» относится к коллекции про- и антиапоптотических белков, родственных BCL-2, см. Delbridge *et al.* (2016) *Nat Rev Cancer*. 16(2): 99-109. Существует по меньшей мере 16 членов этого семейства, категоризированных на три функциональные группы: (i) подобные BCL-2 белки (например, BCL-2, BCL-X_L/BCL2L1, BCLW BCL2L2, MCL2, BFL1/BCL2A1); (ii) BAX и BAK; и (iii) белки только с BH3 (например, BIM, PUMA, BAD, BMF, BID, NOXA, HRK, BIK). Семейство белков BCL-2 играет ключевую роль в регуляции внутреннего апоптотического пути с использованием антиапоптотических членов семейства (например, BCL-2, BCL-X_L), как правило, проявляющих антагонизм к проапоптотическим членам (например, BAX и BIM). Прекращение регуляции членов семейства BCL-2 наблюдали во многих злокачественных опухолях, например, посредством транслокаций, амплификаций, сверхэкспрессии и мутаций генов. Нижестоящим эффектом этого прекращения регуляции часто является устойчивость к апоптозу, которая подпитывает рост злокачественной опухоли.

BCL2A1 - в рамках изобретения, BCL2A1, или родственная белку B-клеточной лимфомы 2 белок A1, относится к антиапоптотическому белку BCL2, который проявляет важные способствующие выживаемости функции. Опубликовано, что BCL2A1 подвергается повышающей регуляции при AML и ассоциирован с устойчивостью к венетоклаксу. Zhang *et al.* (2020) *Nat Cancer* 1: 826-839.

Ингибитор BCL-2 - в рамках изобретения, ингибитор BCL-2 относится к любому средству, соединению или молекуле, способным специфически ингибировать активность BCL-2, в частности, к средству, соединению или молекуле, способным ингибировать антиапоптотическую активность BCL-2. Примеры ингибиторов BCL-2, пригодных для использования в комбинациях, описанных в настоящем описании, включают соединения-миметики домена гомологии 3 белков B-клеточной лимфомы (BH3) (Merino *et al.* (2018) *Cancer Cell*. 34(6): 879-891). Конкретные ингибиторы BCL-2 включают, но без ограничения, венетоклакс, АВТ-737 (Oltersdorf, T. *et al.* (2005) *Nature* 435: 677-681), навитоклакс/АВТ-263 (Tse, C. *et al.* (2008) *Cancer Res*. 68: 3421-3428), ВМ-1197 (Bai, L. *et al.* (2014) *PLoS ONE* 9: e99404), S44563 (Nemati, F. *et al.* (2014) *PLoS ONE* 9: e80836), BCL2-32 (Adam, A. *et al.* (2014) *Blood* 124: 5304), AZD4320 (Hennessy, E. J. *et al.* (2015) *ACS Medicinal Chemistry annual meeting* https://www.acsmedchem.org/ama/orig/abstracts/mediabstractf2015.pdf_abstr.24), и S55746 (International Standard Randomised Controlled Trial Number Registry. *ISRCTN* <http://www.isrctn.com/> ISRCTN04804337 (2016). Дополнительные примеры ингибиторов BCL-2 описаны в Ashkenazi, A *et al.* (2017) *Nature Reviews Drug Discovery* 16: 273-284, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

CD70 - в рамках изобретения, термины «CD70» или «белок CD70», или «антиген CD70» использованы взаимозаменяемо и относятся к члену семейства лиганда TNF, который является лигандом для TNFRSF7/CD27. CD70, также известен как CD27L или TNFSF7. Термины «CD70 человека» или «белок CD70 человека», или «антиген CD70 человека» использованы взаимозаменяемо для обозначения конкретно человеческого гомолога, включая нативный белок CD70 человека, естественным образом экспрессированный в организме человека и/или на поверхности культивируемых линий клеток человека, так же как его рекомбинантные формы и фрагменты. Конкретные примеры CD70 человека включают полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в эталонной последовательности под No. доступа в NCBI NP_001243, или его внеклеточный домен.

Кусатузумаб - в рамках изобретения «кусатузумаб», также известный как ARGX-110, представляет собой моноклональное антитело IgG1 против CD70. Показано, что ARGX-110 ингибирует взаимодействие CD70 с его рецептором CD27 (Silence et al. (2014) *MAbs*. Mar-Apr;6(2): 523-32, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки). В частности, показано, что ARGX-110 ингибирует индуцированную CD70 передачу сигналов CD27. Уровни передачи сигналов CD27 можно определять, например, посредством измерения в сыворотке растворимого CD27, как описано в Riether et al. (2017) *J. Exp. Med.* 214(2): 359-380) или экспрессии IL-8, как описано в Silence et al. (2014) *MAbs* 6(2): 523-32. Без связи с теорией, считают, что ингибирование передачи сигналов CD27 уменьшает активацию и/или пролиферацию Трег-клеток, таким образом, уменьшая ингибирование противоопухолевых эффекторных Т-клеток. Показано также, что ARGX-110 истощает экспрессирующие CD70 клетки опухолей. В частности, показано, что ARGX-110 лизирует экспрессирующие CD70 клетки опухолей посредством антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC), а также увеличивает антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) экспрессирующих CD70 клеток (Silence et al., там же). ARGX-110 является афукозилированным для усиления ADCC.

Аминокислотные последовательности шести CDR, VH, и VL ARGX-110 или кусатузумаба показаны в таблице 1.

Таблица 1

ARGX-110	Последовательность	SEQ ID NO.
HCDR1	VYYMN	1
HCDR2	DINNEGGTTYADSVKG	2
HCDR3	DAGYSNHVPIFDS	3
LCDR1	GLKSGSVTSDNFPT	4
LCDR2	NTNTRHS	5
LCDR3	ALFISNPSVE	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPG KGLEWVSDINNEGGTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDAGYSNHVPIFDSWGQGLTVVSS	7
VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGLKSGSVTSDNFPTWYQQTPG QAPRLLIYNTNTRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDEAE YFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG	8

Стадии развития AML - Большинство злокачественных опухолей разделяют на стадии на основании размера и распределения опухолей. Стадии AML часто характеризуют по количеству клеток крови и накоплению лейкозных клеток в других органах, подобных печени или селезенке. Стадия, или прогрессирование, AML является важным фактором в оценке вариантов лечения. Ответы на ингибитор BCL-2 (или ингибитор BCL-2 плюс гипометилирующее средство) у пациентов с AML тесно коррелируют со стадией развития, где примитивный AML является чувствительным, но моноцитарный AML или «дифференцированный моноцитарный AML» (термины использованы взаимозаменяемо в настоящем описании) является более устойчивым к терапии ингибитором BCL-2. Клетки первичного AML имеют отличные свойства и таким образом, проявляют ответы на терапию, отличные от клеток более дифференцированного моноцитарного AML. Экспрессия моноцитарных маркеров может служить для установления различий между клетками первичного AML и моноцитарного AML. Такие моноцитарные маркеры включают BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, CD70, BCL2A1, MCL1 и другие маркеры. Неограничивающие примеры других моноцитарных маркеров включают CD38, CD34, CD33 и CD14. Клетки моноцитарного AML могут также быть охарактеризованы как CD45^{яркий} и SSC^{высокий} клетки. Уровни экспрессии генов этих моноцитарных маркеров больше подвергаются либо повышающей регуляции, либо понижающей регуляции на клетках моноцитарных опухолей, в зависимости от стадии развития AML. Статус миелоидной дифференцировки коррелирует с уменьшенной экспрессией BCL2 у пациентов с AML. Таким образом, более дифференцированный моноцитарный AML с намного большей вероятностью является невосприимчивым к терапии на основе ингибитора BCL-2.

Подвергнутый понижающей регуляции уровень экспрессии - в рамках изобретения, «подвергнутый понижающей регуляции уровень экспрессии» относится к уменьшенному уровню экспрессии. Это означает тенденцию к снижению уровня экспрессии моноцитарного маркера. Подвергнутый понижающей регуляции уровень экспрессии моноцитарного маркера представляет собой уменьшенный уровень экспрессии, по сравнению с более ранним уровнем экспрессии. Более ранний уровень экспрессии может представлять собой уровень экспрессии, как измерено у пациента до или во время лечения

ингибитором BCL-2 (или до или во время лечения ингибитором BCL-2 и гипометилирующим средством). Более ранний уровень экспрессии может также представлять собой исходный уровень экспрессии моноцитарного маркера на клетке моноцитарной опухоли.

Прошлом лечении - в рамках изобретения, «прошлом лечении» относится к предшествующему лечению, например, более раннему лечению до лечения антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с CD70.

Лейкозные стволовые клетки - в рамках изобретения, «лейкозные стволовые клетки» или «LSC» представляют собой подгруппу бластных клеток, ассоциированных с AML. LSC представляют собой бластные клетки, имеющие свойства стволовых клеток, так что в случае трансплантации иммунодефицитному реципиенту, они являются способными инициировать лейкозное заболевание. LSC способны к самообновлению посредством вызова лейкоза, а также к частичной дифференцировке в не-LSC обычные бластные клетки, которые напоминают исходное заболевание, но являются неспособными к самообновлению. LSC возникают с частотой в диапазоне от 1 на 10000 до 1 на 1 миллион как доля бластных клеток первичного AML (Pollyea and Jordan (2017) *Blood* 129: 1627-1635, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки). LSC могут быть охарактеризованы как клетки, являющиеся CD34+, CD38-, необязательно, также CD45-и/или CD123+. LSC могут также быть охарактеризованы как CD45тусклый, SSCнизкий, CD90+CD34+ клетки.

Миелоидное злокачественное новообразование - в рамках изобретения, термин «миелоидное злокачественное новообразование» относится к любому клональному заболеванию гематопоетических стволовых клеток или клеток-предшественников. Миелоидные злокачественные новообразования или миелоидные злокачественные заболевания включают хронические и острые состояния. Хронические состояния включают миелодиспластические синдромы (MDS), миелопролиферативные неоплазии (MPN) и хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), и острые состояния включают острый миелоидный лейкоз (AML).

НК-зависимая ADCC - в рамках изобретения, «НК-зависимая антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC)» представляет собой адаптивный иммунный ответ, опосредованный клетками естественными киллерами (NK). НК-зависимая ADCC инициируется посредством активации NK-клеток посредством антител. НК-зависимая ADCC может быть инициирована посредством активации NK-клеток посредством антител против CD70.

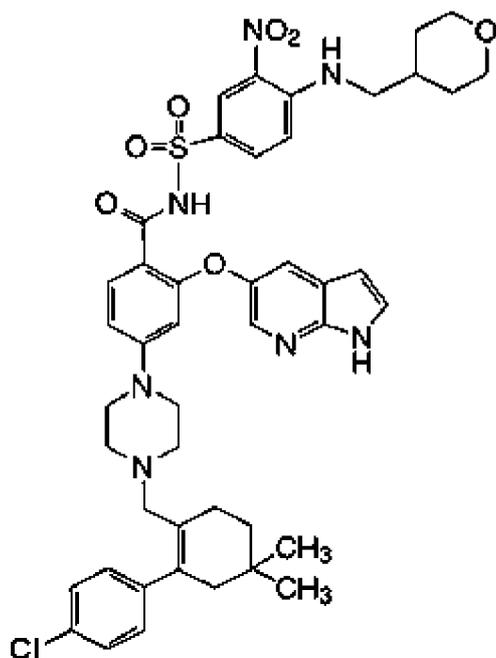
Устойчивый - в рамках изобретения, фразы «устойчивый к» или «устойчивость к» терапии, например, устойчивость к терапии ингибитором BCL-2, относится к уменьшенной чувствительности к лечению человека. Термин «устойчивый» включает предшествующую устойчивость к терапии или рецидив после начального ответа на терапию. Пациент может испытывать рецидив, что означает, что пациент первоначально отвечал на терапию, но в конечном счете испытал рецидив; так что для пациента более не показывают

положительного ответа на лечение. Термин «устойчивый» также включает, наряду с испытывающих рецидив пациентами, невосприимчивых пациентов. Ответ невосприимчивости означает, что для пациента вообще не показан ответ на данное лечение. Пациент не достигает ремиссии и является невосприимчивым.

Стандартная интенсивная химиотерапия - в рамках изобретения, фраза «стандартная интенсивная химиотерапия» (также обозначенная в настоящем описании как «интенсивная индукционная терапия» или «индукционная терапия») относится к так называемой индукционной химиотерапии «7+3», характеризующейся 7 сутками высокой дозы цитарабина, с последующими 3 сутками введения антрациклина (например, даунорубицина или идарубицина). Стандартной интенсивной химиотерапии можно подвергать подходящих пациентов с впервые диагностированным АМЛ с целью индукции полной ремиссии АМЛ, как правило, с намерением подвергания пациента трансплантации стволовых клеток после успешной химиотерапии. Как объяснено в настоящем описании, не все пациенты с впервые диагностированным АМЛ являются подходящими для этой стандартной интенсивной химиотерапии.

Подвергнутый повышающей регуляции уровень экспрессии - в рамках изобретения, фраза «подвергнутый повышающей регуляции уровень экспрессии» относится к повышенному или более высокому уровню экспрессии. Это означает тенденцию к повышению уровня экспрессии моноцитарного маркера. Подвергнутый повышающей регуляции уровень экспрессии моноцитарного маркера представляет собой более высокий уровень экспрессии, по сравнению с более ранним уровнем экспрессии. Более ранний уровень экспрессии может представлять собой уровень экспрессии, как измерено у пациента до или во время лечения ингибитором BCL-2 (или до или во время лечения ингибитором BCL-2 и гипометилирующим средством). Более ранний уровень экспрессии может также представлять собой исходный уровень экспрессии моноцитарного маркера на клетке моноцитарной опухоли.

Венетоклакс - в рамках изобретения, термин «венетоклакс» относится к соединению, имеющему химическую структуру, показанную ниже:



Венетоклакс представляет собой сильный, избирательный, перорально биодоступный ингибитор белка BCL-2. Он имеет эмпирическую формулу $C_{45}H_{50}ClN_7O_7S$ и молекулярную массу 868,44. Он имеет очень низкую растворимость в воде. Венетоклакс может быть описан химически как 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-*N*-({3-нитро-4-[(тетрагидро-2*H*-пиран-4-илметил)амино]фенил}сульфонил)-2-(1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридин-5-илокси)бензамид). Альтернативные наименования для венетоклакса включают АВТ-199; химическое наименование 1257044-40-8; GDC-0199.

Венетоклакс получил одобрение от Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) США в 2015 г. для лечения взрослых пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) или мелкоклеточным лимфоцитарным лейкозом (SLL), которых подвергали по меньшей мере одной предшествующей терапии. Венетоклакс распространяет и поставляет на рынок AbbVie Inc. под торговым наименованием ВЕНКЛЕКСТА®. Венетоклакс также одобрен в США для использования в комбинации с азациитидином или децитабином или низкой дозой цитарабина для лечения впервые диагностированного острого миелоидного лейкоза (AML) у взрослых в возрасте 75 лет или старше, или имеющих сопутствующие заболевания, препятствующие применению интенсивной индукционной химиотерапии.

В. Способы

Белок BCL-2 является антиапоптотическим членом семейства BCL-2 и подвергается повышающей регуляции во многих различных типах злокачественных опухолей. Сверхэкспрессия BCL-2 позволяет клеткам опухолей избегать апоптоза посредством секвестрирования проапоптотических белков. BCL-2 экспрессируется на высоком уровне во многих гематологических злокачественных новообразованиях и является преобладающим способствующим выживаемости белком при таких заболеваниях, как хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), фолликулярная лимфома и лимфома из клеток

мантийной зоны. Ингибирование BCL-2 ингибирует антиапоптотическую или способствующую выживаемости активность этого белка.

Антиапоптотические члены семейства BCL-2, включая BCL-2, как опубликовано, сверхэкспрессированы в образцах при первичном AML (Bogenberger et al. (2014) *Leukemia* 28(2): 1657-65). Опубликована также сверхэкспрессия BCL-2 в лейкозных стволовых клетках (LSC), полученных от пациентов с AML (Lagadinou et al. (2013) *Cell Stem Cell* 12(3): 329-341). Ингибирование BCL-2 в популяциях LSC *ex vivo* приводила к избирательному уничтожению покоящихся LSC (Lagadinou et al. (2013) *Cell Stem Cell* 12(3): 329-341).

Без намерения быть связанными теорией, способы по настоящему изобретению считают являющимися особенно эффективными для лечения AML, благодаря комбинированному терапевтическому эффекту антител против CD70 или их антигенсвязывающих фрагментов и ингибитора BCL-2, в частности, комбинированному эффекту на уровень LSC. Способность к самообновлению LSC означает, что персистенция этих клеток является главным фактором, вносящим вклад в рецидив заболевания.

Кроме того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что доля клеток моноцитарного AML увеличена у пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями, которые являются невосприимчивыми к лечению ингибитором BCL-2 венетоклаксом и гипометилирующим средством (HMA) азациитидином. Следовательно, обнаружено, что присутствие клеток моноцитарного AML увеличивает риск рецидива заболевания. Авторы настоящего изобретения также определили, что клетки моноцитарного AML экспрессируют значительно более высокие уровни CD70, относительно менее дифференцированных клеток примитивного AML. Устойчивые к венетоклаксу и азациитидину клетки моноцитарного AML являлись чувствительными к лечению антителом против CD70, как *in vitro*, так и в модели заболевания на мышах *in vivo*. Без намерения быть связанными теорией, клетки моноцитарного AML считают подвергаемыми нацеливанию посредством опосредованной антителом против CD70 зависимой от NK-клеток ADCC. Таким образом, антитела против CD70, как описано в настоящем описании, считают особенно эффективными для лечения миелоидных злокачественных новообразований, которые являются устойчивыми к ингибиторам BCL-2, таким как венетоклакс. В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека. Способ является особенно полезным в лечении субъектов-людей, имеющих миелоидное злокачественное новообразование, которое имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к ингибитору BCL-2, такому как венетоклакс. Способ включает стадии

(а) выбора человека, имеющего миелоидное злокачественное новообразование, которое имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к ингибитору BCL-2; и

(b) введения человеку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающегося с CD70.

В конкретных вариантах осуществления, человек претерпел неудачу лечения миелоидного злокачественного новообразования ингибитором BCL-2. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования ингибитором BCL-2, но впоследствии страдал рецидивом миелоидного злокачественного новообразования. Клинический ответ может представлять собой любой клинический ответ, включая полный ответ, частичный ответ или минимальный ответ. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования ингибитором BCL-2, но впоследствии имел уменьшенный клинический ответ на ингибитор BCL-2. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования ингибитором BCL-2, но впоследствии становился невосприимчивым к лечению ингибитором BCL-2. В других конкретных вариантах осуществления, человек не имел клинически значимый ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, человек претерпел неудачу лечения миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью, но впоследствии страдал рецидивом миелоидного злокачественного новообразования. Клинический ответ может представлять собой любой клинический ответ, включая полный ответ, частичный ответ или минимальный ответ. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью, но впоследствии имел уменьшенный клинический ответ на венетоклаксом или его фармацевтически приемлемую соль. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью, но впоследствии становился невосприимчивым к лечению венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью. В других конкретных вариантах осуществления, человек не имел клинически значимый ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью.

Венетоклаксом для использования в способах, описанных в настоящем описании, можно предоставлять в любой пригодной форме, таким образом, что он эффективно ингибирует белок BCL-2. Такие формы включают, но без ограничения, любые подходящие полиморфные, аморфные или кристаллические формы, или любые изомерные или таутомерные формы. В конкретных вариантах осуществления, виды комбинированной терапии, описанные в настоящем описании, содержат венетоклаксом, синтезированный, в соответствии со способом, описанным в US2010/0305122 (содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки). В альтернативных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают венетоклаксом, соответствующий

формам или синтезированный, в соответствии со способами, описанными в любом из CN107089981 (A), CN107648185 (A), EP3333167, WO2017/156398, WO2017/212431, WO2018/009444, WO2018/029711, WO2018/069941, WO2018/157803 и WO2018/167652 (содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки). В конкретных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают венетоклакс в любой из кристаллических форм или форм солей, описанных в WO2012/071336 (содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

Фармацевтически приемлемые соли для использования в соответствии с настоящим изобретением включают соли кислых или основных групп. Фармацевтически приемлемые кислотнo-аддитивные соли включают, но без ограничения, соли гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, нитрат, сульфат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, ацетат, лактат, салицилат, цитрат, тартрат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкаронат, сахарат, формат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е., 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемые соли могут быть образованы с различными аминокислотами. Подходящие основные соли включают, но без ограничения, соли алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия, цинка и диэтаноламина.

В конкретных вариантах осуществления, человек претерпел неудачу лечения миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом, но впоследствии страдал рецидивом миелоидного злокачественного новообразования. Клинический ответ может представлять собой любой клинический ответ, включая полный ответ, частичный ответ, или минимальный ответ. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом, но впоследствии имел уменьшенный клинический ответ на венетоклакс. В конкретных вариантах осуществления, человек имел клинический ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом, но впоследствии становился невосприимчивым к венетоклаксом. В других конкретных вариантах осуществления, человек не имел клинически значимый ответ на лечение миелоидного злокачественного новообразования венетоклаксом.

Способ включает стадию введения человеку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающегося с CD70. Введение можно осуществлять с использованием любого подходящего способа введения, включая, без ограничения, пероральный, другой парентеральный, внутривенный, внутрибрюшинный, легочный и подкожный. Для парентеральных способов введения (например, внутривенного, внутрибрюшинного, легочного и подкожного), антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, можно вводить человеку в форме инъекции или в форме инфузии.

Как описано в другом месте в настоящем описании, CD70 уже был охарактеризован как привлекательная мишень для противораковой терапии. CD70 конститутивно экспрессируется на многих типах гематологических злокачественных новообразований и солидных карцином, и его экспрессия была связана с плохим прогнозом для нескольких злокачественных опухолей. Разработаны антитела, нацеленные на CD70, и некоторые переведены в клиническую разработку.

Обнаружено, что антитела, нацеленные на CD70, являются особенно эффективными для лечения миелоидных злокачественных новообразований, в частности, лечения субъектов с острым миелоидным лейкозом (AML). Результаты клинического исследования фазы I/II, тестирующего антитело против CD70, ARGX-110 (кусатузумаб), у пациентов, имеющих AML, выявили неожиданную эффективность для этого показателя, в частности, у впервые диагностированных пациентов, классифицированных как неподходящие для стандартной интенсивной химиотерапии (см. WO2018/229303). Является особенно примечательным, что в клинических исследованиях, антитело против CD70, при использовании в комбинации с азациитидином, эффективно уменьшало количество лейкозных стволовых клеток (LSC) у пациентов с AML. Тестирование LSC, выделенных от пациентов в исследовании, выявило доказательство увеличенного асимметричного деления LSC, показательного для дифференцировки в миелоидные клетки. В совокупности, эти результаты показывают, что антитела против CD70 истощают пул LSC у пациентов с AML, таким образом, увеличивая перспективу ремиссии и уменьшая риск рецидива.

В конкретных вариантах осуществления, антитело, которое связывается с CD70, представляет собой кусатузумаб.

Дополнительное антитело против CD70 или его антигенсвязывающие фрагменты, которое можно использовать в способах, описанных в настоящем описании, включает конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC). ADC представляют собой антитела, прикрепленные к активным средствам, например, ауристатинам и майтанзинам или другим цитотоксическим средствам. Конкретные ADC сохраняют блокирующую и/или эффекторную функцию антитела (например, ADCC, CDC, ADCP), в то же время с доставкой также конъюгированного активного средства к клеткам экспрессирующим мишень (например, CD70). Примеры ADC против CD70 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 настоящим изобретением. Подходящие ADC против CD70 описаны также в WO2008074004 и WO2004073656, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В конкретных вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое связывается с CD70, независимо выбран из группы, состоящей из: переменного домена легкой цепи (VL) антитела; переменного домена тяжелой цепи (VH) антитела; одноцепочечного антитела (scFv); фрагмента F(ab')₂; фрагмента Fab; фрагмента Fd; фрагмента Fv; одноплечевого (моновалентного) антитела; диател, триател, тетрател или

любой антигенсвязывающей молекулы, сформированной посредством комбинации, сборки или конъюгации таких антигенсвязывающих фрагментов.

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластических синдромов (MDS), миелопролиферативных неоплазий (MPN), хронического миелоидного лейкоза (CML) и хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML). В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML. В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой MDS. В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой MPN. В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой CML. В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой CMML.

Как упомянуто выше, в конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML. Острый миелоидный лейкоз также называют острым миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, острый гранулоцитарный лейкоз и острый нелимфоцитарный лейкоз. Оценки Американского онкологического общества для лейкоза в США для 2020 г. включают приблизительно 19940 новых случаев AML, в основном, у взрослых; и приблизительно 11180 случаев смерти от AML, почти все у взрослых. AML является одним из наиболее распространенных типов лейкоза у взрослых. AML все еще является в общем довольно редким, насчитывая только приблизительно 1% из всех злокачественных опухолей. AML, в общем, является заболеванием пожилых людей и является малораспространенным до возраста 45 лет. Средний возраст людей, когда у них впервые диагностирован AML, составляет приблизительно 68 лет, однако, AML может возникать также у детей.

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой моноцитарный AML. Острый моноцитарный лейкоз (AMoL или AML-M5), также известный как монобластный AML, считают типом острого миелоидного лейкоза (AML). Для соответствия критериям Всемирной организации здравоохранения (WHO) для AML-M5, пациент должен иметь более чем 20% бластов в костном мозге, и из них, более чем 80% должны быть из моноцитарной линии.

Как упомянуто выше, в конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой MDS. Миелодиспластические синдромы (MDS) представляют собой группу разнообразных нарушений (злокачественных опухолей) костного мозга, при которых костный мозг не продуцирует достаточно здоровых клеток крови. MDS часто обозначают как «нарушение с недостаточностью костного мозга». У пациента с миелодиспластическим синдромом, стволовые клетки крови (незрелые клетки) не становятся зрелыми эритроцитами, лейкоцитами или тромбоцитами в костном мозге. Эти незрелые клетки крови, называемые бласты, не функционируют таким образом, каким должны, и погибают либо в костном мозге, либо вскоре после их попадания в кровь.

Это оставляет меньше пространства для формирования здоровых лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в костном мозге. Когда присутствует меньше здоровых клеток крови, может возникать инфекция, анемия или склонность к кровотечению. Различные типы MDS включают, без ограничения, невосприимчивую анемию, невосприимчивую анемию с кольцевыми сидеробластами, невосприимчивую анемию с избытком бластов, невосприимчивую цитопению с мультилинейной дисплазией, невосприимчивую цитопению с однолинейной дисплазией, миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной хромосомной аномалией del(5q), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML) и не поддающийся классификации миелодиспластический синдром.

В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека. Соответствующие уровни экспрессии можно определять с использованием любого пригодного способа, включая, без ограничения, активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS), флуоресцентную микроскопию с использованием поддающихся детекции (например, флуоресцентно меченных) антител, специфических для соответствующих молекул(ы) клеточной поверхности, и анализ экспрессии мРНК. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии BCL-2 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии CD117 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии CD11b злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии CD68 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии CD64 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии BCL2A1 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, стадия (a) включает определение уровня экспрессии MCL1 злокачественных миелоидных клеток человека.

В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере один из BCL-2 и CD117 подвергнут понижающей регуляции, и по меньшей мере один из CD11b, CD68, CD64, CD70, BCL2A1 и MCL1 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, BCL-2 подвергнут понижающей регуляции, и CD11b подвергнут

повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD34 подвергнут понижающей регуляции, CD11b подвергнут повышающей регуляции, и CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD38 подвергнут повышающей регуляции, CD33 подвергнут повышающей регуляции, CD34 подвергнут понижающей регуляции, и CD11b подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD38 подвергнут повышающей регуляции, CD33 подвергнут повышающей регуляции, CD34 подвергнут понижающей регуляции, и CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD38 подвергнут повышающей регуляции, CD33 подвергнут повышающей регуляции, CD11b подвергнут повышающей регуляции, и CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD38 подвергнут повышающей регуляции, CD34 подвергнут понижающей регуляции, и CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD33 подвергнут повышающей регуляции, CD34 подвергнут понижающей регуляции, CD11b подвергнут повышающей регуляции, и CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD38 подвергнут повышающей регуляции, CD33 подвергнут повышающей регуляции, CD34 подвергнут понижающей регуляции, CD11b подвергнут повышающей регуляции, и CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD38 подвергнут повышающей регуляции, CD33 подвергнут повышающей регуляции, CD34 подвергнут понижающей регуляции, CD11b подвергнут повышающей регуляции, и CD70 подвергнут повышающей регуляции.

В следующих вариантах осуществления, стадия (а) включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: CD38, CD11b и CD33, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, CD38 подвергнут повышающей регуляции, CD33 подвергнут повышающей регуляции, и CD11b подвергнут повышающей регуляции.

В следующих вариантах осуществления, стадия (а) включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: CD45, CD11b и CD117, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, CD45 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD45 подвергнут повышающей регуляции, и CD11b подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD45 подвергнут повышающей регуляции, и CD117 подвергнут понижающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, CD45 подвергнут повышающей регуляции, CD11b подвергнут повышающей регуляции, и CD117 подвергнут понижающей регуляции.

В следующих вариантах осуществления, стадия (а) включает определение уровня экспрессии CD45 и определение уровня SSC. В конкретных вариантах осуществления, клетки охарактеризованы как CD45^{яркий} и SSC^{высокий}.

В конкретном варианте осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 (например, венетоклаксом) подвергало повышающей регуляции экспрессию CD70 на миелоидных клетках. Пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями, претерпевших неудачу лечения, связанного с BCL-2, можно затем лечить антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с CD70 (например,

кусатузумабом). Лечение антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с CD70, в свою очередь, подвергает повышающей регуляции экспрессию BCL-2 на миелоидных клетках. Таким образом, лечение ингибитором BCL-2 (например, венетоклаксом) и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с CD70, (например, кусатузумабом), оказывают взаимно дополняющий эффект у пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями и улучшают ответы на лечение у этих пациентов. В конкретном варианте осуществления, антитело против CD70 или его связывающий CD70 фрагмент комбинируют (вводят совместно) с ингибитором BCL-2 для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у пациента, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2. В конкретных вариантах осуществления, стадия (а) включает определение уровня экспрессии CD70 злокачественных миелоидных клеток человека. Соответствующий уровень экспрессии можно определять с использованием любого пригодного способа, включая, без ограничения, активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS) и флуоресцентную микроскопию с использованием поддающихся детекции (например, флуоресцентно меченных) антител, специфических для CD70.

В конкретных вариантах осуществления, CD70 подвергнут повышающей регуляции, по сравнению с уровнем экспрессии CD70, как измерено до или во время лечения ингибитором BCL-2. В конкретных вариантах осуществления, лечение ингибитором BCL-2 включает лечение венетоклаксом. В конкретных вариантах осуществления, лечение ингибитором BCL-2 включает лечение ингибитором BCL-2, отличным от венетоклакса.

В конкретных вариантах осуществления, в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

(а) лечение ингибитором BCL-2; и

(b) отсутствие ремиссии в ответ на лечение ингибитором BCL-2. В конкретных вариантах осуществления, отсутствие ремиссии представляет собой отсутствие полной ремиссии. В других вариантах осуществления, отсутствие ремиссии представляет собой отсутствие по меньшей мере частичной ремиссии. В конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 представляет собой лечение венетоклаксом. В других конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 представляет собой лечение ингибитором BCL-2, отличным от венетоклакса.

В конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA). Гипометилирующие средства ингибируют нормальное метилирование ДНК и/или РНК. Неограничивающие примеры гипометилирующих средств представляют собой азацитидин, децитабин и гуадецитабин.

Азацитидин представляет собой аналог цитидина, и децитабин представляет собой его дезокси-производное. Гуадецитабин представляет собой устойчивое к цитидиндезаминазе пролекарство децитабина. Азацитидин и децитабин представляют собой ингибиторы ДНК-метилтрансфераз (DNMT), как известно, осуществляющие

повышающую регуляцию экспрессии гена посредством гипометилирования промотора. Такое гипометилирование нарушает функцию клетки, таким образом, приводя к цитотоксическим эффектам.

В конкретных вариантах осуществления, в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

- (a) лечение ингибитором BCL-2;
- (b) частичную или полную ремиссию; и
- (c) частичный или полный рецидив.

В конкретных вариантах осуществления, человек имеет клинический анамнез, включающий лечение ингибитором BCL-2; частичную ремиссию; и частичный рецидив.

В конкретных вариантах осуществления, человек имеет клинический анамнез, включающий лечение ингибитором BCL-2; частичную ремиссию; и полный рецидив.

В конкретных вариантах осуществления, человек имеет клинический анамнез, включающий лечение ингибитором BCL-2; полную ремиссию; и частичный рецидив.

В конкретных вариантах осуществления, человек имеет клинический анамнез, включающий лечение ингибитором BCL-2; полную ремиссию; и полный рецидив.

Кроме того, в соответствии с этими вариантами осуществления, в конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (НМА). В конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 представляет собой лечение венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью. В других конкретных вариантах осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 представляет собой лечение ингибитором BCL-2, отличным от венетоклакса или его фармацевтически приемлемой соли. Как упомянуто выше, неограничивающие примеры гипометилирующих средств представляют собой азациитидин, децитабин и гуадецитабин.

В соответствии с каждым из вышеуказанных вариантов осуществления, в конкретных вариантах осуществления, гипометилирующее средство (НМА) вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70. В конкретных вариантах осуществления, НМА выбрано из группы, состоящей из азациитидина, децитабина, гуадецитабина и любой их комбинации. В конкретных вариантах осуществления, НМА представляет собой азациитидин. В конкретных вариантах осуществления, НМА представляет собой децитабин. В конкретных вариантах осуществления, НМА представляет собой гуадецитабин.

НМА можно вводить с таким же расписанием или по существу с таким же расписанием, как расписание для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, или его можно вводить с расписанием, отличным от расписания для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70. Кроме того, способ введения НМА может представлять собой такой же способ введения, как способ для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые

связываются с CD70, или он может являться отличным от способа введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70.

В соответствии с каждым из вышеуказанных вариантов осуществления, в конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70. Ингибитор BCL-2 можно вводить с таким же расписанием или по существу с таким же расписанием, как расписание для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, или его можно вводить с расписанием, отличным от расписания для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70. Кроме того, способ введения ингибитора BCL-2 может представлять собой такой же способ введения, как способ для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, или он может являться отличным от способа введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, вводят совместно с ингибитором BCL-2 и гипометилирующим средством (HMA). В конкретных вариантах осуществления, антитело, которое связывается с CD70, представляет собой кусатузумаб. В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль. В конкретных вариантах осуществления, HMA представляет собой азациитидин. В конкретных вариантах осуществления, кусатузумаб вводят совместно с венетоклаксом и азациитидином.

В соответствии с каждым из вышеуказанных вариантов осуществления, в конкретных вариантах осуществления, венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70. Венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить с таким же расписанием или по существу с таким же расписанием, как расписание для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, или его можно вводить с расписанием, отличным от расписания для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70. Кроме того, способ введения венетоклакса или его фармацевтически приемлемой соли может представлять собой такой же способ введения, как способ для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, или он может являться отличным от способа введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2;

аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;

SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, на 100% идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, на 100% идентичную SEQ ID NO: 8.

В конкретных вариантах осуществления, аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична VH, состоящему из SEQ ID NO: 7, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2; и

аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3; и

аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична

VL, состоящему из SEQ ID NO: 8, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;

аминокислотная последовательность LCDR2 состоит из SEQ ID NO: 5; и

аминокислотная последовательность LCDR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

В конкретных вариантах осуществления, способ может дополнительно включать введение одного или нескольких дополнительных лекарственных средств, например, по меньшей мере одного дополнительного противоракового средства, предпочтительно, средства для лечения миелоидного злокачественного новообразования. В конкретных вариантах осуществления, дополнительное противораковое средство представляет собой средство для лечения острого миелоидного лейкоза (AML).

В конкретных вариантах осуществления, антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне 0,1-25 мг/кг, предпочтительно, 10 мг/кг. Альтернативно или дополнительно, ингибитор BCL-2, предпочтительно, венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль, можно вводить в дозе в диапазоне 100 мг-600 мг. В предпочтительных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают введение комбинации, кроме того, содержащей азацитидин, где азацитидин вводят в дозе 75 мг/м². В следующих предпочтительных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают введение комбинации, кроме того, содержащей децитабин, где децитабин вводят в дозе 20 мг/м².

В конкретных вариантах осуществления, способы дополнительно включают мониторинг количества бластов у пациента. Счет в периферической крови и/или костном мозге пациента может являться уменьшенным, например, уменьшенным до менее чем 25%, например, уменьшенным до 5%, например, уменьшенным до менее чем 5%, например, уменьшенным до минимальных уровней остаточного заболевания, например, уменьшенным до не поддающихся детекции уровней. В конкретных вариантах осуществления, количество бластов в костном мозге является уменьшенным до между 5% и 25%, и процент бластов в костном мозге является уменьшенным на более чем 50%, по сравнению с количеством до лечения.

В конкретных вариантах осуществления, способы индуцируют частичную ремиссию. В конкретных вариантах осуществления, способы индуцируют полную ремиссию, необязательно, с восстановлением тромбоцитов и/или восстановлением нейтрофилов. Способы могут индуцировать независимость от трансфузии эритроцитов или тромбоцитов, или и тех, и других, в течение 8 недель или более, 10 недель или более, 12 недель или более. В конкретных вариантах осуществления, способы уменьшают частоту смертности после 30-суточного периода или после 60-суточного периода.

В конкретных вариантах осуществления, способы увеличивают выживаемость. Например, способы могут увеличивать выживаемость, относительно являющихся стандартом лечения средства или средств, используемых для лечения конкретного миелоидного злокачественного новообразования, подвергаемого лечению с использованием комбинации. Способы могут обеспечивать статус минимального остаточного заболевания, который является отрицательным.

В конкретных вариантах осуществления, способы дополнительно включают стадию подвергания субъекта трансплантации костного мозга. Альтернативно или дополнительно, способы могут дополнительно содержать 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 новообразований, предпочтительно AML. Предпочтительные средства могут быть выбраны из ингибиторов селектина (например, GMI-1271); ингибиторов рецепторной FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3) (например, мидостаурина); ингибиторов циклин-зависимой киназы; ингибиторов аминопептидазы;

ингибиторов JAK/STAT; цитарабина; антрациклиновых соединений (например, даунорубицина, идарубицина); доксорубицина; гидроксимочевины; виксеоса; ингибиторов IDH1 или IDH2, таких как айдифа (или энаседениб) или тибсово (или ивосидениб); ингибиторов Smoothened, таких как гласдегиб, ингибиторов BET бромдомена, нацеливающих на CD123 или CD33 средств, ингибиторов HDAC, нацеливающих на LSC средства, нацеливающих на нишу AML в костном мозге средств и ингибиторов активирующего NEDD8 фермента, таких как певонедистат.

Антитела против CD70 или антигенсвязывающие фрагменты, в соответствии со способами, описанными в настоящем описании, можно формулировать с использованием любых подходящих фармацевтических носителей, адьювантов и/или наполнителей. Способы формулирования антител для терапевтического применения у человека хорошо известны в данной области, и их обзор приведен, например, в Wang et al. (2007) *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96:1-26, полное содержание которого приведено в настоящем описании. Фармацевтически приемлемые наполнители, которые можно использовать для формулирования композиций антител, включают, но без ограничения, ионообменные средства, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси частичных глицеридов растительных насыщенных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминасульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу натрия), полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилена-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль, ланолин и гиалуронидазы (например, PH20 фермент).

Ингибитор BCL-2 (предпочтительно, венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль) можно формулировать с использованием любых подходящих фармацевтических носителей, адьювантов и/или наполнителей. Подходящие средства включают, например, инкапсулирующие материалы или добавки, такие как ускорители абсорбции, антиоксиданты, связующие вещества, буферы, покрывающие средства, окрашивающие средства, разбавители, дезинтегрирующие средства, эмульгаторы, расширители, наполнители, вкусоароматические средства, смачивающие средства, смазывающие средства, отдушки, консерванты, пропелленты, обеспечивающие высвобождение средства, стерилизующие средства, подсластители, солюбилизаторы, увлажняющие средства и их смеси.

Обнаружено, что антитела против CD70, в частности ARGX-110, являются эффективными для лечения миелоидного злокачественного новообразования, в частности AML, в относительно низкой дозе. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления всех способов по настоящему изобретению, антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 0,1 мг/кг до 30 мг/кг на дозу. В конкретных вариантах осуществления всех способов по настоящему изобретению,

антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 0,1 мг/кг до 25 мг/кг на дозу, например, в диапазоне от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг. В конкретных вариантах осуществления, антитело против CD70 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в диапазоне от 1 мг/кг до 20 мг/кг на дозу. Диапазоны, описанные в настоящем описании, включают конечные точки диапазона, если не указано иное - например, введение в дозе в диапазоне 0,1-25 мг/кг включает введение в дозе 0,1 мг/кг и введение в дозе 25 мг/кг, так же как все дозы между двумя конечными точками.

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

В конкретных вариантах осуществления, вводят множественные дозы антитела против CD70 или антигенсвязывающего фрагмента. В конкретных таких вариантах осуществления, каждая доза антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента отделена 10-20 сутками, необязательно, 12-18 сутками. В конкретных вариантах осуществления, каждая доза антитела против CD70 отделена 14-17 сутками.

Ингибитор BCL-2, предпочтительно, венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль, можно дозировать, в соответствии с любым режимом, как определено, эффективным для соединения. В указаниях FDA по применению препарата, для применения ВЕНКЛЕКСТА® в лечении АМЛ предложено расписание дозирования, имеющее фазу повышения с последующей фазой поддержания. В ситуациях, когда ВЕНКЛЕКСТА® прописан в комбинации с азациитидином или децитабином, рекомендовано расписание дозирования, состоящее из: 100 мг ВЕНКЛЕКСТА® на сутки 1; 200 мг ВЕНКЛЕКСТА® на сутки 2; 400 мг ВЕНКЛЕКСТА® на сутки 3; и 400 мг ВЕНКЛЕКСТА® в комбинации с 75 мг/м² азациитидина или 20 мг/м² децитабина ежедневно в дальнейшем, до наблюдения прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. В ситуациях, когда ВЕНКЛЕКСТА® прописан в комбинации с низкой дозой цитарабина, рекомендовано расписание дозирования, состоящее из: 100 мг ВЕНКЛЕКСТА® на сутки 1; 200 мг ВЕНКЛЕКСТА® на сутки 2; 400 мг ВЕНКЛЕКСТА® на сутки 3; и 600 мг ВЕНКЛЕКСТА® в комбинации с 20 мг/м² ежедневно в дальнейшем, до наблюдения прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности.

В конкретных вариантах осуществления, каждая доза, например, пероральная доза, венетоклакса или его фармацевтически приемлемой соли лежит в диапазоне от 100 мг до 600 мг. В конкретных вариантах осуществления, венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль дозируют ежедневно при 400 мг. В конкретных вариантах

осуществления, венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль дозируют ежесуточно при 600 мг. Как описано выше, ежесуточному фиксированному дозированию венетоклакса может предшествовать период повышения, например, 3 суток, где увеличивающиеся дозы венетоклакса вводят пациенту до достижения поддерживающей ежесуточной дозы.

В конкретных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают мониторинг у пациента количества бластов, т.е. количества бластных клеток. В рамках изобретения, «бластные клетки» или «бласты» относятся к миелобластам или миелоидным бластам, представляющим собой миелоидные клетки-предшественники в костном мозге. У здоровых индивидуумов, бласты не обнаруживают в кровотоке периферической крови, и должно присутствовать менее чем 5% бластных клеток в костном мозге. У субъектов с миелоидными злокачественными новообразованиями, в частности, AML и MDS, присутствует увеличенная продукция аномальных бластов с нарушенным потенциалом к дифференцировке, и сверхпродукцию этих аномальных бластов можно детектировать посредством мониторинга количества бластов у пациента в кровотоке периферической крови или в костном мозге, или и там, и там.

Долю бластных клеток в костном мозге или периферической крови можно оценивать посредством способов, известных в данной области, например, оценки, по проточной цитометрии или морфологии клеток, клеток, полученных при биопсии костного мозга субъекта, или из мазка периферической крови. Долю бластов определяют против тотальных клеток в образце. Например, проточную цитометрию можно использовать для определения доли бластных клеток с использованием количества CD45^{тусклый}, SSC^{низкий} клеток, относительно количества тотальных клеток. В качестве дополнительного примера, морфологическую оценку клеток можно использовать для определения количества морфологически идентифицированных бластов, относительно общего количества клеток в исследуемом поле зрения.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам уменьшения доли бластных клеток в костном мозге до менее чем 25%, менее чем 20%, например, менее чем 10%. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам уменьшения доли бластных клеток в костном мозге до менее чем 5%. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам уменьшения доли бластных клеток в костном мозге до между приблизительно 5% и приблизительно 25%, где процент бластных клеток в костном мозге также уменьшают на более чем 50%, по сравнению с процентом бластных клеток в костном мозге до осуществления способа (или до лечения).

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам уменьшения доли бластных клеток в периферической крови до менее чем 25%, менее чем 20%, например, менее чем 10%. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам уменьшения доли бластных клеток в периферической крови до менее чем 5%. В конкретных вариантах осуществления,

настоящее изобретение относится к способам для уменьшения доли бластных клеток в периферической крови до между приблизительно 5% и приблизительно 25%, где процент бластных клеток в периферической крови также уменьшают на более чем 50%, по сравнению с процентом бластных клеток в периферической крови до осуществления способа (или до лечения).

Для клинического определения процента бластных клеток, как правило, морфологическая оценка клеток (также известная как цитоморфология) является предпочтительной.

В конкретных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, индуцируют полный ответ. В контексте лечения AML, полный ответ или «полную ремиссию» определяют как: бласты в костном мозге < 5%; отсутствие циркулирующих бластов и бластов с палочками Ауэра; отсутствие экстрамедуллярного заболевания; ANC $\geq 1,0 \times 10^9$ /л (1000мкл); количество тромбоцитов $\geq 100 \times 10^9$ /л (100000мкл), см. Döhner et al. (2017) *Blood* 129(4): 424-447.

С использованием способов можно достигать полного ответа с восстановлением тромбоцитов, т.е., ответа, где количество тромбоцитов составляет > 100×10^9 /л (100000/мкл). С использованием способов можно достигать полного ответа с восстановлением нейтрофилов, т.е., ответа, где количество нейтрофилов составляет > $1,0 \times 10^9$ /л (1000/мкл). Альтернативно или дополнительно, способы могут индуцировать независимость от трансфузии эритроцитов или тромбоцитов, или и тех, и других, в течение 8 недель или более, 10 недель или более, 12 недель или более.

В конкретных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, обеспечивают статус минимального или поддающегося измерению остаточного заболевания (или MRD), который является отрицательным, см. Schuurhuis et al. (2018) *Blood*. 131(12): 1275-1291.

В конкретных вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, индуцируют полный ответ без минимального остаточного заболевания (CR_{MRD}), см. Döhner et al. (2017) *Blood* 129(4): 424-447.

С использованием способа можно достигать частичного ответа или индуцировать частичную ремиссию. В контексте лечения AML, частичный ответ или частичная ремиссия включает уменьшение процента бластов в костном мозге до 5% - 25% и уменьшение от процента бластов в костном мозге до лечения на по меньшей мере 50%, см. Döhner et al. там же

Способы, описанные в настоящем описании, могут увеличивать выживаемость. Термин «выживаемость», в рамках изобретения, может относиться к общей выживаемости, 1-летней выживаемости, 2-летней выживаемости, 5-летней выживаемости, выживаемости без неблагоприятных событий, выживаемости без прогрессирования. Способы, описанные в настоящем описании, могут увеличивать выживаемость, по сравнению с золотым стандартом лечения для конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению. Золотой стандарт лечения можно также определять как наилучшую практику, стандарт

лечения, стандартное медицинское лечение или стандартную терапию. Для любого данного заболевания, могут существовать один или несколько золотых стандартов лечения, в зависимости от отличающейся клинической практики, например, в разных странах. Виды лечения, уже доступные для миелоидных злокачественных новообразований, являются изменчивыми и включают химиотерапию, радиотерапию, трансплантацию стволовых клеток и конкретные виды направленной терапии. Кроме того, клинические руководства как в США, так и в Европе руководят стандартным лечением миелоидных злокачественных новообразований, 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, содержание обоих приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Способы по настоящему изобретению могут увеличивать или улучшать выживаемость, относительно пациентов, подвергаемых любому из видов стандартного лечения миелоидного злокачественного новообразования.

Способы, описанные в настоящем описании, могут включать дополнительную стадию подвергания пациента или субъекта трансплантации костного мозга. Способы, описанные в настоящем описании, можно также использовать для подготовки пациента или субъекта, имеющего миелоидное злокачественное новообразование, к трансплантации костного мозга. Как описано выше, способы по настоящему изобретению можно осуществлять таким образом, чтобы уменьшать абсолютные или относительные количества бластных клеток в костном мозге или периферической крови. В конкретных вариантах осуществления, способы осуществляют таким образом, чтобы уменьшать количество бластных клеток в костном мозге и/или периферической крови до трансплантации. Способы можно использовать для уменьшения количества бластных клеток до менее чем 5%, для подготовки пациента или субъекта к трансплантации костного мозга.

Один аспект изобретения представляет собой способ идентификации и лечения пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование, включающий стадии:

- (i) измерения статуса миелоидной дифференцировки пациента;
- (ii) определения того, имеет ли пациент дифференцированный моноцитарный AML, где пациента, имеющего дифференцированный моноцитарный AML, идентифицируют как пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом; и
- (iii) введения антитела против CD70 или его связывающего CD70 фрагмента пациенту, идентифицированному как пациент, подлежащий лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В конкретных вариантах осуществления, стадии (i) и (ii) проводят в образце, полученном от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием.

В конкретных вариантах осуществления, образец костного мозга пациента содержит клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD38⁺/CD34⁻/CD33⁺/CD11b⁺/CD70⁺ или клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD34⁻/CD117⁻/CD11b⁺/CD68⁺/CD14⁺/CD64⁺.

С. Медицинские применения

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CD70, для применения в терапии. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, предназначены для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у человека. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, предназначены для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у человека, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании дифференциальных уровней экспрессии одного или нескольких маркеров.

В конкретных вариантах осуществления, лечению предшествует отбор, включающий стадии:

- (i) измерения статуса миелоидной дифференцировки человека, и
- (ii) определения того, имеет ли человек дифференцированный моноцитарный AML,

и

где терапевтически эффективную дозу антитела против CD70 или его связывающего фрагмента против CD70 вводят указанному человеку, имеющему дифференцированный моноцитарный AML.

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CD70, для применения в способе лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, где указанный способ включает стадии:

(a) выбора человека, имеющего миелоидное злокачественное новообразование, который имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к ингибитору BCL-2; и

(b) введения человеку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающегося с CD70.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CD70, для применения в способе лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с ингибитором BCL-2.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CD70, для применения в способе лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека,

как описано в настоящем описании, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с гипометилирующим средством (НМА).

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с CD70, для применения в способе лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с ингибитором BCL-2 и гипометилирующим средством (НМА).

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, и ингибитора BCL-2 для применения в способе лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, и гипометилирующего средства (НМА) для применения в способе лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, ингибитора BCL-2 и гипометилирующего средства (НМА) для применения в способе лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, антитело, которое связывается с CD70, представляет собой кусатузумаб. В конкретных вариантах осуществления, ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль. В конкретных вариантах осуществления, НМА представляет собой азацитидин. В конкретных вариантах осуществления, комбинация представляет собой кусатузумаб, венетоклакс и азацитидин.

В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML. В конкретных вариантах осуществления, миелоидное злокачественное новообразование представляет собой моноцитарный AML. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании дифференциальных уровней экспрессии одного или нескольких маркеров.

В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании дифференциального уровня(ей) экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека. Соответствующие уровни экспрессии можно определять с использованием любого пригодного способа, включая, без ограничения, активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS), флуоресцентную микроскопию с использованием поддающихся

детекции (например, флуоресцентно меченных) антител, специфических для соответствующих молекул(ы) клеточной поверхности, и анализ экспрессии мРНК. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании дифференциального уровня(ей) экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании дифференциального уровня(ей) экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии BCL-2 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии CD117 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии CD11b злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии CD68 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии CD64 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии BCL2A1 злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии MCL1 злокачественных миелоидных клеток человека.

В конкретных вариантах осуществления, уровень(и) экспрессии по меньшей мере одного из BCL-2 и CD117 подвергнут понижающей регуляции, и по меньшей мере одного из CD11b, CD68, CD64, CD70, BCL2A1 и MCL1 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии BCL-2 подвергнут понижающей регуляции, и уровень экспрессии CD11b подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии BCL-2 подвергнут понижающей регуляции, и уровень экспрессии CD68 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии BCL-2 подвергнут понижающей регуляции, и уровень экспрессии CD64 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии BCL-2 подвергнут понижающей регуляции, и уровень экспрессии CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии BCL-2 подвергнут

CD70 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии CD38 подвергнут повышающей регуляции, уровень экспрессии CD33 подвергнут повышающей регуляции, уровень экспрессии CD34 подвергнут понижающей регуляции, уровень экспрессии CD11b подвергнут повышающей регуляции, и уровень экспрессии CD70 подвергнут повышающей регуляции.

В следующих вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: CD38, CD11b и CD33, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии CD38 подвергнут повышающей регуляции, уровень экспрессии CD33 подвергнут повышающей регуляции, и уровень экспрессии CD11b подвергнут повышающей регуляции.

В следующих вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: CD45, CD11b и CD117, злокачественных миелоидных клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии CD45 подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии CD45 подвергнут повышающей регуляции, и уровень экспрессии CD11b подвергнут повышающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии CD45 подвергнут повышающей регуляции, и уровень экспрессии CD117 подвергнут понижающей регуляции. В конкретных вариантах осуществления, уровень экспрессии CD45 подвергнут повышающей регуляции, уровень экспрессии CD11b подвергнут повышающей регуляции, и уровень экспрессии CD117 подвергнут понижающей регуляции.

В следующих вариантах осуществления, человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании уровня экспрессии CD45 и определения уровня SSC. В конкретных вариантах осуществления, клетки охарактеризованы как CD45^{яркий} и SSC^{высокий}.

В конкретном варианте осуществления, прошлое лечение ингибитором BCL-2 (например, венетоклаксом) подвергло повышающей регуляции экспрессию CD70 на миелоидных клетках. Пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями, претерпевших неудачу лечения BCL-2, можно затем лечить антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с CD70, (например, кусатузумабом). Лечение антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с CD70, в свою очередь, подвергает повышающей регуляции экспрессию BCL-2 на миелоидных клетках. Таким образом, лечение ингибитором BCL-2 (например, венетоклаксом) и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с CD70, (например, кусатузумабом) оказывают взаимно дополняющий эффект у пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями и улучшают ответы на лечение у этих пациентов. В конкретном варианте осуществления, антитело против CD70

или его связывающий CD70 фрагмент комбинируют (вводят совместно) с ингибитором BCL-2 для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у пациента, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2. В конкретных вариантах осуществления, измеряют уровень экспрессии CD70 злокачественных миелоидных клеток человека. Соответствующий уровень экспрессии можно определять с использованием любого пригодного способа, включая, без ограничения, активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS) и флуоресцентную микроскопию с использованием поддающихся детекции (например, флуоресцентно меченных) антител, специфических для CD70.

В конкретных вариантах осуществления, образец костного мозга пациента содержит клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD38⁺/CD34⁻/CD33⁺/CD11b⁺/CD70⁺ или клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD34⁻/CD117⁻/CD11b⁺/CD68⁺/CD14⁺/CD64⁺.

Все варианты осуществления, описанные в настоящем описании, относящиеся к способам лечения, в соответствии с предшествующими аспектами настоящего изобретения (см., в частности, раздел В), являются в равной степени применимыми к этим следующим аспектам и вариантам осуществления настоящего изобретения.

Д. Применение для изготовления лекарственного средства

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, для изготовления лекарственного средства. В частности, лекарственное средство является особенно применимым для лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, где указанного субъекта идентифицируют, в соответствии со способами, описанными в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к применению комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, и ингибитора BCL-2 для изготовления лекарственного средства для лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к применению комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, и гипометилирующего средства (HMA) для изготовления лекарственного средства для лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к комбинации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с CD70, ингибитора BCL-2 и гипометилирующего средства (HMA) для изготовления лекарственного средства для лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, как описано в настоящем описании.

Все варианты осуществления, описанные в настоящем описании, относящиеся к способам лечения, в соответствии с предшествующими аспектами настоящего изобретения

(см. в частности, раздел В и раздел С), являются в равной степени применимыми к этим следующим аспектам и вариантам осуществления настоящего изобретения.

Е. Диагностические способы

Следующий аспект изобретения относится к диагностическим способам. Соответственно, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование и выбран в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) измерения статуса миелоидной дифференцировки пациента, и
(ii) определения того, имеет ли пациент дифференцированный моноцитарный АМЛ, где пациента, имеющего дифференцированный моноцитарный АМЛ, идентифицируют как пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В конкретных вариантах осуществления, стадии (i) и (ii) способа представляют собой измерение и определение в образце, полученном от пациента.

В рамках изобретения, образец включает любой образец ткани или жидкости, который можно получать от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием. Образец можно использовать для определения статуса миелоидной дифференцировки пациента. Образец может содержать поддающиеся детекции количества маркера, предпочтительно маркера моноцитарных клеток. Термин образец включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные от субъекта, так же как ткани, клетки и жидкости, присутствующие в организме субъекта. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, способы предназначены для определения статуса миелоидной дифференцировки пациента или детекции маркеров *in vitro*. «Жидкость», в рамках изобретения, включает, например, слюну, слезь, мочу, кровь, лимфатическую жидкость и т.п. В некоторых вариантах осуществления, образец содержит кровь, или фракцию или компонент крови, такие как сыворотка крови, плазма крови, или лимфу, полученные от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием. В других вариантах осуществления, образец содержит костный мозг, полученный от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием.

Таким образом, в следующем варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование и выбран, в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) измерения статуса миелоидной дифференцировки образца, полученного от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием;

(ii) определения того, имеет ли образец дифференцированный моноцитарный АМЛ;

и

где присутствие дифференцированного моноцитарного АМЛ в образце идентифицирует пациента, от которого получен образец, как пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В конкретных вариантах осуществления, статус миелоидной дифференцировки определяют, в соответствии с системой классификации FAB. Система FAB представляет собой хорошо описанные и ассоциированные с клиникой средства для сегрегации пациентов с АМЛ, в соответствии с их статусом дифференцировки. Эта система классифицирует АМЛ, в соответствии с типом клеток, из которых развивается лейкоз, и с тем, насколько зрелыми являются клетки. В конкретных вариантах осуществления, статус миелоидной дифференцировки представляет собой АМЛ-М5. В других вариантах осуществления, статус миелоидной дифференцировки представляет собой АМЛ-М4. В других вариантах осуществления, статус миелоидной дифференцировки определяют в соответствии с системой классификации WHO.

В следующих аспектах, уровень дифференцированного моноцитарного АМЛ в образце, полученном от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием, может присутствовать по сравнению с predetermined значением порога отсечения для уровня дифференцированного моноцитарного АМЛ. Это позволяет сделать оценку в отношении того, является ли уровень дифференцированного моноцитарного АМЛ у пациента более высоким, более низким, не более высоким или не более низким, чем predetermined значение порога отсечения. Такое сравнение позволяет принять решение в отношении того, выбран или нет пациент для лечения антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование и выбран в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) определения уровня дифференцированного моноцитарного АМЛ в образце, полученном от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием;

(ii) сравнения уровня дифференцированного моноцитарного АМЛ в (i) с predetermined значением порога отсечения для дифференцированного моноцитарного АМЛ,

где, если уровень дифференцированного моноцитарного АМЛ, определенный в образце от пациента, является более высоким, чем predetermined значение порога отсечения, пациента выбирают для лечения антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование и выбран в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) определения уровня дифференцированного моноцитарного AML в образце, полученном от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием;

(ii) сравнения уровня дифференцированного моноцитарного AML в (i) с предопределенным значением порога отсечения для дифференцированного моноцитарного AML,

где, если уровень дифференцированного моноцитарного AML определенный в образце от пациента, является не более высоким, чем предопределенное значение порога отсечения, пациента выбирают для лечения антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование и выбран в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) определения уровня дифференцированного моноцитарного AML в образце, полученном от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием;

(ii) сравнения уровня дифференцированного моноцитарного AML в (i) с предопределенным значением порога отсечения для дифференцированного моноцитарного AML,

где, если уровень дифференцированного моноцитарного AML, определенный в образце от пациента, является более низким, чем предопределенное значение порога отсечения, пациента выбирают для лечения антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование и выбран в соответствии со способом, включающим стадии:

(i) определения уровня дифференцированного моноцитарного AML в образце, полученном от пациента с миелоидным злокачественным новообразованием;

(ii) сравнения уровня дифференцированного моноцитарного AML в (i) с предопределенным значением порога отсечения для дифференцированного моноцитарного AML,

где, если уровень дифференцированного моноцитарного AML, определенный в образце от пациента, является не более низким, чем предопределенное значение порога отсечения, пациента выбирают для лечения антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления, предопределенное значение порога отсечения для дифференцированного моноцитарного AML представляет собой средний уровень дифференцированного моноцитарного AML для контрольной когорты пациентов с AML. Все варианты осуществления, описанные в настоящем описании, относящиеся к способам лечения, в соответствии с предшествующими аспектами настоящего изобретения

(см. в частности, раздел В и раздел С), являются в равной степени применимыми к этим следующим аспектам и вариантам осуществления настоящего изобретения.

Включение в качестве ссылки

В приведенном выше описании и на протяжении следующих примеров процитированы различные публикации, полное содержание каждой из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Пациенты с AML с моноцитарным заболеванием, более вероятно, являются невосприимчивыми к венетоклаксу плюс азацитидин

Для тестирования того, можно ли по статусу дифференцировки прогнозировать способность отвечать на венетоклакс+азацитидин (VEN+AZA) в клинике, проведена ретроспективная проверка 100 последовательных пациентов с AML, впервые диагностированным, ранее не подвергнутым лечению, которым вводили VEN+AZA. Несколько исходных факторов анализировали для определения способности каждого к прогнозированию заболевания, которое являлось невосприимчивым к лечению, как определено согласно Европейской сети по изучению лейкозов [ELN; отсутствие полной ремиссии (CR), CR с неполным восстановлением содержания форменных элементов периферической крови (CRi), частичная ремиссия (PR) или состояние, свободное от морфологического лейкоза (MLFS); Dohner H et al., *Blood* 2017;129:424-47.]. Медианный возраст когорты составлял 72 лет; 20 пациентов (20%) имели документированное предшествующее гематологическое нарушение; 64 пациентов (64%) имели неблагоприятный риск заболевания по критериям ELN.

Для специфической проверки признаков, ассоциированных с миелоидной дифференцировкой, сначала использовали систему классификации FAB (French, American, British). Хотя эту систему больше не используют для клинических целей, она предоставляет хорошо описанные и ассоциированные с клиническими признаками средства для сегрегации пациентов с AML посредством статуса миелоидной дифференцировки. В подвергнутой лечению с использованием VEN+AZA когорте пациентов, 13 пациентов (13%) идентифицированы как подтип FAB-M5, который определяют как более дифференцированный фенотип моноцитарного AML, 8 (8%) представляли собой FAB-M4, и 77 (77%) представляли собой FAB-M0 или M1, что является показателем менее дифференцированного фенотипа. Однофакторный анализ выявил, что пол ($P=0,0495$), присутствие мутации пути RAS ($P=0,0039$), и состояние созревания FAB-M5 ($P < 0,0001$) являлись ассоциированными с заболеванием, которое являлось невосприимчивым к VEN+AZA (таблица 2). Многофакторный анализ выявил только состояние созревания FAB-M5 ($P=0,0066$) как являющееся прогностическим для ответа невосприимчивости (таблица 2). Конкретно, 62% из пациентов FAB-M5 являлись невосприимчивыми к VEN+AZA, в то время как 0% из FAB-M4 и только 8% из пациентов не-FAB-M5 являлись невосприимчивыми. Кроме того, медианная общая выживаемость у пациентов FAB-M5 составляла 89 суток, по сравнению с 518 суток для пациентов не-FAB-M5 ($P=0,0039$). Эти

обнаружения указывают на сильную корреляцию между статусом миелоидной дифференцировки и устойчивостью к терапии на основе венетоклакса.

Следует отметить, что в Kuusanmäki et al. (2020) *Haematologica* 105(3): 708-720 опубликовано, что, на основании тестирования *ex vivo*, в фракции тотальных моноклеарных клеток, самое высокое соотношение экспрессии генов *BCL2/MCL1* наблюдали при AML M0/1, и самое низкое при M4/5. Эта группа, кроме того, опубликовала, что, на основании характеристики *ex vivo* и тестирования чувствительности к лекарственному средству, данные экспрессии генов в образцах для обогащенного моноклеарными клетками AML показывают, что образцы AML M4/5 имеют низкую экспрессию *BCL2*, но высокую экспрессию *MCL1* и *BCL2A1*, в соответствии с уменьшенной чувствительностью к венетоклаксу, наблюдаемой для фракции тотальных моноклеарных клеток из образцов M4/5.

Таблица 2. Исходные характеристики, и однофакторный и многофакторный логистический регрессионный анализ 100 последовательных пациентов с впервые диагностированным, ранее не подвергнутым лечению AML, которым вводили VEN+AZA

Исходные переменные	Значение	Однофакторный анализ в качестве прогностического фактора для невосприимчивого заболевания		Многофакторный анализ в качестве прогностического фактора для невосприимчивого заболевания	
		OR (95% CI)	Значение p	OR (95% CI)	Значение p
Возраст (медиана)	71,5 (22-89)	0,984 (0,947-1,022)	0,4028		
Пол (женский)	51 (51%)	3,401 (1,002-11,539)	0,0495	2,096 (0,417-10,544)	0,3694
Предшествующее гематологическое нарушение	20 (20%)	0,573	0,4884		
Комплексная цитогенетика	28 (28%)	2,667 (0,863-8,237)	0,0883		
Прогностическая группа по ELN					
Благоприятная	18 (18%)				
Промежуточная	17 (17%)	4,078 (0,494-33,643)	0,0697		
Неблагоприятная	64 (64%)				
NA	1 (1%)				
Мутации пути RAS	14 (14%)	6,417 (1,813-22,708)	0,0039	2,266 (0,201-25,522)	0,5080
<i>TP53</i>	10 (10%)	1,481 (0,282-7,766)	0,6424		
<i>IDH1/IDH2</i>	27 (27%)	NE	0,9521		
<i>NPM1</i>	27 (27%)	0,162 (0,020-1,298)	0,0865	0,488 (0,034-6,966)	0,5967
<i>FLT3-ITD</i>	18 (18%)	0,663 (0,136-3,273)	0,6119		
<i>ASXL1</i>	24 (24%)	1,182 (0,339-4,122)	0,7932		
Классификация FAB					
M0/M1	77 (77%)	0,131 (0,040-0,428)	0,0008		

M2	1 (1%)				
M4	8 (8%)	NE	0,9745		
M5	13 (13%)	18,285 (4,701-71,129)	<0,0001	33,481 (2,657-421,90)	0,0066
M6a	1 (1%)				

NA, недоступно

NE, не поддается оценке

Пример 2. Моноцитарный AML является по своей природе устойчивым к VEN+AZA

Для понимания того, управляют ли отсутствием ответа моноцитарного AML на VEN+AZA внутренние механизмы, напрямую оценивали чувствительность к VEN+AZA *in vitro*, где защита от внешних факторов, таких как микроокружение, является минимальной. Поскольку систему FAB больше не используют для клинических целей, использовали фенотипические маркеры, которые могут служить в качестве суррогата для подтипа FAB-M5. Предшествующие исследования показали, что пациенты FAB-M5 теряют экспрессию примитивного маркера CD117 и имеют повышающую экспрессию моноцитарных маркеров CD11b, CD68 и CD64. Xu Y et al. (2006) *Leukemia* 20: 1321-4; Garcia C et al. (2008) *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16: 417-21; Cascavilla N et al. (1998) *Haematologica* 83: 392-7; Di Noto R et al. (1996) *Br J Haematol* 92: 562-4; Naeim F., Atlas of Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches. 1st ed. London: Academic Press; 2013. pxi, 743 p. Таким образом, разработана многоцветная панель для проточной цитометрии, включающая CD117, CD11b, CD68 и CD64, для установления отличий пациентов с моноцитарным AML (FAB-M5) от пациентов с примитивным AML (FAB-M0/M1/M2). Как показано на **фиг. 1**, этим способом легко различают две преобладающие популяции клеток у пациентов с AML. Например, у пациента 51 (Pt-51; типичный FAB-M0/M1/M2) выявлена одна популяция для доминантного заболевания, которое являлось фенотипически первичным, о чем свидетельствует CD45-средний/SSC-низкий/CD117+/CD11b-/CD68- (**фиг. 1A**). Этот пациент достиг полной ремиссии (CR) при лечении VEN+AZA. В отличие от этого, Pt-72 (типичный FAB-M5) являлся невосприимчивым к VEN+AZA, и у него выявлено доминантное моноцитарное заболевание, которое являлось CD45-яркий/SSC-высокий/CD117-/CD11b+/CD68+ (**фиг. 1B**). Анализ дополнительных 12 образцов для первичного AML подтвердил фенотипический профиль для примитивных против моноцитарных образцов (**фиг. 1C**). Далее в настоящем описании, эти AML отмечены как «прим-AML» или «моноц-AML», соответственно.

Во множестве исследований предполагали, что лейкозные стволовые клетки (LSC) являются важной мишенью видов терапии AML. Pollyea DA et al. (2017) *Blood* 129: 1627-35. Предшествующие исследования показали, что фенотип низко реакционноспособных форм кислорода (ROS-низкий) является обогащенным функционально определенными LSC. Lagadinou ED et al. (2013) *Cell Stem Cell* 12: 329-41; Pei S et al. (2018) *Cell Stem Cell* 23: 86-100.e6. Таким образом, для более прямой оценки способности отвечать на лекарственное средство в субпопуляции LSC, ROS-низкий клетки выделяли из образцов прим-AML и моноц-AML. Поскольку моноц-AML никогда напрямую не характеризовали по уровню ROS, анализы колониеобразующих единиц (КОЕ) подтвердили, что фенотип ROS-низкий является обогащенным по потенциалу стволовых клеток/предшественников при моноц-AML. Эти данные показывают, что фенотип ROS-низкий является сильно обогащенным по потенциалу стволовых клеток/предшественников при моноц-AML, подобно тому, что

опубликовано для прим-AML. Затем субпопуляции ROS-низкий из прим-AML или моноц-AML обрабатывали VEN+AZA *in vitro*. Результаты показали, что ROS-низкий LSC из образцов моноц-AML являлись значимо более устойчивыми, чем из образцов прим-AML (фиг. 1D), позволяя предполагать, что ответы невосприимчивости, наблюдаемые у пациентов FAB-M5, можно, по меньшей мере частично, приписать внутренним молекулярным механизмам, уникально присутствующим в клетках моноцитарного AML. Фигура 1 адаптирована из Pei et al. (2020).

Пример 3. Моноцитарный AML теряет экспрессию мишени венетоклакса BCL-2

Венетоклакс представляет собой специфический для BCL-2 ингибитор, и несколько исследований показали, что экспрессия BCL-2 сильно коррелирует с чувствительностью к венетоклаксу *in vitro*. Souers AJ et al. (2013) *Nat Med* 19: 202-8; Pan R et al. (2014) *Cancer Discov* 4: 362-75. Среди генов, связанных с регуляцией апоптоза, анализ выявил значимую и воспроизводимую потерю *BCL2* при моноц-AML ($N=5$), по сравнению с прим-AML ($N=7$; фиг. 2A). Анализ базы данных TCGA AML также показал прогрессивную потерю экспрессии гена *BCL2* на протяжении стадий морфологического созревания AML (FAB-M0 - FAB-M5). В результате, значимо более низкую экспрессию *BCL2* наблюдали при FAB-M5, относительно FAB-M0/M1/M2, в базе данных TCGA AML (фиг. 2B). Кроме того, уменьшенную экспрессию BCL-2 при моноц-AML подтвердили на уровне белка (фиг. 2C). Интересно, что потеря BCL-2 также возникает в ходе нормального моноцитарного развития. Novershtern N et al. (2011) *Cell* 144: 296-309; Lara-Astiaso D et al. (2014) *Science* 345: 943-9. Воспроизводимая потеря BCL-2 обнаружена на моноцитарной стадии в системах как человека, так и мыши.

В совокупности, эти анализы показывают, что потеря BCL-2 является консервативным биологическим признаком в ходе как нормального, так и злокачественного моноцитарного развития. Кроме того, данные позволяют предполагать, что потеря BCL-2 при моноцитарном AML может приводить к устойчивости к видам терапии на основе венетоклакса. Фигура 2 адаптирована из Pei et al. (2020).

Пример 4. Венетоклакс плюс азациитидин (VEN+AZA) является избирательным для моноцитарного заболевания при рецидиве

На основании вышеуказанных обнаружений, исследовали степень, до которой моноцитарное заболевание выражено у пациентов, которые первоначально отвечали, но затем имели рецидив при терапии VEN+AZA. При анализе пациентов с AML до лечения VEN+AZA, отмечено, что для большинства пациентов, у которых фактически присутствуют опухоли, показана смесь моноцитарного и примитивного фенотипа, названная «MMP-AML» (для смешанного моноцитарного/примитивного-AML). Характеристики двух пациентов с MMP-AML (Pt-12, Pt-65) анализировали в ходе лечения (фиг. 3A и 3B). При рецидиве после начальной полной ремиссии, для обоих пациентов показана почти полная потеря примитивной субпопуляции и появление доминантного моноцитарного фенотипа (CD45-яркий/SSC-высокий/CD117-/CD11b+/CD68+). Таким

образом, лечение VEN+AZA, по-видимому, индуцирует явный отбор *in vivo* моноцитарной субпопуляции у каждого пациента (фиг. 3А и 3В).

Следует отметить, что этот фенотип моноцитарного отбора, по-видимому, является уникальной клинической характеристикой терапии VEN+AZA. Действительно, предшествующие анализы пациентов, подвергнутых общепринятой химиотерапии, показали воспроизводимое обогащение более примитивных фенотипов LSC. Но TC et al. (2016) *Blood* 128: 1671-8.

Для дополнительного подкрепления этого обнаружения, анализировали данные РНК-seq 11 пар образцов при диагностике и рецидиве после общепринятой химиотерапии из отдельного исследования Shlush и соавторов. Shlush LI et al. (2017) *Nature* 547: 104-8. В этих условиях, наблюдали приобретение характерного профиля экспрессии генов LSC, и потерю моноцитарных маркеров (CD11b и CD68) и характерного профиля экспрессии моноцитарных генов при рецидиве, что подтверждает супрессию миелоидного фенотипа после химиотерапии.

Наконец, сравнивали парные образцы при диагностике против рецидива от 6 пациентов с AML, подвергнутых общепринятой химиотерапии. Ни в одном случае, моноцитарный фенотип не выявлен при рецидиве. Фактически, для 2 пациентов с моноцитарными характеристиками при диагностике, наблюдали переход к более примитивному фенотипу при рецидиве.

В совокупности, эти данные позволяют предполагать, что рецидив после общепринятой химиотерапии сильно способствует примитивному фенотипу, и что отбор моноцитарного фенотипа при рецидиве, по-видимому, является отличительной характеристикой терапии VEN+AZA. Фигура 3 адаптирована из Pei et al. (2020).

Пример 5. Лечение пациентов, имеющих уменьшенную чувствительность только к венетоклаксу - кусатузумабу

Двух или более взрослых пациентов-людей, имеющих AML, который имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к венетоклаксу, выбирают для исследования. Пациентам вводят кусатузумаб внутривенно (i.v.) в дозе приблизительно 10 мг/кг один раз каждые 12-14 суток. Количество бластов пациентов измеряют до начала введения кусатузумаба (исходная точка до лечения) и затем мониторируют приблизительно один раз в неделю в течение по меньшей мере периода, оканчивающегося через две недели после последней или наиболее недавней дозы кусатузумаба. Проточную цитометрию используют для определения доли бластных клеток с использованием количества CD45^{тусклый}, SSC^{низкий} клеток, относительно количества тотальных клеток. Уменьшение количества бластов по меньшей мере на 5% от исходной точки до лечения указывает на успешное вмешательство.

Пример 6. Лечение пациентов, имеющих уменьшенную чувствительность к венетоклаксу - кусатузумабу в комбинации с венетоклаксом

Двух или более взрослых пациентов-людей, имеющих AML, который имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к венетоклаксу, выбирают

для исследования. Пациентам вводят кусатузумаб внутривенно (i.v.) в дозе приблизительно 10 мг/кг один раз каждые 12-14 суток. Начиная со второй дозы кусатузумаба, пациентам также вводят венетоклак перорально (p.o.) ежедневно в дозе 400-600 мг, с расписанием повышения дозирования, начиная с первой дозы 100 мг и увеличивая на 100 мг/сутки до достижения целевой ежедневной дозы 400-600 мг. Количество бластов пациентов измеряют до начала введения кусатузумаба (исходная точка до лечения) и затем мониторируют приблизительно один раз в неделю в течение по меньшей мере периода, оканчивающегося через две недели после последней или наиболее недавней дозы кусатузумаба. Проточную цитометрию используют для определения доли бластных клеток с использованием количества CD45^{тусклый}, SSC^{низкий} клеток, относительно количества тотальных клеток. Уменьшение количества бластов по меньшей мере на 5% от исходной точки до лечения указывает на успешное вмешательство.

Пример 7. Лечение пациентов, имеющих уменьшенную чувствительность к венетоклаксу - кусатузумабу в комбинации с венетоклаксом и азациитидином

Двух или более взрослых пациентов-людей, имеющих AML, который имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к венетоклаксу, выбирают для исследования. Пациентам вводят кусатузумаб внутривенно (i.v.) в дозе приблизительно 10 мг/кг один раз каждые 12-14 суток. Начиная со второй дозы кусатузумаба, пациентам также вводят венетоклак перорально (p.o.) ежедневно в дозе 400-600 мг, с расписанием повышения дозирования, начиная с первой дозы 100 мг и увеличивая на 100 мг/сутки до достижения целевой ежедневной дозы 400-600 мг. Также начиная со второй дозы кусатузумаба, пациентам также вводят азациитидин 75 мг/м² подкожно (s.c.) или i.v. ежедневно в течение 7 суток; повтор цикла проводят один раз в каждые 4 недели. Количество бластов пациентов измеряют до начала введения кусатузумаба (исходная точка до лечения) и затем мониторируют приблизительно один раз в неделю в течение по меньшей мере периода, оканчивающегося через две недели после последней или наиболее недавней дозы кусатузумаба. Проточную цитометрию используют для определения доли бластных клеток с использованием количества CD45^{тусклый}, SSC^{низкий} клеток, относительно количества тотальных клеток. Уменьшение количества бластов по меньшей мере на 5% от исходной точки до лечения указывает на успешное вмешательство.

Пример 8. Клетки моноцитарного AML экспрессируют значимо более высокие уровни CD70, по сравнению с менее дифференцированными клетками примитивного AML

Анализ экспрессии мРНК CD70 показал в среднем по меньшей мере в 6 раз более высокую экспрессию CD70, на уровне транскрипции, в образцах костного мозга от пациентов с AML с подтипом FAB M5 (**фиг. 4**), содержащих по меньшей мере 80% клеток, дифференцированных в направлении моноцитарных клеток (моноцитарный AML). Клетки моноцитарного AML являются фенотипически отличными от клеток менее дифференцированного AML (примитивного AML и AML с созреванием, FAB M0-M2) и классифицированы как CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD117⁻/CD11b⁺/CD68⁺. Это отличается от клеток примитивного AML, для которых показан фенотип

CD45^{средний}/SSC^{низкий}/CD117⁺/CD11b⁻/CD68⁻ в анализе проточной цитометрии (Pei et al. 2020). Анализ ответов на комбинацию VEN+AZA для подтипов FAB AML показал, что моноцитарные бласты из подтипа FAB M5 являются ассоциированными с заболеванием, невосприимчивым к комбинации VEN+AZA. Конкретно, 62% из пациентов FAB M5 и только 8% из пациентов не-FAB M5 являлись невосприимчивыми к комбинации VEN+AZA (Pei et al 2020). Интересно, что миеломоноцитарный подтип FAB M4 также имеет увеличенные уровни CD70, по сравнению с менее дифференцированными подтипами. Другие авторы также описали, что этот подтип ассоциирован с устойчивостью к VEN+AZA (Zhang et al, 2020, Kuusanmäki et al 2017). Подтип FAB M4 представляет собой лейкоз смешанного фенотипа, поскольку он состоит из комбинации клонов с различными стадиями миелоидной дифференцировки и по меньшей мере 20% моноцитарных бластов. Для комбинации лекарственных средств VEN+AZA показана лучшая эффективность в этой подгруппе, однако, клетки моноцитарного AML, присутствующие в этой подгруппе, могут также потенциально увеличивать риск раннего рецидива (Zhang et al. 2020). Кроме того, оба подтипа M4 и M5 имеют самое низкое соотношение экспрессии генов BCL2/MCL1, которое является ассоциированным с устойчивостью к ингибированию Bcl-2 (Kuusanmäki et al 2020).

Образцы костного мозга от пациентов с моноцитарным и смешанным фенотипом AML тестировали по экспрессии CD70, и фенотип положительных по CD70 клеток подтверждали посредством проточной цитометрии (**фиг. 5**). Цитометрический анализ подтвердил, что высокая экспрессия CD70 на плазматической мембране злокачественных клеток присутствовала на устойчивых к VEN+AZA клетках моноцитарного AML с фенотипом CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD34⁻/CD117⁻/CD11b⁺/CD68⁺/CD14⁺/CD64⁺ (**фиг. 5**). Как правило, в образцах для моноцитарного заболевания показывали самую высокую экспрессию CD70 (**фиг. 5A**), в то время как для примитивных бластов показывали только очень ограниченную экспрессию CD70. Иногда в образцах смешанного фенотипа, состоящих из моноцитарных и примитивных лейкозных клеток, показывали относительно высокую экспрессию CD70 на клетках как моноцитарного, так и примитивного AML, но, как правило, для примитивных клеток показывали низкую экспрессию CD70 на клеточной поверхности. Пример образца смешанного фенотипа с высокой экспрессией CD70 на клетках примитивного и моноцитарного AML, полученного от невосприимчивого к VEN+AZA пациента, представлен на **фиг. 5B**.

Поскольку для образцов при AML часто показывают смешанный фенотип с различным соотношением примитивных и моноцитарных злокачественных клеток, проводили сравнение экспрессии CD70 в субпопуляциях моноцитарных и примитивных клеток. Анализ проточной цитометрии показал приблизительно в 6 раз более высокую медианную интенсивность флуоресценции для CD70 в случае клеток моноцитарного AML, по сравнению с клетками примитивного AML. Это подтвердило более высокую экспрессию CD70 на клетках моноцитарного AML (**фиг. 6A, слева**) и являлось сравнимым с данными, полученными из анализа мРНК CD70 (**фиг. 4**). Парный анализ для образцов также показал,

что уровень экспрессии CD70 является более высоким на клетках моноцитарного AML, чем на клетках примитивного AML, присутствующих в образце от того же пациента (**фиг. 6А, справа**). Только для ограниченного количества образцов показана в равной степени высокая экспрессия CD70 на примитивных и моноцитарных клетках. Расчет процента положительных по CD70 клеток также подтвердил данные для уровня экспрессии белка. В среднем, для более чем 50% клеток моноцитарного AML, присутствующих в образце, показана высокая экспрессия CD70, в то время как для менее чем 10% клеток примитивного AML показана экспрессия CD70 (**фиг. 6В, слева**). Кроме того, 95% образцов имели более высокий процент положительных по CD70 клеток для клеток моноцитарного AML, чем в среднем для клеток примитивного AML. Парный анализ также подтвердил тот факт, что более высокий процент положительных по CD70 моноцитарных злокачественных клеток, чем клеток примитивного AML, присутствовал в одном и том же образце (**фиг. 6В, справа**).

Пример 9. Положительные по CD70 устойчивые к VEN+AZA клетки моноцитарного AML эффективно подвергаются уничтожению посредством опосредованной кусатузумабом ADCC

Кусатузумаб представляет собой афукозилированное антитело против CD70 человека с улучшенными свойствами для опосредования NK-зависимой антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (Silence et al. 2014). Образцы для устойчивого к VEN+AZA положительного по CD70 моноцитарного AML (CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD38⁺/CD34⁻/CD33⁺/CD11b⁺/CD70⁺) и смешанного фенотипа, содержащего положительные по CD70 моноцитарные клетки (CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD38⁺/CD34⁻/CD33⁺/CD11b⁺/CD70⁺) и отрицательные по CD70 чувствительные к VEN+AZA примитивные клетки (CD45^{средний}/SSC^{низкий}/CD34⁺/CD33⁻/CD11b⁻/CD70⁻, содержащие как CD38⁺, так и CD38⁻ популяции) (**фиг. 7А**), тестировали по чувствительности к опосредованной кусатузумабом ADCC. Оба типа первичных образцов костного мозга обрабатывали кусатузумабом при концентрации 10 мкг/мл и инкубировали совместно с NK-клетками человека, выделенными посредством отрицательного отбора из РВМС здоровых доноров. NK-клетки добавляли в соотношении 1:5 и 1:15 клеток-мишеней к эффекторным клеткам (Т:Е) к образцам костного мозга для моноцитарного AML и смешанного фенотипа, соответственно. Клетки культивировали совместно в течение 24 часов при 37°C в инкубаторе для культивирования клеток. Анализ проточной цитометрии проводили для измерения количества клеток примитивного и моноцитарного AML и оценки уровня ADCC для конкретного образца. Моноцитарные клетки в обоих образцах значительно подвергались опосредованной кусатузумабом зависимой от NK-клеток ADCC (**фиг. 7В и 7С**, соответственно). Блокирующее антитело против CD70 41D12 FcDead с уменьшенными эффекторными функциями использовали в качестве отрицательного контроля, и значимого специфического для антитела эффекта при нацеливании на положительные по CD70 моноцитарные клетки не детектировали для блокирующего антитела (**фиг. 7В и 7С**). Это поддерживает специфичность опосредованных

кусатузумабом эффектов при нацеливании на положительные по CD70 устойчивые к VEN+AZA клетки моноцитарного AML.

Пример 10. Кусатузумаб эффективно нацеливается на положительные по CD70 LSC из образцов для устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML

Обогащенные ROS-низкий лейкозные стволовые клетки (LSC) для примитивного и моноцитарного AML значительно отличаются своими свойствами, поскольку ROS-низкий LSC для моноцитарного AML являются менее зависимыми от белка BCL2 для своей выживаемости и имеют увеличенную устойчивость к венетоклаксу (Pei et al. 2020). Транскриптомный анализ образцов для примитивного и моноцитарного AML и, в частности, сравнение экспрессии CD70 в субпопуляции, обогащенной ROS-низкий LSC, показали, что уровни экспрессии CD70 в ROS-низкий LSC для моноцитарного заболевания являются значимо более высокими, по сравнению с уровнями в ROS-низкий LSC из образцов для примитивного AML (**фиг. 8**).

Для тестирования того, можно ли подвергать положительные по CD70 LSC из образцов костного мозга для устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML нацеливанию посредством кусатузумаба, образцы костного мозга, полученные из устойчивых к VEN+AZA образцов, сначала инкубировали с кусатузумабом (10 мкг/мл) и NK-клетками, выделенными из PBMC от здоровых доноров (соотношение T:E 1:5). После 24-часовой инкубации, образцы переносили в среду methocult и далее культивировали для проверки того, подвергались ли LSC нацеливанию посредством опосредованной кусатузумабом ADCC. Отсутствие обработки, контроль изотипа IgG1 человека и блокирующее антитело 41D12 FcDead использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки инкубировали в инкубаторе для культивирования клеток при 37°C в течение 14 суток, и колониобразующие единицы (КОЕ) оценивали посредством подсчета растущих колоний. В условиях, когда использовали кусатузумаб, наблюдали явное падение количества растущих колоний, по сравнению с контролем без обработки (**фиг. 9**). Не детектировано значимого эффекта ни контроля изотипа, ни блокирующего антитела против CD70.

Пример 11. Кусатузумаб значимо уменьшает количество положительных по CD70 устойчивых к VEN+AZA клеток моноцитарного AML в модели на мышах с использованием происходящего от пациента ксенотрансплантата, посредством NK-зависимого механизма

Образцы от пациентов, инъецированные мышам NSGS, приживаются в костном мозге мыши. Эффективность антилейкемических соединений можно точно измерять с использованием терапевтических способов после полного приживания происходящих от пациентов образцов и посредством определения уменьшения количества злокачественных клеток в костном мозге мыши. 2×10^6 клеток из костного мозга для устойчивого к VEN+AZA моноцитарного AML на мышью NSGS приживались в течение 42 суток. Одну когорту животных подвергали обработке с использованием носителя, комбинации 100 мг/кг Ven и 3 мг/кг Aza или 10 мг/кг кусатузумаба. Вторую когорту сначала подвергали инфузии $1,5 \times 10^6$ NK-клеток, выделенных из PBMC от здоровых доноров, и затем подвергали обработке такими же комбинациями лекарственных средств, как первую когорту.

Животных подвергали обработке каждые 3 суток с использованием носителя, комбинации VEN+AZA или кусатузумаба. Через одни сутки после третьей дозы животных умерщвляли, и костный мозг из бедренной кости выделяли, и образцы анализировали посредством проточной цитометрии для определения количества клеток моноцитарного AML. Анализ проточной цитометрии показал значимое уменьшение количества злокачественных CD45⁺CD11b⁺CD117⁻ клеток человека у животных, подвергнутых обработке кусатузумабом в присутствии NK-клеток человека, но значимого эффекта не наблюдали ни для VEN+AZA, ни для кусатузумаба в отсутствие NK-клеток человека, ни для VEN+AZA в присутствии NK-клеток (**фиг. 10**). Таким образом, кусатузумаб является эффективным для истощения устойчивых к VEN+AZA положительных по CD70 клеток моноцитарного AML, посредством NK-зависимой ADCC *in vivo* у мышей NSGS.

Список литературы:

Silence et al. 2014, ARGX-110, a highly potent antibody targeting CD70, eliminates tumors via both enhanced ADCC and immune checkpoint blockade, MAbs, Mar-Apr 2014;6(2):523-32

Pei et al. 2020, Monocytic Subclones Confer Resistance to Venetoclax-Based Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia, Cancer Discov 2020;10:536-51

Zhang et al. 2020, Integrated analysis of patient samples identifies biomarkers for venetoclax efficacy and combination strategies in acute myeloid leukemia, Nature Cancer, Vol 1 Aug 2020: 826-839

Kuusanmäki et al 2020, Phenotype-based drug screening reveals association between venetoclax response and differentiation stage in acute myeloid leukemia, Haematologica 2020, Vol 105(3):708-720

Kuusanmäki et al 2017, Single-Cell Drug Profiling Reveals Maturation Stage-Dependent Drug Responses in AML, Blood (2017) 130 (Supplement 1): 3821

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения в лечении миелоидного злокачественного новообразования у человека, который является устойчивым к лечению ингибитором BCL-2.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.1, где ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.1 или 2, где миелоидное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластических синдромов (MDS), миелопролиферативных неоплазий (MPN), хронического миелоидного лейкоза (CML) и хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-3, где миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.4, где AML представляет собой моноцитарный AML.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-3, где миелоидное злокачественное новообразование представляет собой MDS.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.5, где человека идентифицируют, на основании различных уровней экспрессии, как имеющего дифференцированный моноцитарный AML.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.7, где лечению предшествует отбор, включающий стадии:

(i) измерения статуса миелоидной дифференцировки человека, и

(ii) определения того, имеет ли человек дифференцированный моноцитарный AML,

и

где терапевтически эффективную дозу антитела против CD70 или его связывающего фрагмента против CD70 вводят указанному человеку, имеющему дифференцированный моноцитарный AML.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.6 или п.7, где человека идентифицируют как имеющего дифференцированный моноцитарный AML, на основании дифференциального уровня(ей) экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.9, где уровень(и) экспрессии по меньшей мере одного из BCL-2 и CD117 подвергнут понижающей регуляции, и уровень(и) экспрессии по меньшей мере

одного из CD11b, CD68, CD64, CD70, BCL2A1 и MCL1 подвергнут повышающей регуляции.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 5-10, где измеряют уровень экспрессии CD70 злокачественных миелоидных клеток человека.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.11, где CD70 подвергнут повышающей регуляции, по сравнению с уровнем экспрессии CD70, как измерено до или во время лечения ингибитором BCL-2.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-12, где в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

- (a) лечение ингибитором BCL-2; и
- (b) отсутствие ремиссии в ответ на лечение ингибитором BCL-2.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.13, где прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-12, где в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

- (a) лечение ингибитором BCL-2;
- (b) частичную или полную ремиссию; и
- (c) частичный или полный рецидив.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.15, где прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-16, где гипометилирующее средство (HMA) вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-17, где ингибитор BCL-2 вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-18, где антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

- аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;
- аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2;
- аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3;
- аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;
- аминокислотная последовательность LCDR2 состоит из SEQ ID NO: 5; и

аминокислотная последовательность LCDR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-19, где антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.20, где антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 8.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по п.20, где аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична VH, состоящему из SEQ ID NO: 7, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2; и

аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3; и

где аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична VL, состоящему из SEQ ID NO: 8, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;

аминокислотная последовательность LCDR2 состоит из SEQ ID NO: 5; и

аминокислотная последовательность LCDR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 16-22, где НМА выбрано из группы, состоящей из азациитидина, децитабина и гуадецитабина.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 18-23, где ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, для применения по любому из пп. 1-24, где антитело, которое связывается с CD70, представляет собой кусатузумаб.

26. Способ лечения миелоидного злокачественного новообразования у человека, где указанный способ включает стадии:

(а) выбора человека, имеющего миелоидное злокачественное новообразование, который имеет уменьшенную чувствительность или является невосприимчивым к ингибитору BCL-2; и

(b) введения человеку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающегося с CD70.

27. Способ по п.26, где ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

28. Способ по п.26 или 27, где миелоидное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластических синдромов (MDS), миелопролиферативных неоплазий (MPN), хронического миелоидного лейкоза (CML) и хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

29. Способ по любому из пп. 26-28, где миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML.

30. Способ по п.29, где AML представляет собой моноцитарный AML.

31. Способ по любому из пп. 26-28, где миелоидное злокачественное новообразование представляет собой MDS.

32. Способ по любому из пп. 26-31, где стадия (a) включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из: BCL-2, CD117, CD11b, CD68, CD64, BCL2A1 и MCL1, злокачественных миелоидных клеток человека.

33. Способ по п.32, где по меньшей мере один из BCL-2 и CD117 подвергнут понижающей регуляции, и по меньшей мере один из CD11b, CD68, CD64, CD70, BCL2A1 и MCL1 подвергнут повышающей регуляции.

34. Способ по любому из пп. 26-33, где стадия (a) включает определение уровня экспрессии CD70 злокачественных миелоидных клеток человека.

35. Способ по п.34, где CD70 подвергнут повышающей регуляции, по сравнению с уровнем экспрессии CD70, как измерено до или во время лечения ингибитором BCL-2.

36. Способ по любому из пп. 26-35, где в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

(a) лечение ингибитором BCL-2; и

(b) отсутствие ремиссии в ответ на лечение ингибитором BCL-2.

37. Способ по п.36, где прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

38. Способ по любому из пп. 26-35, где в клиническом анамнезе человека, присутствуют:

(a) лечение ингибитором BCL-2;

(b) частичную или полную ремиссию; и

(c) частичный или полный рецидив.

39. Способ по п.38, где прошлое лечение ингибитором BCL-2 дополнительно включает лечение гипометилирующим средством (HMA).

40. Способ по любому из пп. 26-39, где гипометилирующее средство (HMA) вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

41. Способ по любому из пп. 26-40, где ингибитор BCL-2 вводят совместно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающим CD70.

42. Способ по любому из пп. 26-41, где антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;
аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2;
аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3;
аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;
аминокислотная последовательность LCDR2 состоит из SEQ ID NO: 5; и
аминокислотная последовательность LCDR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

43. Способ по любому из пп. 26-42, где антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8.

44. Способ по п.43, где антитело или связывающий фрагмент антитела, которые связываются с CD70, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 8.

45. Способ по п.43, где аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична VH, состоящему из SEQ ID NO: 7, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

аминокислотная последовательность HCDR1 состоит из SEQ ID NO: 1;
аминокислотная последовательность HCDR2 состоит из SEQ ID NO: 2; и
аминокислотная последовательность HCDR3 состоит из SEQ ID NO: 3; и
где аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична VL, состоящему из SEQ ID NO: 8, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где
аминокислотная последовательность LCDR1 состоит из SEQ ID NO: 4;
аминокислотная последовательность LCDR2 состоит из SEQ ID NO: 5; и
аминокислотная последовательность LCDR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

46. Способ по любому из пп. 39-45, где НМА выбрано из группы, состоящей из азациитидина, децитабина и гуадецитабина.

47. Способ по любому из пп. 41-46, где ингибитор BCL-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

48. Способ по любому из пп. 26-47, где антитело, которое связывается с CD70, представляет собой кусатузумаб.

49. Способ идентификации и лечения пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его антигенсвязывающим фрагментом, где пациент имеет миелоидное злокачественное новообразование, включающий стадии:

(i) измерения статуса миелоидной дифференцировки пациента;

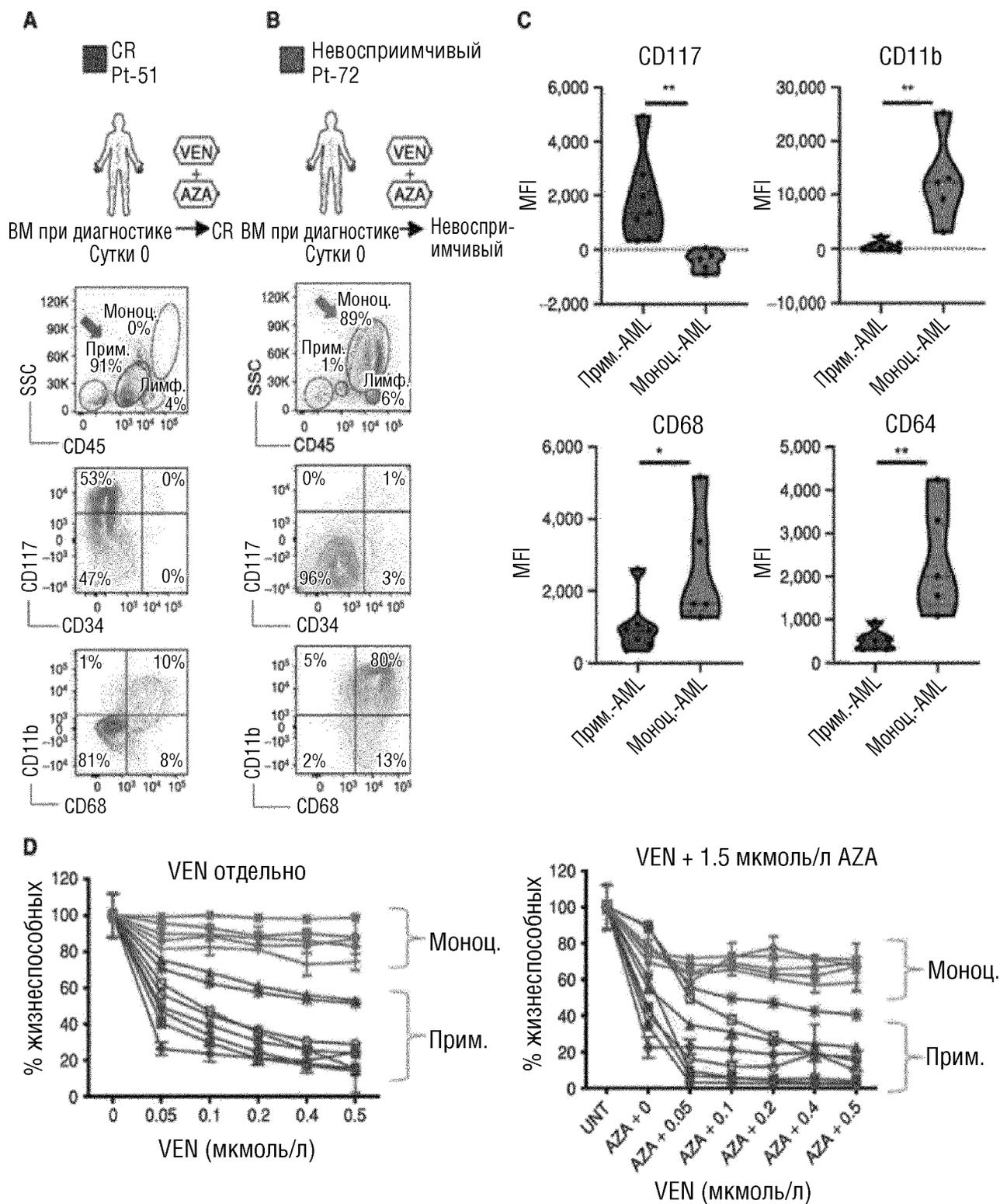
(ii) определения того, имеет ли пациент дифференцированный моноцитарный АМЛ, где пациента, имеющего дифференцированный моноцитарный АМЛ, идентифицируют как пациента, подлежащего лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом; и

(iii) введения антитела против CD70 или его связывающего CD70 фрагмента пациенту, идентифицированному как пациент, подлежащий лечению антителом против CD70 или его связывающим CD70 фрагментом.

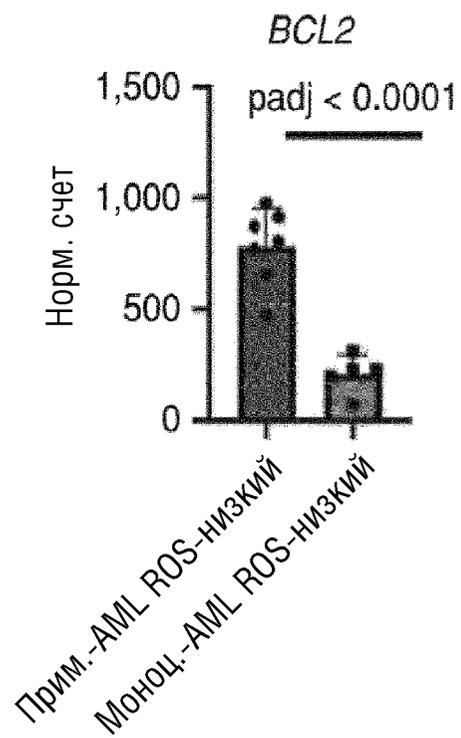
50. Способ по п.49, где образец костного мозга пациента содержит клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD38⁺/CD34⁻/CD33⁺/CD11b⁺/CD70⁺ или клетки фенотипа CD45^{яркий}/SSC^{высокий}/CD34⁻/CD117⁻/CD11b⁺/CD68⁺/CD14⁺/CD64⁺.

По доверенности

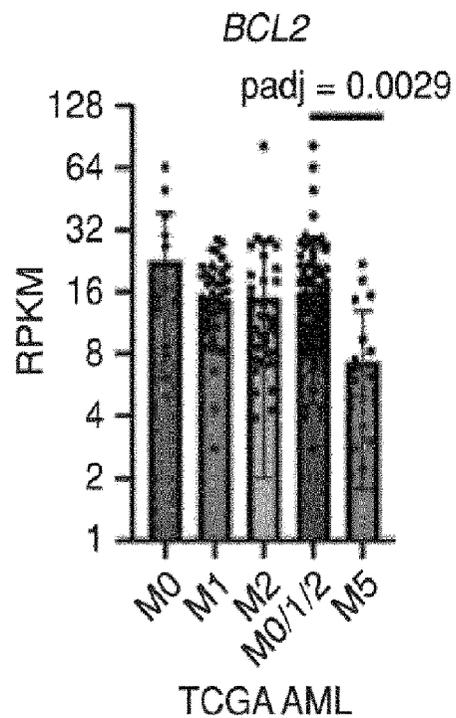
ФИГ.1



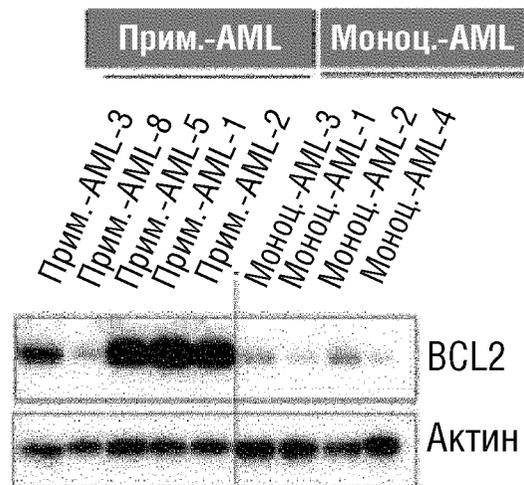
ФИГ.2А



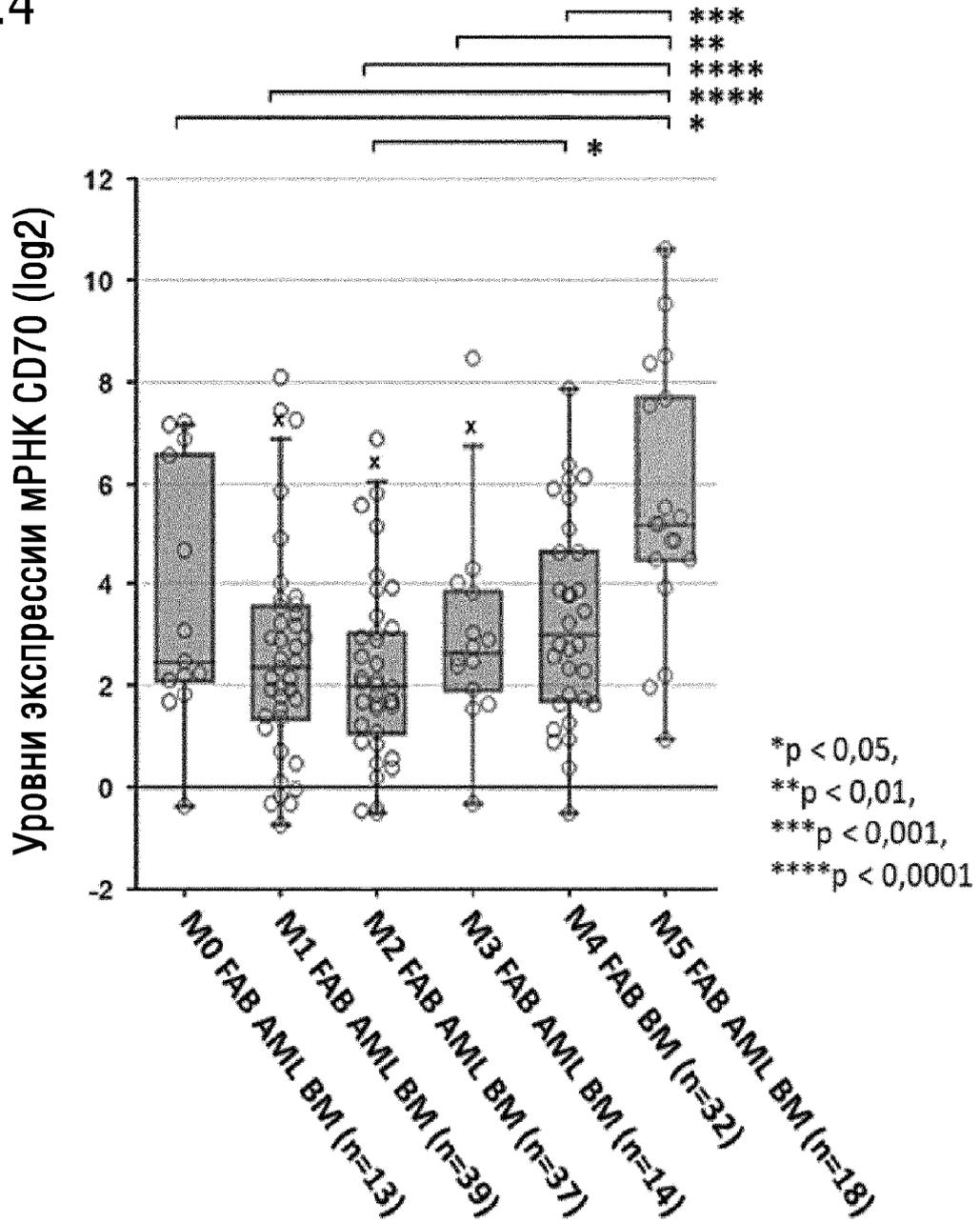
ФИГ.2В



ФИГ.2С



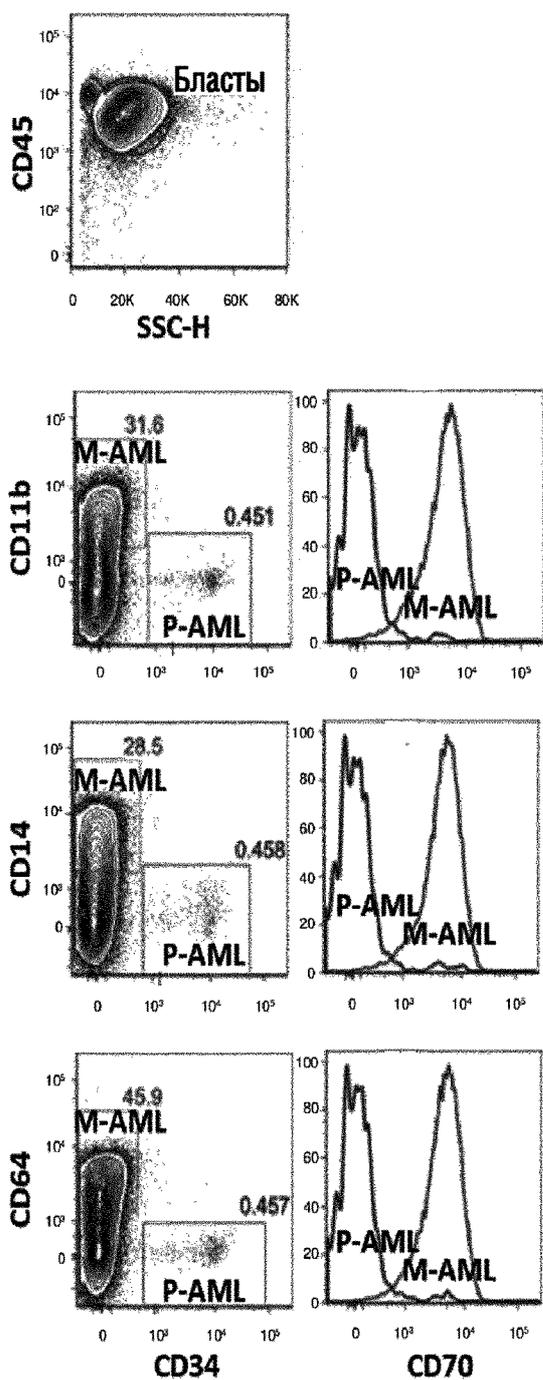
ФИГ.4



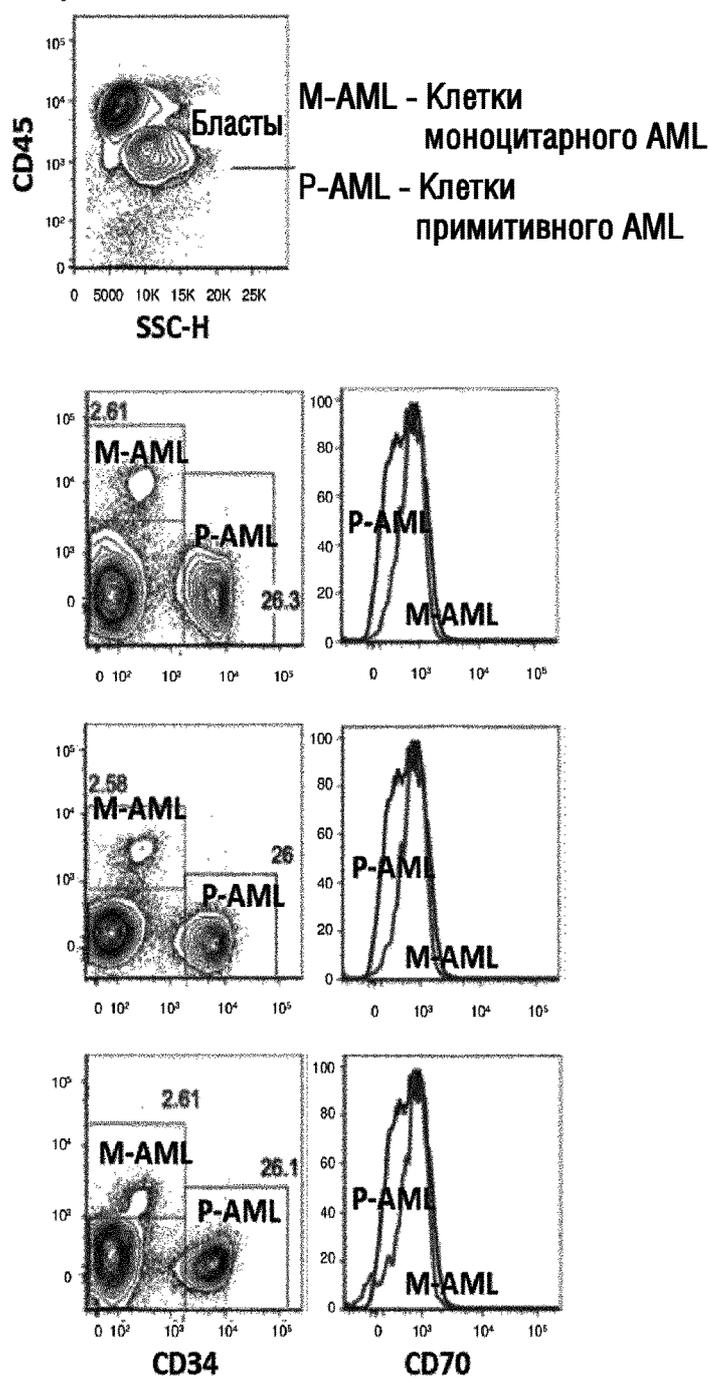
ФИГ.5А

ФИГ.5В

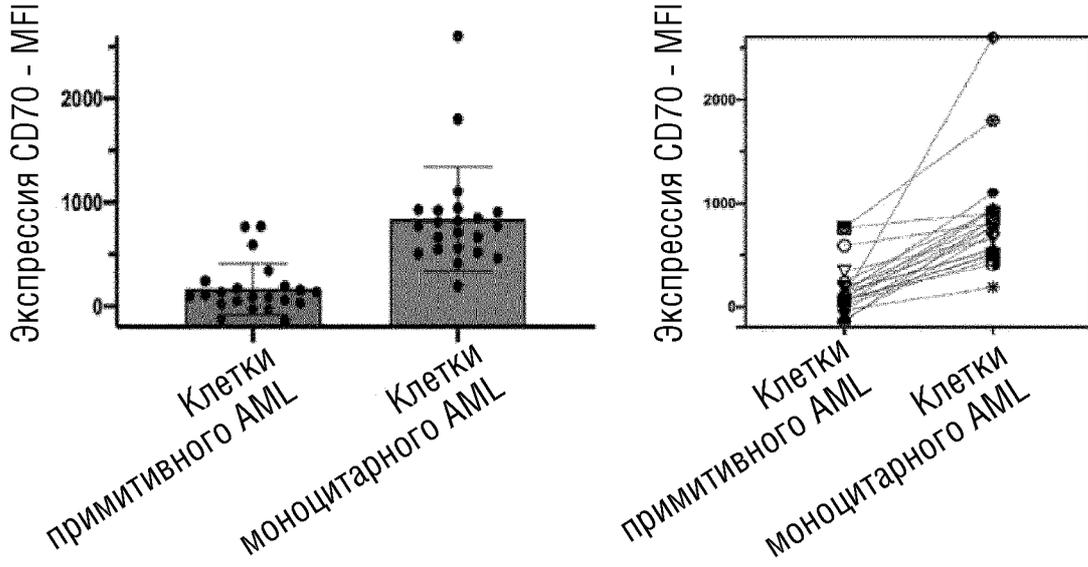
А
Невосприимчивый к Ven/Aza
Моноцитарный AML



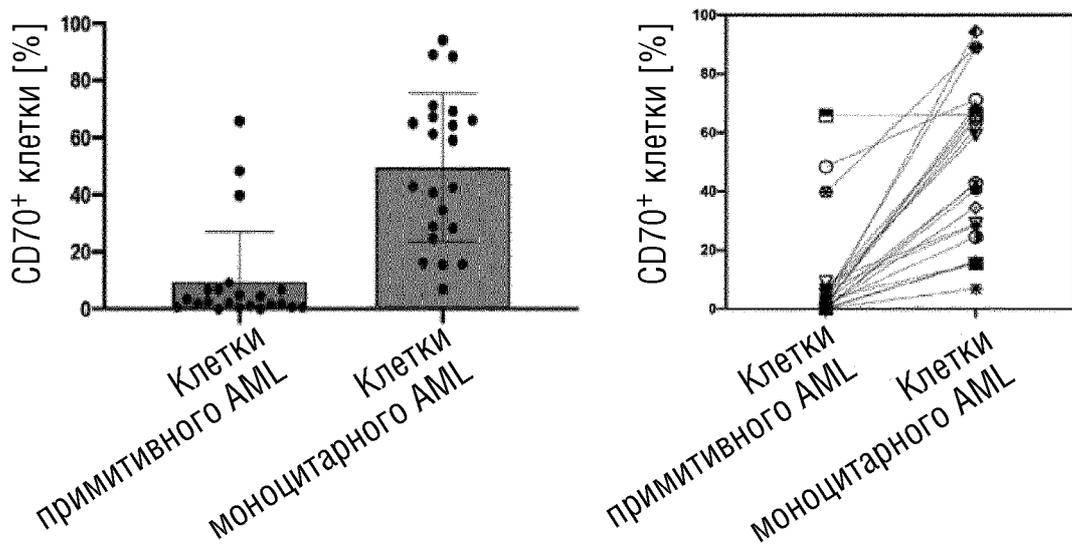
В
Невосприимчивый к Ven/Aza
Смешанный моноцитарный-
примитивный AML



ФИГ.6А

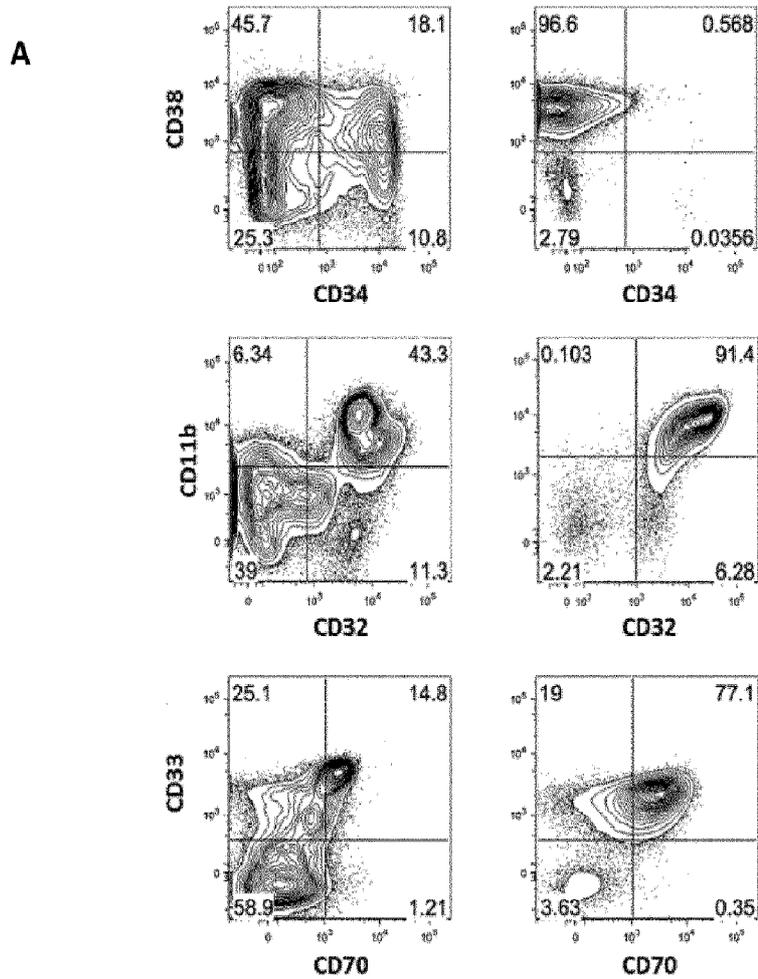


ФИГ.6В



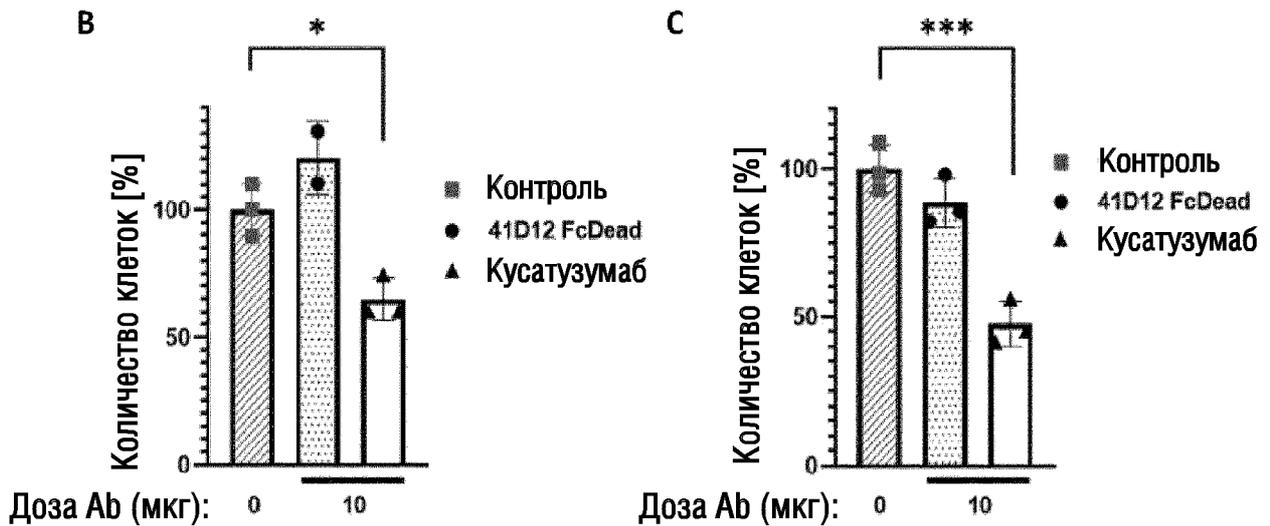
ФИГ.7А

AML смешанного фенотипа (чувствительный к Ven/Aza) Моноцитарный AML (устойчивый к Ven/Aza)

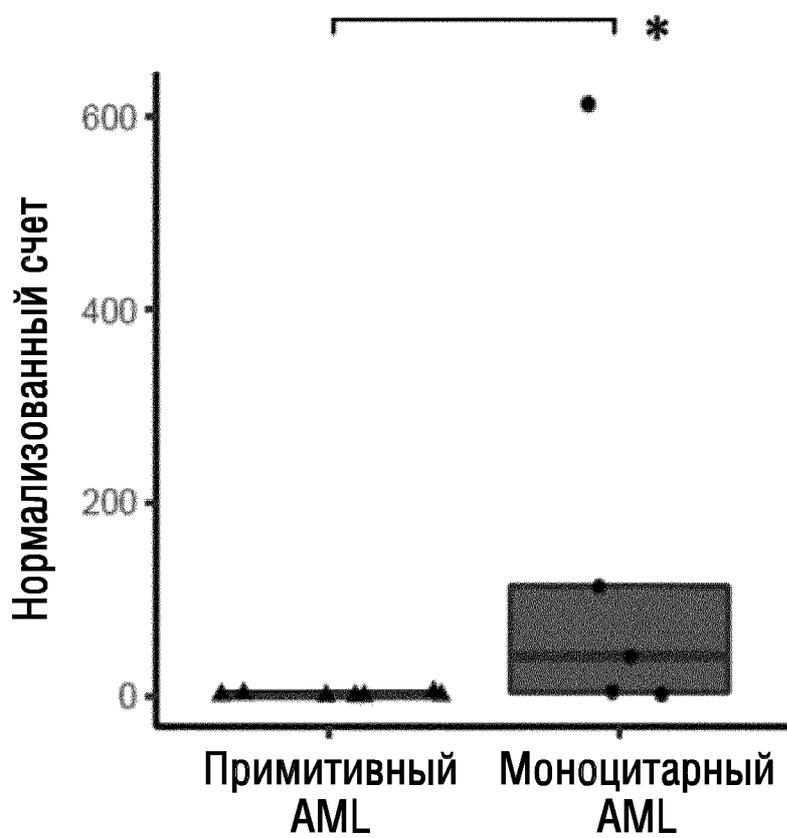


ФИГ.7В

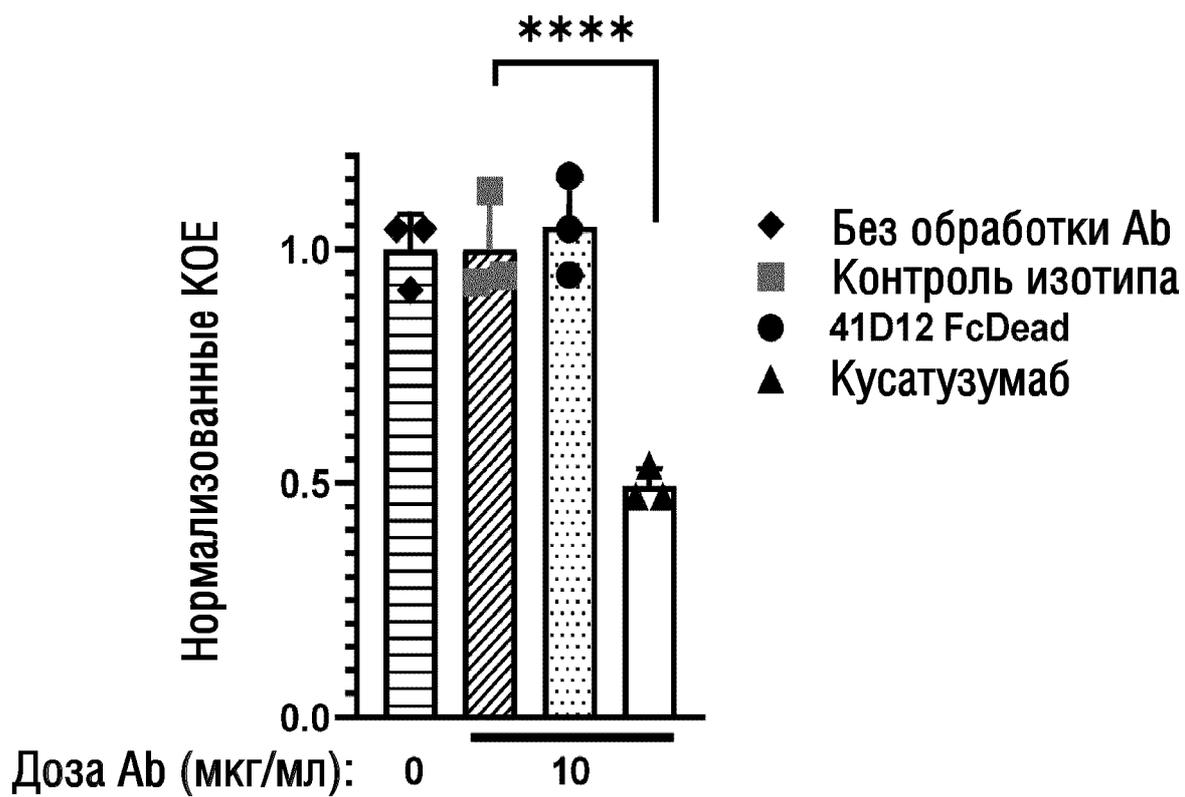
ФИГ.7С



ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10

