# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2022.12.30
- (22) Дата подачи заявки 2020.12.28

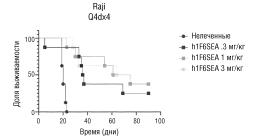
(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)

#### (54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА НЕФУКОЗИЛИРОВАННЫМИ АНТИ-CD70 АНТИТЕЛАМИ

- (31) 62/954,904; 63/011,906
- (32) 2019.12.30; 2020.04.17
- (33) US
- (86) PCT/US2020/067173
- (87) WO 2021/138264 2021.07.08
- (71) Заявитель: СИДЖЕН ИНК. (US)

- (72) Изобретатель:
  - Гардай Шира, Хо Феникс (US)
- (74) Представитель:Медведев В.Н. (RU)

(57) Описание относится к способам лечения рака, такого как миелоидные злокачественные новообразования, включая миелодиспластический синдром (MDS) и острый миелоидный лейкоз (AML), с помощью нефукозилированных анти-CD70 антител.



#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574904EA/032

# СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА НЕФУКОЗИЛИРОВАННЫМИ АНТИ-CD70 АНТИТЕЛАМИ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/954,904, поданной 30 декабря 2019, и предварительной заявки США № 63/011,906, поданной 17 апреля 2020, содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

# ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

Содержание следующей подачи в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 761682003140SEQLIST.TXT, дата записи: 9 декабря 2020, размер: 13 КБ).

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам лечения рака, такого как миелоидные злокачественные новообразования, включая миелодиспластический синдром (MDS) и острый миелоидный лейкоз (AML), с помощью нефукозилированных анти-CD70 антител.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

СD70 является членом семейства фактора некроза опухоли (TNF), связанных с клеточной мембраной и секретируемых молекул, которые экспрессируются различными нормальными и злокачественными типами клеток. Первичная аминокислотная (AA) последовательность CD70 предсказывает трансмембранный белок типа II с его карбоксильным концом, экспонированным снаружи клеток, и его амино концом, обнаруженным на цитозольной стороне мембраны плазмы (Bowman et al., 1994, J. Immunol. 152:1756-61; Goodwin et al., 1993, Cell 73:447-56). CD70 человека состоит из 20 AA цитоплазматического домена, 18 AA трансмембранного домена и 155 AA экстрацитоплазматического домена с двумя потенциальными N-связанными сайтами гликозилирования (Bowman et al., supra; Goodwin et al., выше). Специфическая иммунопреципитация меченых радиоизотопом клеток, экспрессирующих CD70, анти-CD70 антителами дает полипептиды 29 и 50 кДа (Goodwin et al., supra; Hintzen et al., 1994, J. Immunol. 152:1762-73). На основании его гомологии с TNF-альфа и TNF-бета, особенно в структурных цепях C, D, H и 1, для CD70 спрогнозирована трехмерная структура (Petsch et al., 1995, Mol. Immunol. 32:761-72).

Первоначальные иммуногистологические исследования показали, что CD70 экспрессируется на В-клетках зародышевого центра и редких Т-клетках в миндалинах, коже и кишечнике (Hintzen et al., 1994, Int. Immunol. 6:477-80). Впоследствии сообщалось, что CD70 экспрессируется на клеточной поверхности недавно активированных антигеном

Т- и В-лимфоцитов, и его экспрессия ослабевает после устранения антигенной стимуляции (Lens et al, 1996, Eur. J. Immunol. 26:2964-71; Lens et al.,1997, Immunology 90:38-45). В лимфоидной системе активированы естественные киллеры (Orengo et al., 1997, Clin. Exp. Immunol. 107:608-13) и зрелые периферические дендритные клетки мыши (Akiba et al., 2000, J. Exp. Med. 191:375-80) также экспрессируют CD70. В нелимфоидных линиях, CD70 был обнаружен на мозговых эпителиальных клетках тимуса (Hintzen et al., 1994, выше; Hishima et al., 2000, Am. J. Surg Pathol. 24:742-46).

СD70 не экспрессируется на нормальных не гемопоэтических клетках. Экспрессия СD70 в основном ограничена недавно антиген-активированными Т- и В-клетками в физиологических условиях, и его экспрессия подавляется, когда антигенная стимуляция прекращается. Данные, полученные на животных моделях, свидетельствуют о том, что СD70 может способствовать развитию иммунологических нарушений, таких как, например, ревматоидный артрит (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104), псориатический артрит (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104) и волчанка (Oelke et al., 2004, Arthritis Rheum. 50:1850-60). Помимо своей потенциальной роли в воспалительных ответах, CD70 также экспрессируется на множестве трансформированных клеток, включая В-клетки лимфомы, клетки Ходжкина и Рида-Штернберга, злокачественные клетки нервного происхождения и ряд карцином. Исследования показали, что стволовые клетки пациентов с острым миелоидным лейкозом (AML) и миелодиспластической болезнью (MDS) экспрессируют как CD70, так и его рецептор CD27. Взаимодействия между этой парой лиганд-рецептор могут способствовать выживанию и пролиферации бластных клеток лейкоза.

Моноклональные антитела, продуцируемые в клетках-хозяевах млекопитающих, могут иметь различные посттрансляционные модификации, включая гликозилирование. Моноклональные антитела, такие как IgG1, имеют N-связанный сайт гликозилирования на аспарагине 297 (Asn297) каждой тяжелой цепи (два на интактное антитело). Гликаны, присоединенные к Asn297 на антителах, как правило, представляют собой сложные биантеннарные структуры с очень низким содержанием или без N-ацетилглюкозамина (GlcNAc в точках ветвления) с низким количеством концевой сиаловой кислоты и переменным количеством галактозы. Гликаны также обычно имеют высокие уровни корового фукозилирования. Было показано, что уменьшение корового фукозилирования в антителах изменяет эффекторные функции Fc, в частности, связывание Fcгаммарецептора и активность ADCC. Это наблюдение вызвало интерес к сконструированным клеточным линиям, поскольку они продуцируют антитела с пониженным коровым фукозилированием.

Способы конструирования клеточных линий для уменьшения корового фукозилирования включают нокауты генов, нокины генов и РНК интерференцию (РНКи). При нокаутах гена, ген, кодирующий FUT8 (фермент альфа-1,6-фукозилтрансферазы), инактивируется. FUT8 катализирует перенос фукозильного остатка из GDP-фукозы в положение 6 Asn-связанного (N-связанного) GlcNac N-гликана. Сообщается, что FUT8

является единственным ферментом, ответственным за добавление фукозы к N-связанному биантеннарному углеводу в Asn297. Генные нокины добавляют гены, кодирующие ферменты, такие как GNTIII или альфа-маннозидаза Гольджи II. Повышение уровня таких ферментов в клетках отклоняет моноклональные антитела от пути фукозилирования (что приводит к снижению корового фукозилирования) и имеет повышенное количество N-ацетилглюкозаминов в точках ветвления. РНКи обычно также таргетирует экспрессию гена FUT8, что приводит к снижению уровня транскриптов мРНК или полному нокауту экспрессии гена.

Альтернативы конструированию клеточных линий включают использование ингибиторов, которые действуют низкомолекулярных ферменты пути на гликозилирования. Ингибиторы, такие как катаноспермин, действуют на ранней стадии пути гликозилирования, продуцируя антитела с незрелыми гликанами (например, с маннозы) и низким уровнем фукозилирования. уровнем продуцированные такими способами, обычно не имеют сложной структуры N-гликана, ассоциированной со зрелыми антителами. Низкомолекулярные аналоги фукозы также можно использовать для создания рекомбинантных антител, которые имеют сложные Nсвязанные гликаны, но имеют пониженное коровое фукозилирование.

Существует потребность в анти-CD70 антителах, таких как анти-CD70 антитела со сниженным которым фукозилированием, которые могут оказывать клинически полезное цитотоксическое, цитостатическое или иммуномодулирующее действие на клетки, экспрессирующие CD70, в частности, не оказывая нежелательных эффектов на клетки, не экспрессирующие CD70. Такие соединения могли бы быть полезными терапевтическими агентами против рака, экспрессирующего CD70.

Миелоидные злокачественные новообразования включают острый миелоидный лейкоз (AML), миелопролиферативные нарушения (MPDS), миелодиспластический синдром (MDS) и миелодиспластические/миелопролиферативные синдромы, все которые являются клональными стволовыми клетками (HSC) или злокачественными нарушениями предшественников (TIU et al., Leukemia, vol. 21(8), p: 1648-57, 2007).

MDS включает несколько подтипов, в том числе MDS с однолинейной дисплазией, MDS с кольцевыми сидеробластами, MDS с мультилинейной дисплазией, MDS с избытком бластов, MDS с выделенной del(5q) и MDS, не поддающийся классификации (ARBER et al., Blood, vol. 127, p: 2391-405, 2016). MDS характеризуется неэффективным гемопоэзом в одном или нескольких линиях костного мозга. Ранний MDS в основном демонстрирует чрезмерный апоптоз и дисплазию гемопоэтических клеток (CLAESSENS et al., Blood, vol. 99, p: 1594-601, 2002; CLASESSENS et al., Blood, vol. 105, p: 4035-42, 2005). Примерно у трети пациентов с MDS, такой неэффективный гемопоэз предшествует прогрессированию вторичного AML (sAML). Хотя были идентифицированы некоторые молекулярные явления связаны с конкретными подтипами MDS (ELBERT et al., Nature, vol. 451(7176), p: 335-9, 2008) или трансформацией заболевания (BRAUN et al., Blood, vol. 107(3), p: 1156-65, 2006), лежащие в их основе молекулярные дефекты до сих пор плохо

изучены. В настоящее время нет биологических маркеров, кроме морфологических признаков, для ранней диагностики и прогноза.

Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой злокачественную опухоль миелоидной линии лейкоцитов. Это образование застоя крови обычно представляет собой заболевание крови и костного мозга, приводящее к летальному исходу в течение нескольких недель или месяцев, если его не лечить. В Соединенных Штатах насчитывается 30000 случаев AML и 47000 случаев AML, по оценкам, в Европейском союзе (данные о распространенности за 2010 год подтверждены Mattson-Jack, 2010). AML является наиболее распространенной формой острого лейкоза у взрослых (примерно 90%), на него приходится примерно 33% новых случаев лейкоза. Средний возраст пациентов с диагнозом AML составляет 67 лет. В Соединенных Штатах, на AML приходится примерно 1,2% смертей от рака.

АМL вызывает неспецифические симптомы, такие как потеря веса, утомляемость, лихорадка и ночная потливость. АМL диагностируется с помощью анализов крови, костного мозга и лабораторных тестов для определения подтипов АМL и принятия решения о лечении.

Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включая патентные заявки, патентные публикации и научную литературу, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе предложен способ лечения рака, экспрессирующего СD70, у субъекта, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества нефукозилированного анти-СD70 антитела, где способ приводит к истощению раковых клеток у субъекта, где способ не приводит к истощению СD70+ Т-регуляторных клеток (CD70+ Treg) у субъекта, где анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70-антитела определены схемой нумерации Kabat, и Fc домен, и где рак выбран из группы, состоящей из миелодиспластического синдрома (MDS) и острого миелоидного лейкоза (AML). В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело имеет вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления, домен Fc представляет собой эффекторный домен антитела, опосредующий одну или более из антителозависимой

клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и комплементзависимой клеточной цитотоксичности (CDC). В некоторых вариантах Fc домен представляет собой эффекторный домен опосредующий АДСС. В некоторых вариантах осуществления, Fc домен представляет собой Fc домен человека. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело представляет собой ворсетузумаб. В некоторых вариантах осуществления, антитело конъюгировано с терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический иммуномодулирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления, химиотерапевтический агент представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ) или монометилауристатин F (ММАF). В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение популяции анти-CD70 антител, где каждое антитело в популяции анти-CD70 антител содержит вариабельную область тяжелой содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определены по схеме нумерации Kabat, и Fc домен, где, по меньшей мере, 50% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 70% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой MDS. В некоторых вариантах осуществления, MDS представляет собой рецидивирующий или не поддающийся лечению MDS. В некоторых вариантах осуществления, субъект не достиг успеха после предшествующей терапии MDS гипометилирующим агентом (HMA). В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой АМL. В некоторых осуществления, АМL представляет собой рецидивирующий или не поддающийся лечению АМL. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил 2 схемы лечения для лечения АМL. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил 3 схемы лечения для лечения АМL. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, примерно 0,1%, по меньшей мере, примерно 1%, по меньшей мере, примерно 2%, по меньшей мере, примерно 3%, по меньшей мере, примерно 4%, по меньшей мере, примерно 5%, по меньшей мере, примерно 6%, по меньшей мере, примерно 7%, по меньшей мере, примерно 8%, по меньшей мере, примерно 9%, по меньшей мере, примерно 10%, по меньшей мере, примерно 15%, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 25%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 35%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 45%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70% или по меньшей мере, примерно 80% раковых клеток экспрессируют СD70. В некоторых вариантах осуществления, введение субъекту нефукозилированного анти-CD70 антитела приводит к истощению раковых клеток, по меньшей мере, примерно на 5%, по меньшей мере, примерно на 6%, по меньшей мере, примерно на 7%, по меньшей мере, примерно на 8%, по меньшей мере, примерно на 9%, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 15%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 35%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 45%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или примерно на 100% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением анти-CD70 субъекту. нефукозилированного антитела В некоторых осуществления, введение субъекту нефукозилированного анти-CD70 антитела приводит к истощению CD70+ Treg не более чем на примерно 20%, примерно 10%, примерно 9%, примерно 8%, примерно 7%, примерно 6%, примерно 5%, примерно 4%, примерно 3%, примерно 2%, примерно 1% или примерно 0,1% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту нефукозилированного анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, один или более терапевтических эффектов у субъекта улучшаются после введения нефукозилированного анти-СD70 антитела по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления, один или более терапевтических эффектов выбраны из группы, состоящей из: объективной частоты ответа, продолжительности ответа, времени до ответа, выживаемости прогрессирования и общей выживаемости. В некоторых вариантах осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 25%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 35%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 45%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70% или, по меньшей мере, примерно 80%. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования заболевания, составляющую, по меньшей мере, примерно 1 месяц, по меньшей мере, примерно 2 месяца, по меньшей мере, примерно 3 месяца, по меньшей мере, примерно 4 месяца, по меньшей мере, примерно 5 месяцев, по меньшей мере, примерно 6 месяцев, по меньшей мере, примерно 7 месяцев, по меньшей мере, примерно 8 месяцев, по меньшей мере, примерно 9 месяцев, по меньшей мере, примерно 10 месяцев, по меньшей мере, примерно 11 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере, примерно два года, по меньшей мере, примерно три года, по меньшей мере, примерно четыре года или, по меньшей мере, примерно пять лет после введения нефукозилированного анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, общая выживаемость субъекта составляет, по меньшей мере, примерно 1 месяц, по меньшей мере, примерно 2 месяца, по меньшей мере, примерно 3 месяца, по меньшей мере, примерно 4 месяца, по меньшей мере, примерно 5 месяцев, по меньшей мере, примерно 6

месяцев, по меньшей мере, примерно 7 месяцев, по меньшей мере, примерно 8 месяцев, по меньшей мере, примерно 9 месяцев, по меньшей мере, примерно 10 месяцев, по меньшей мере, примерно 11 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере, примерно два года, по меньшей мере, примерно три года, по меньшей мере, примерно четыре года или, по меньшей мере, примерно пять лет после введения нефукозилированного анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, длительность ответа на анти-СD70 антитело составляет, по меньшей мере, примерно 1 месяц, по меньшей мере, примерно 2 месяца, по меньшей мере, примерно 3 месяца, по меньшей мере, примерно 4 месяца, по меньшей мере, примерно 5 месяцев, по меньшей мере, примерно 6 месяцев, не менее примерно 7 месяцев, по меньшей мере, примерно 8 месяцев, по меньшей мере, примерно 9 месяцев, по меньшей мере, примерно 10 месяцев, по меньшей мере, примерно 11 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере, примерно два года, по меньшей мере, примерно три года, по меньшей мере, примерно четыре года или, по меньшей мере, примерно пять лет после введения нефукозилированного анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, способ введения анти-CD70 антитела является внутривенным. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с азацитидином. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело вводят в комбинации с венетоклаксом. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с азацитидином и венетоклаксом. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с фторхинолоном.

В настоящем документе также предложена фармацевтическая композиция для лечения рака, экспрессирующего CD70, где композиция содержит нефукозилированное анти-CD70 антитело, где анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определены схемой нумерации Kabat, и Fc домен, и, по меньшей мере, один фармацевтически совместимый ингредиент, где композиция предназначена для использования в способе по любому из вариантов осуществления настоящего документа.

В настоящем документе также предложен набор, содержащий нефукозилированное анти-CD70 антитело, где анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 2, где CDR анти-CD70 антитела определены схемой нумерации Kabat, и Fc домен, а также инструкции по применению анти-CD70 антитела в способе по любому из вариантов осуществления настоящего документа.

Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, могут быть объединены для получения других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие

аспекты изобретения станут очевидны специалисту в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления изобретения дополнительно описаны в подробном описании, которое следует.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Файл патента или заявки содержит, по меньшей мере, один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветным(и) чертежом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

На ФИГ. 1 представлена серия сенсограмм связывания SGN-70 (фукозилированного h1F6) и SEA-CD70 (нефукозилированного h1F6) с различными рецепторами Fcy. SGN-70 помечен как h1F6 WT, и SEA-CD70 помечен как h1F6 SEA на ФИГ. 1. Биослойную интерферометрию (BLI) используют для оценки кинетики связывания и аффинности SGN-70 и SEA-CD70 к FcyR I, IIa, IIIa, IIIb и FcRN.

На ФИГ. 2A-2B представлена серия графиков, оценивающих связывание SGN-70 и SEA-CD70 (обозначенных как SEA-70 на ФИГ. 2A-2B) с высокоаффинным рецептором FcγRIIIа человека (158V) (ФИГ. 2A) или FcγRIIIa рецептором яванского макака (ФИГ. 2B) с использованием проточной цитометрии.

На ФИГ. 3A-3B представлена серия графиков, показывающих ADCC активность SGN-70 и SEA-CD70 в двух клеточных линиях CD70+ AML, MOLM-13 (ФИГ. 3A) и NOMO-1 (ФИГ. 3B).

На ФИГ. 4A-4D представлена серия графиков, оценивающих воздействие SGN-70 (обозначенного как SGN-CD70 на ФИГ. 4A-4D) и SEA-CD70 на CD70+ Treg и CD8 Т-клетки в клетках от доноров, гомозиготных по высокоаффинному FcγRIIIa рецептору (V/V 158) или гомозиготных по низкоаффинному FcγRIIIa рецептору (F/F 158).

На ФИГ. 4E-4H представлена серия графиков, оценивающих влияние фукозилированных (WT Клон 13 IgG1) или нефукозилированных (SEA Клон 13 IgG1) анти-ТІGІТ антител на Treg и CD8 Т-клетки в клетках от доноров, гомозиготных по высокоаффинному  $Fc\gamma RIII$ а рецептору (V/V 158) или гомозиготных по низкоаффинному  $Fc\gamma RIII$ а рецептору (F/F 158).

На ФИГ. 5 представлен график Каплана-Мейера результатов оценки влияния лечения SEA-CD70 на долю выживаемости животных с течением времени в модели лимфомы Буркитта Raji NHL. SEA-CD70 помечен как h1F6SEA.

На ФИГ. 6 представлен график, показывающий противоопухолевую эффективность h1F6SEA, h1F6G1V1, h00SEA и азацитидина в модели острого миелоидного лейкоза MV-411. SEA-CD70 помечен как h1F6SEA. Антитело, содержащее такие же CDR, что и SEA-CD70, но содержащее инактивирующие мутации остова, помечено как h1F6G1V1. Афукозилированное изотипическое контрольное антитело IgG1 человека помечено как h00SEA.

На ФИГ. 7A-7D представлена серия лепестковых диаграмм, оценивающих противоопухолевую эффективность h1F6SEA, h00SEA (афукозилированного антитела,

контролирующего изотип IgG1 человека), h1F6G1V1 (антитела, содержащего те же CDR, что и SEA-CD70, но содержащего инактивирующие мутации остова) и азацитидина в модели острого миелоидного лейкоза MV-411. Объемы опухолей для отдельных животных наносят на график для каждого условия лечения и накладывают на средний объем опухоли в нелеченной группе.

На ФИГ. 8A-8В представлена серия графиков, оценивающих активность ADCP, опосредованную SEA-CD70 и SGN-CD70, в отношении клеточных линий AML. Показанные данные представляют долю положительных макрофагов по сравнению с фоновым контролем.

На ФИГ. 9A-9B представлена серия графиков, оценивающих активность CDC, опосредованную SEA-CD70 и SGN-CD70 CDC в отношении клеточных линий AML.

На ФИГ. 10 представлен график, оценивающий влияние SEA-CD70 в комбинации с азацитидином (VIDAZA®) на рост опухоли в мышиной модели ксенотрансплантата AML MV411. Средний объем опухоли ( $\pm$  COC) указан для каждой группы лечения. Для каждой группы лечения, данные наносят на график до тех пор, пока первое животное в каждой группе не будет умерщвлено из-за достижения размера опухоли >1000 мм $^3$ .

На ФИГ. 11А-В представлена серия графиков, оценивающих влияние SEA-CD70 в комбинации с азацитидином (VIDAZA®), венетоклаксом (VENCLEXTA®; ABT-199) или обоими (азацитидином+венетоклаксом) на рост опухоли в мышиной модели ксенотрансплантата AML MV411. ФИГ. 11А: указан средний объем опухоли ( $\pm$  COC) для каждой группы лечения. Для каждой группы лечения, данные наносятся на график до тех пор, пока первое животное в каждой группе не будет умерщвлено из-за достижения размера опухоли >1000 мм³. ФИГ. 11В: Кривые роста отдельных животных для контроля, комбинации азацитидин+венетоклакс и комбинации SEA-CD70+азацитидин+венетоклакс (тройная комбинация).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

#### **I.** Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, относящееся к описанным способам и композициям. Когда в настоящем описании используются торговые наименования, заявители намерены независимо включать состав продукта с торговой маркой, непатентованное лекарственное средство и активный(ые) фармацевтический(ие) ингредиент(ы) продукта с торговой маркой. Используемые в настоящем документе следующие термины и фразы имеют приписанные им значения, если не указано иное.

Термин «и/или», используемый в настоящем документе, следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или без другого. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В» в настоящем документе, подразумевает включение «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В

и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: A, B и C; A, B или C; A или C; A или B; B или C; A и B; B и C; A (отдельно); В (отдельно); и C (отдельно).

Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, включают «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу из» аспектов и вариантов осуществления.

Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой Système International de Unites (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Представленные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов описания, которые могут быть получены путем ссылки на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание в целом.

Термины «СD70 связывающий агент» и «анти-CD70 связывающий агент», используемые в настоящем документе, означают анти-CD70 антитело, производное или фрагмент анти-CD70 антитела или другой агент, который связывается с CD70 и содержит, по меньшей мере, одну CDR или вариабельную область CD70 связывающего антитела или его производного.

Термин «специфически связывает» означает, что связывающий агент будет реагировать высокоселективным образом с соответствующим ему антигеном, и не с множеством других антигенов (*например*, не-CD70 молекулами).

Используемый в настоящем документе термин «функциональный» в контексте CD70 связывающего агента указывает на то, что связывающий агент способен связываться с CD70.

Используемые «ингибировать» документе термины В настоящем или «ингибирование» измеримую означают снижение на величину или полное предотвращение.

Термин «истощение» в контексте действия CD70 связывающего агента на CD70экспрессирующие клетки относится к уменьшению числа или элиминации CD70экспрессирующих клеток.

«Интактные антитела» и «интактные иммуноглобулины» определены в настоящем документе как гетеротетрамерные гликопротеины, обычно примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью дисульфидной связью с образованием гетеродимера. Гетеротетрамер образован ковалентной дисульфидной связью между двумя идентичными тяжелыми цепями таких гетеродимеров. Хотя легкая и тяжелая цепи связаны друг с другом дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями зависит от изотипа иммуноглобулина (Ig). Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на амино-конце вариабельный домен (V<sub>H</sub>), за которым следуют три или четыре константных домена (C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3 и/или C<sub>H</sub>4),

а также шарнирную (J) область между  $C_H1$  и  $C_H2$ . Каждая легкая цепь имеет два домена, амино-концевой вариабельный домен ( $V_L$ ) и карбокси-концевой константный домен ( $C_L$ ).  $V_L$  домен нековалентно связан с  $V_H$  доменом, тогда как  $C_L$  домен обычно ковалентно связан с  $C_H1$  доменом через дисульфидную связь. Считают, что определенные аминокислотные остатки образуют интерфейс между вариабельными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663).

Термин «гипервариабельная» относится к определенным последовательностям в пределах вариабельных доменов, которые сильно различаются по последовательности среди антител и содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретной антигенной детерминанты. Гипервариабельность, как в вариабельных доменах легкой цепи, так и в вариабельных доменах тяжелой цепи, сосредоточена в трех сегментах, известных как определяющие комплементарность области (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определяются сравнением последовательностей в Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, M.D., тогда как HVL структурно определяются в соответствии с трехмерной структурой вариабельного домена, как описано Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917. В тех случаях, когда эти два способа приводят к несколько разным идентификациям CDR, предпочтение отдается структурному определению. Как определено Kabat (see Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, M.D., 1991), CDR- L1 расположен примерно в остатках 24-34, CDR-L2 примерно в остатках 50-56 и CDR-L3 примерно в остатках и 89-97 в вариабельном домене легкой цепи, и примерно в 31-35 в CDR-H1, примерно в 50-65 в CDR-H2 и примерно в 95-102 в CDR-H3 в вариабельном домене тяжелой цепи.

Три CDR в каждой из тяжелой и легкой цепей разделены каркасными областями (FR), которые содержат последовательности, которые имеют тенденцию быть менее вариабельными. От амино-конца до карбокси-конца вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи, FR и CDR располагаются в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Конфигурация FR, состоящая в основном из β-листов, приближает CDR в каждой из цепей друг к другу, а также к CDR из другой цепи. Полученная конформация вносит вклад в антигенсвязывающий сайт (*см.* Kabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669), хотя не все остатки CDR обязательно непосредственно участвуют в связывании антигена.

FR остатки и константные домены Ig обычно не участвуют непосредственно в связывании антигена, но могут способствовать связыванию антигена или опосредовать эффекторную функцию антитела. Некоторые FR остатки могут оказывать значительное влияние на связывание антигена, по меньшей мере, тремя способами: путем нековалентного связывания непосредственно с эпитопом, путем взаимодействия с одним или несколькими остатками CDR и путем воздействия на интерфейс между тяжелой и

легкой цепями. Константные домены опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и/или антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP).

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных относятся к одному из двух четко различающихся классов, каппа  $(\kappa)$  и лямбда  $(\lambda)$ , на основе аминокислотной последовательности Для константного домена. сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относятся к одному из пяти основных классов в соответствии с последовательностью константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA далее делятся на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

Термины «антитело», «анти-CD70 антитело», «гуманизированное анти-CD70 антитело» и «вариант гуманизированного анти-CD70 антитела» используются в настоящем документе в самом широком смысле и конкретно охватывают полноразмерные и нативные антитела, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, такие как вариабельные домены и другие части антител, которые проявляют желаемую биологическую активность, например связывание с CD70.

Термин «моноклональное антитело» (mAb) относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител; то есть, отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одной антигенной детерминанты, также называемой эпитопом. Модификатор «моноклональный» указывает на по существу однородную популяцию антител, направленных на идентичный эпитоп, и не должен толковаться как требующий получения антител каким-либо конкретным способом. Моноклональные антитела могут быть получены любым способом или методологией, известными в данной области техники; например, способом гибридомы, впервые описанным Köhler et al., 1975, Nature 256:495, или способами рекомбинантной ДНК, известными в данной области техники (*см.*, *например*, патент США № 4,816,567). В другом примере, моноклональные антитела также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием способов, описанных в Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628, и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597.

Напротив, антитела в препарате поликлональных антител обычно представляют собой гетерогенную популяцию изотипов и/или классов иммуноглобулинов, и также проявляют различную эпитопную специфичность.

Термин «химерное» антитело, используемый в настоящем документе, представляет

собой тип моноклонального антитела, в котором часть или полная аминокислотная последовательность в одном или нескольких участках или доменах тяжелой и/или легкой вариантом соответствующей цепи гомологична, или является последовательности в моноклональном антителе другого вида, или принадлежит к другому классу или изотипу иммуноглобулина, или из консенсусной последовательности. Химерные антитела включают фрагменты таких антител при условии, что фрагмент антитела проявляет желаемую биологическую активность исходного антитела, например связывание с тем же эпитопом (см., например, патент США № 4,816,567; и Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad Sci. USA 81:6851-6855). Способы получения химерных антител известны в данной области техники. (См., например, Morrison, 1985. Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; патенты США № 5,807,715; 4,816,567 и 4,816,397.)

Термины «фрагмент антитела», «фрагмент анти-CD70 антитела», «фрагмент гуманизированного анти-CD70 антитела» и «вариант фрагмента гуманизированного анти-CD70 антитела» относятся к части полноразмерного анти-CD70 антитела, в которой вариабельная область или функциональная способность сохраняется, например, специфическое связывание эпитопа CD70. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, фрагмент Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, диатело, триатитело, тетратело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, и другие мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. (*См.* Holliger and Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.)

Фрагмент «одноцепочечного Fv» или «scFv» антитела представляет собой вариант одноцепочечного Fv, содержащий домены  $V_H$  и  $V_L$  антитела, в котором домены присутствуют в одной полипептидной цепи, и который способен распознавать и связывать антиген. Полипептид scFv необязательно содержит полипептидный линкер, расположенный между доменами  $V_H$  и  $V_L$ , который позволяет scFv образовывать желаемую трехмерную структуру для связывания антигена (*см.*, *например*, Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315).

Термин «диатело» относится к малому фрагменту антитела, имеющему два антигенсвязывающих сайта. Каждый фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи  $(V_H)$ , соединенный с вариабельным доменом легкой цепи  $(V_L)$  с образованием полипептида  $V_{H^-}V_L$  или  $V_{L^-}V_H$ . При использовании линкера, который слишком короткий, чтобы позволить спаривание между двумя доменами в одной цепи, связанные домены  $V_{H^-}V_L$  вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи, создавая два антигенсвязывающих сайта. Диатела описаны более полно, например, в EP 404 097; WO 93/11161; и Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Термин «линейное антитело» относится к антителам, которые содержат пару тандемных Fd сегментов ( $V_H$  - $C_H$ 1-  $V_H$  - $C_H$ 1), образующих пару антигенсвязывающих областей. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими,

как описано в Zapata et al., 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

«Гуманизированное антитело» относится варианту аминокислотной К последовательности иммуноглобулина или его фрагменту, который способен связываться с заданным антигеном и который содержит полипептидную цепь вариабельной области, каркасные области, существу аминокислотную имеющую имеющие по последовательность иммуноглобулина человека и CDR(s) имеющие по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина нечеловеческого происхождения.

Как правило, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения называются в настоящем документе «импортными» остатками, которые обычно берутся из «импортного» домена антитела, в частности, вариабельного домена. Импортный остаток, последовательность или антитело обладают желаемой аффинностью и/или специфичностью или другой желаемой биологической активностью антитела, как обсуждается в настоящем документе.

Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере, одного, и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют таковым иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все каркасные области являются таковыми из последовательности иммуноглобулина человека, такими как, например, консенсусная последовательность или последовательность зародышевой линии. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать, по меньшей мере, часть Fc домена иммуноглобулина, как правило, такового из иммуноглобулина человека. Например, антитело может содержать как легкую цепь, так и, по меньшей мере, вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать C<sub>H</sub>1, шарнир (J), C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3 и/или C<sub>H</sub>4 области тяжелой цепи, по необходимости.

Гуманизированное антитело может быть выбрано ИЗ любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG<sub>1</sub>,  $IgG_2$ ,  $IgG_3$  и  $IgG_4$ . Константная область или домен может включать, например, константный домен, фиксирующий комплемент, где желательно, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитотоксическую активность (например,  $IgG_1$ ). Если такая цитотоксическая активность нежелательна, константный домен может относиться к другому классу (например,  $IgG_2$ ). Гуманизированное антитело может содержать последовательности из более чем одного класса или изотипа, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в пределах обычной компетенции в данной области техники.

FR и CDR области гуманизированного антитела не обязательно должны точно соответствовать исходным последовательностям, *например*, импортная CDR или консенсусная FR могут быть изменены путем замены, вставки или делеции, по меньшей мере, одного остатка, так что остаток CDR или FR в этом сайте не соответствует ни консенсусу, ни импортному антителу. Такие мутации обычно не будут обширными.

Обычно, по меньшей мере, 75% остатков гуманизированного антитела будут соответствовать остаткам родительских последовательностей FR и CDR, чаще, по меньшей мере, 90%, и наиболее часто, более 95%.

Термин «эффекторная(ые) функция(и) антитела», используемый в настоящем документе, относится к функции, вносимой Fc доменом(ами) Ig. Такими функциями могут быть, например, антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз или комплементзависимая цитотоксичность. Такая функция может осуществляться, например, путем связывания эффекторного(ых) Гс домена(ов) с Гс рецептором на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью, или путем связывания эффекторного(ых) Гс домена(ов) с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредуемый(ые) Гс-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит к ингибированию и/или истощению клеток-мишеней СD70. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, Fc области антител могут рекрутировать клетки, экспрессирующие Fc рецептор (FcR), и сопоставлять их с клетками-мишенями, покрытыми антителами. Клетки, экспрессирующие поверхностный FcR для IgG, включая FcyRIII (CD16), FcyRII (CD32) и FcyRIII (CD64), могут действовать как эффекторные клетки для разрушения клеток, покрытых IgG. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, естественные киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы. Взаимодействие FcyR с IgG активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). ADCC опосредуется CD16<sup>+</sup> эффекторными клетками посредством секреции мембранных порообразующих белков и протеаз, в то время как фагоцитоз опосредуется CD32<sup>+</sup> и CD64<sup>+</sup> эффекторными клетками (см. Fundamental Immunology, 4<sup>th</sup> ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Chapters 3, 17 and 30; Uchida et al., 2004, J. Exp. Med. 199:1659-69; Akewanlop et al., 2001, Cancer Res. 61:4061-65; Watanabe et al., 1999, Breast Cancer Res. Treat. 53:199-207). В дополнение к ADCC и ADCP, Fc области связанных с клеткой антител также могут активировать классический ПУТЬ комплемента, вызывая комплементзависимую цитотоксичность (CDC). C1q системы комплемента связывается с Fc областями антител, когда они образуют комплексы с антигенами. Связывание С1q с антителами, связанными с клеткой, может инициировать каскад событий, включающий протеолитическую активацию C4 и C2 с образованием C3 конвертазы. Расщепление C3 до C3b C3 конвертазой позволяет активировать терминальные компоненты комплемента, включая С5b, С6, С7, С8 и С9. В совокупности, эти белки образуют поры мембраноатакующего комплекса на клетках, покрытых антителами. Эти поры нарушают целостность клеточной мембраны, убивая клетку-мишень (см. Immunobiology, 6th ed., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, Chapter 2).

Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность» или ADCC представляет собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также называемыми эффекторными клетками). Такие эффекторные клетки

включают естественные киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки прикрепляются к эффекторным Fc доменам Ig, связанным с клетками-мишенями через их антигенсвязывающие сайты. Гибель клетки-мишени, покрытой антителами, происходит в результате активности эффекторных клеток.

Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» или ADCP относится к процессу, при котором покрытые антителами клетки полностью или частично интернализуются фагоцитирующими иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с Fc эффекторным(ыми) доменом(ами) Ig.

Термин «комплементзависимая цитотоксичность» или CDC относится к механизму индукции гибели клеток, при котором Fc эффекторный(ые) домен(ы) антитела, связанного с мишенью, активирует ряд ферментативных реакций, завершающихся образованием отверстий в мембране клетки-мишени. Как правило, комплексы антиген-антитело, такие как таковые на покрытых антителами клетках-мишенях, связываются и активируют компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к отложению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что способствует АDCC путем связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

Применяемая в настоящем документе «иммунная клетка» относится к клетке гемопоэтической линии, участвующей в регуляции иммунного ответа. В типовых вариантах осуществления, иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, В-лимфоцит, NK-клетку, моноцит/макрофаг или дендритную клетку.

Применяемая в настоящем документе «эффекторная клетка» относится к клетке, которая экспрессирует поверхностный рецептор для Fc домена иммуноглобулина (FcR). Например, клетки, которые экспрессируют поверхностный FcR для IgG, включая FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD64), могут действовать как эффекторные клетки. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, естественные киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы.

«Терапевтический агент» представляет собой агент, который оказывает цитотоксическое, цитостатическое и/или иммуномодулирующее действие на раковые клетки, активированные иммунные клетки или другую популяцию клеток-мишеней. Примеры терапевтических агентов включают цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты, цитостатические агенты и иммуномодулирующие агенты.

«Цитотоксический эффект» относится к истощению, элиминации и/или уничтожению клетки-мишени. «Цитотоксический агент» относится к агенту, который оказывает цитотоксическое действие на клетку. Предполагается, что этот термин включает радиоактивные изотопы (такие как  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  и  $Re^{186}$ ), химиотерапевтические агенты и токсины, такие как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, и их фрагменты. Такие цитотоксические агенты могут быть сопряжены с антителом, *например*,

гуманизированным анти-CD70 антителом, и использоваться, например, для лечения пациента, которому показана терапия антителом. В одном варианте осуществления, «цитотоксический агент» включает моноклональные антитела, *например*, антитела, используемые в комбинации с гуманизированными антителами, описанными в настоящем документе.

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое соединение, применимое при лечении рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXANTM); алкилирующие агенты, алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин) и их производные; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин, ауристатины (включая аналоги монометилауристатина монометилауристатина F (см., например, опубликованную заявку США № 2005-0238649, опубликованную 27 октября 2005, полностью включенную в настоящий документ); дуокармицин (включая синтетические аналоги, КW-2189 и СВІ-ТМІ); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин; трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин, антибиотики, такие как ендииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихимицин гамма II и калихеамицин phi II, см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; динемицин, включая динемицин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарзиностатин хромофор и родственные хромомофоры хромопротеиненедиинового антибиотика), аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабин, даунорубицин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (Adriamycin<sup>TM</sup>) (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубуцин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин,

дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; агенты, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; фолиевой кислоты, фролиновая восполнитель такой как кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демоколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон, митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангидин); уретаны; виндезин; дакарбазин; манномустин; митабронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) и доксетаксел (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин (Gemzar<sup>тм</sup>); 6 тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (Navelbine<sup>TM</sup>); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. Также в это определение включены антигормональные агенты, которые действуют так, чтобы регулировать или ингибировать действие гормонов на опухоли, таких как антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая Nolvadex<sup>TM</sup>), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston $^{TM}$ ); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующий продуцирование эстрогенов в надпочечниках, такие как, например, 4(5)имидазолы, аминоглютетимид, мегестрола ацетат (Megace<sup>TM</sup>), экземестан, форместан, фадрозол, ворозол (Rivisor $^{TM}$ ), летрозол (Femara $^{TM}$ ) и анастрозол (Arimidex $^{TM}$ ); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, производные кислоты или любого вышеперечисленных.

Термин «пролекарство», используемый в настоящем документе, относится к предшественнику или производной форме фармацевтически активного вещества, которое менее цитотоксично для опухолевых клеток по сравнению с исходным лекарственным средством и способно ферментативно активироваться или превращаться в более активную исходную форму. *См.*, например, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", In Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast; и Stella et al., 1985,

"Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, In: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Полезные пролекарства включают, но не ограничены ими, фосфатсодержащие пролекарства, тиофосфатсодержащие пролекарства, сульфатсодержащие пролекарства, пептидсодержащие пролекарства, пролекарства, модифицированные **D**-аминокислотами, гликозилированные пролекарства, лактамсодержащие пролекарства, необязательно замещенные феноксиацетамидсодержащие пролекарства и необязательно замещенные фенилацетамид-содержащие пролекарства, 5-фторцитозин и другие 5-фторуридиновые пролекарства, которые могут быть превращены в более активное цитотоксическое свободное лекарственное средство. Примеры цитотоксических лекарственных средств, которые могут быть дериватизированы в форму пролекарства, включают, но не ограничены ими, описанные выше химиотерапевтические агенты.

«Цитостатический эффект» относится к ингибированию клеточной пролиферации. «Цитостатический агент» относится к агенту, который оказывает цитостатическое действие на клетку, тем самым ингибируя рост и/или размножение определенного подмножества клеток.

Термин «иммуномодулирующий эффект», используемый в настоящем документе, относится стимуляции (иммуностимулирующий) или иммунологического (иммунодепрессивный) поддержания развития ИЛИ ответа. Ингибирование может быть осуществлено, например, путем элиминации иммунных клеток (например, Т- или В-лимфоцитов); индукции или генерации иммунных клеток, которые могут модулировать (например, подавлять) функциональную способность других клеток; индукции невосприимчивого состояния иммунных клеток (например, анергии); или увеличения, уменьшения или изменения активности или функции иммунных клеток, включая, например, изменение структуры белков, экспрессируемых этими клетками (например, изменение продуцирования и/или секреции определенных классов молекул, таких как цитокины, хемокины, факторы роста, факторы транскрипции, киназы, костимулирующие молекулы или другие рецепторы клеточной поверхности и подобные). «Иммуномодулирующий который оказывает агент» относится К агенту, иммуномодулирующее действие на клетку. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий агент оказывает цитотоксическое или цитостатическое действие на иммунную клетку, что способствует иммунному ответу.

Термин «метка» относится к поддающемуся обнаружению соединению или композиции, которая прямо или косвенно конъюгирована с антителом. Метка сама по себе может поддаваться обнаружению (*например*, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение соединения или композиции субстрата, которое поддается обнаружению. Меченое анти-CD70 антитело можно получить и использовать в различных областях, включая диагностику in vitro и in vivo.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу

нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена, по меньшей мере, от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природном источнике нуклеиновой кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от формы или условий, в которых она встречается в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в естественных клетках. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно экспрессируют антитело, где, например, молекула нуклеиновой кислоты находится в хромосомном положении, отличном от такового в естественных клетках.

Термин «контрольные последовательности» относится к полинуклеотидным последовательностям, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для использования в прокариотических клетках, включают, например, последовательности промотора, оператора и сайта связывания рибосомы. Эукариотические контрольные последовательности включают, ограничены ими, промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры. контрольные последовательности можно использовать для экспрессии и продуцирования анти-СD70 связывающего агента в прокариотических и эукариотических клеткаххозяевах.

Последовательность нуклеиновой кислоты является «функционально связанной», когда она помещена в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, препоследовательность нуклеиновой кислоты или секреторный лидер функционально связаны с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде препротеина, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан кодирующей c последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, «функционально связанный» означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторного лидера, непрерывными, и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры необязательно являются непрерывными. Связывание можно осуществить путем лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если таких сайтов не существует, для связывания последовательностей ДНК онжом использовать синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

Термин «полипептид» относится к полимеру аминокислот и его эквиваленту и не относится к конкретной длине продукта; таким образом, «пептиды» и «белки» включены в определение полипептида. Также в определение полипептидов включены «антитела», как определено в настоящем документе. «Полипептидная область» относится к сегменту полипептида, где сегмент может содержать, например, один или более доменов или

мотивов (например, полипептидная область антитела может содержать, например, одну или более определяющих комплементарность областей (CDR)). Термин «фрагмент» относится к части полипептида, обычно имеющей, по меньшей мере, 20 непрерывных или, по меньшей мере, 50 непрерывных аминокислот полипептида. «Производное» представляет собой полипептид или его фрагмент, имеющий одну или более неконсервативных или консервативных аминокислотных замен по отношению ко второму полипептиду; или полипептид или его фрагмент, который модифицирован ковалентным второй молекулы, например, присоединением гетерологичного полипептида или гликозилированием, ацетилированием, фосфорилированием подобным. Кроме того, в определение «производное» включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (например, аминокислоты неприродного происхождения и подобные), полипептиды с незамещенными связями, а также другие модификации, известные в данной области техники, как природные, так и не природного происхождения.

«Выделенный» полипептид представляет собой полипептид, который был идентифицирован, выделен и/или восстановлен из компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты его природной среды представляют собой материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Выделенный полипептид включает выделенное антитело или его фрагмент или производное. «Антитело» включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, поскольку, по меньшей мере, один компонент природной среды антитела не будет присутствовать.

В некоторых вариантах осуществления, антитело будет очищено (1) до более чем 95% массовых антитела, как определено способом Лоури, и в других аспектах, до более чем 99% массовых, (2) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, предпочтительно, серебряного окрашивания.

Термин «гетерологичный» в контексте полипептида означает «из другого источника» (*например*, клетки, ткани, организма или вида) по сравнению с другим полипептидом, так что два полипептида являются разными. Как правило, гетерологичный полипептид происходит из другого вида.

В контексте полипептидов иммуноглобулинов или их фрагментов, «консервативная замена» означает одну или более аминокислотных замен, которые существенно не уменьшают специфическое связывание (*например*, при измерении  $K_D$ ) полипептида иммуноглобулина или его фрагмента с антигеном (*те.*, замены, которые увеличивают аффинность связывания, которые существенно не изменяют аффинность связывания или которые снижают аффинность связывания не более чем примерно на 40%,

как правило, не более чем примерно на 30%, чаще, не более чем примерно на 20%, еще чаще, не более чем примерно на 10%, или наиболее типично, не более чем примерно на 5%, как определено стандартными анализами связывания, такими как, *например*, ELISA).

Термины «идентичный» или «доля идентичности» в контексте двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенную долю нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения доли идентичности, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислоты или последовательности нуклеиновой кислоты могут быть введены гэпы оптимального выравнивания со второй последовательностью амино- или нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы идентичны в этом положении. Доля идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности=# идентичных положений/общее # положений (например, перекрывающихся положений) х 100). В некоторых вариантах осуществления, две последовательности имеют одинаковую длину.

Термин «по существу идентичные» в контексте двух нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60% или, по меньшей мере, 65% идентичность; обычно, по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 75% идентичность; более типично, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85% идентичность; и даже более типично, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 98% идентичность (например, как определено с использованием одного из способов, изложенных ниже).

Термины «сходство» или «доля сходства» в контексте двух или нескольких полипептидных последовательностей относятся К двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенную долю аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми или консервативно заменены при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренные с использованием одного ИЗ способов. изложенных ниже. Например, аминокислотная последовательность может считаться сходной со второй аминокислотной последовательностью, когда первая аминокислотная последовательность на, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% идентична или консервативно заменена по сравнению со второй аминокислотной последовательностью при сравнении с таким же количеством аминокислот, что и количество, содержащееся в первой последовательности,

или при сравнении с выравниванием полипептидов, которые были выровнены, *например*, одним из способов, изложенных *ниже*.

Термины «существенное сходство» или «по существу сходный» в контексте полипептидных последовательностей указывают на то, что полипептидная область имеет последовательность с, по меньшей мере, 70%, обычно, по меньшей мере, 80%, более типично, по меньшей мере, 85% или, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% сходством последовательности с эталонной последовательностью. Например, полипептид является по существу сходным со вторым полипептидом, например, если два пептида отличаются одной или несколькими консервативными заменами.

В контексте анти-CD70 антител или их производных, белок, который имеет одну или более полипептидных областей, по существу идентичных или по существу сходных с одной или несколькими антигенсвязывающими областями (например, вариабельной областью тяжелой или легкой цепи, или CDR тяжелой или легкой цепи) анти-CD70 антитела сохраняет специфическое связывание с эпитопом CD70, распознаваемым анти-CD70 антителом, как определено с использованием любого из различных стандартных иммуноанализов, известных в данной области техники или упоминаемых в настоящем документе.

Определение доли идентичности или доли сходства между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, с изменениями, как у Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиск нуклеотидов BLAST может быть выполнен с помощью программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющий интерес белок. Поиск белка BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Чтобы получить выравнивание с гэпами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Альтернативно, PSI-Blast можно использовать для выполнения повторного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей, можно

использовать таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Дополнительные алгоритмы анализа последовательности известны в данной области техники и включают ADVANCE и ADAM, как описано у Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; и FASTA, описанные в Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 85:2444-8. В FASTA, ktup означает это параметр управления, который устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если ktup=2, сходные области в двух сравниваемых последовательностях обнаруживаются путем просмотра пар выровненных остатков; если ktup=1, исследуются одиночные выровненные аминокислоты. ktup может быть установлен 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Значение по умолчанию, если ktup не указан, составляет 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, выравнивание белковых последовательностей можно проводить с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано у Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

Используемые в настоящем документе выражения «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную исследуемую клетку и культуры, полученные из нее, независимо от количества переносов. Также понятно, что все потомство может не быть точно идентичным по содержанию ДНК из-за преднамеренных или естественных мутаций. Включено мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, которые отбирались в исходно трансформированной клетке. Если имеются в виду отдельные обозначения, это будет ясно из контекста.

Термин «субъект» для целей лечения относится к любому животному, в частности животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и подобные. Предпочтительно, субъектом является человек.

Используемый в настоящем документе термин «нарушение» и термины «CD70ассоциированное нарушение» и «СD70-ассоциированное заболевание» относятся к любому состоянию, при котором может помочь лечение анти-CD70-связывающим агентом, как описано в настоящем документе. «СD70-ассоциированное нарушение» и «CD70-ассоциированное заболевание» обычно экспрессируют CD70 или его фрагмент на клеточной поверхности. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающего к Неограничивающие рассматриваемому нарушению. примеры или нарушения, подлежащие лечению по настоящему изобретению, включают рак, миелоидные злокачественные новообразования, гематологические злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, лейкозы и лимфоидные злокачественные новообразования, карциномы и воспалительные, ангиогенные и иммунологические нарушения. Конкретные примеры нарушений описаны ниже.

Термины «лечение» и «терапия» и подобные, используемые в настоящем документе, предназначены для включения терапевтических, а также профилактических или подавляющих мер в отношении заболевания или нарушения, приводящих к любому клинически желаемому или благоприятному эффекту, включая, но не ограничиваясь ими, облегчение или ослабление одного или нескольких симптомов, регрессию, замедление или прекращение прогрессирования заболевания или нарушения. Так, например, термин лечение включает введение агента до или после появления симптома заболевания или нарушения, тем самым предотвращая или устраняя все признаки заболевания или нарушения. В качестве другого примера, термин включает введение агента после клинического проявления заболевания для борьбы с симптомами заболевания. Кроме того, введение агента после начала и после развития клинических симптомов, когда введение влияет на клинические параметры заболевания или нарушения, такие как степень повреждения ткани или количество или степень метастазирования, независимо от того, приводит ли лечение к улучшению заболевания, включает «лечение» или «терапию», как используется в настоящем документе.

Используемые В настоящем документе термины «профилактика» или «предотвращать» относятся к введению анти-CD70-связывающего агента субъекту до появления клинического или диагностического симптома рака, экспрессирующего СD70, нарушения (например, или иммунологического введению индивидууму предрасположенностью или высоким риском развития рака, экспрессирующего СD70, или иммунологического нарушения) для (а) блокирования возникновения или наступления рака, экспрессирующего СD70, или иммунологического нарушения, или одного или нескольких его клинических или диагностических симптомов, (b) ингибирования тяжести возникновения СD70-экспрессирующего рака или иммунологического нарушения, или (с) возникновения СD70-экспрессирующего уменьшения вероятности или иммунологического нарушения.

Термин «внутривенное вливание» относится к введению агента, *например* терапевтического агента, в вену животного или человека в течение периода времени, превышающего примерно 15 минут, обычно примерно от 30 до 90 минут.

Термин «внутривенный болюс» или «внутривенно струйно» относится к введению лекарственного средства в вену животного или человека таким образом, что организм получает лекарство примерно за 15 минут или менее, обычно за 5 минут или менее.

Термин «подкожное введение» относится к введению агента, *например*, терапевтического агента, под кожу пациента животного или человека, как правило, в карман между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, устойчивой доставки из сосуда с лекарственным средством. Защемление или оттягивание кожи вверх и в сторону от подлежащих тканей может привести к образованию кармана.

Термин «вкладыш в упаковку» используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, введении, противопоказаниях и/или

предупреждениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов.

«Липосома» представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которая используется для доставки лекарственного средства (такого как антитело) млекопитающему. Компоненты липосом обычно располагаются в виде двух слоев, подобно расположению липидов в биологических мембранах.

Термин «подкожное вливание» относится к введению лекарственного средства под кожу животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, устойчивой доставки из сосуда для лекарственного средства в течение периода времени, включающего, но не ограниченного ими, 30 минут или менее или 90 минут или менее. Необязательно, инфузия может быть осуществлена путем подкожной имплантации насоса для доставки лекарственного средства, имплантированного под кожу животного или человека, где насос доставляет заданное количество лекарства в течение заданного периода времени, такого как 30 минут, 90 минут, или период времени, охватывающий продолжительность схемы лечения.

Термин «подкожный болюс» относится к введению лекарственного средства под кожу животного или человека, когда болюсное введение лекарственного средства составляет менее примерно 15 минут; в другом аспекте, менее 5 минут, и в еще одном аспекте, менее 60 секунд. В еще одном аспекте, введение осуществляется в карман между кожей и подлежащей тканью, где карман может быть создан защемлением или оттягиванием кожи вверх и в сторону от подлежащей ткани.

Термин «эффективное количество» относится к количеству анти-CD70-связывающего агента (например, антитела или его производного или другого связывающего агента), которое достаточно для ингибирования возникновения или ослабления одного или нескольких клинических или диагностических симптомов CD70-экспрессирующего рака или иммунологического нарушения у субъекта. Эффективное количество агента вводят в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, по «эффективной схеме». Термин «эффективная схема» относится к комбинации количества агента и частоты дозирования, адекватных для осуществления лечения или профилактики CD70-экспрессирующего рака или иммунологического нарушения.

Термин «терапевтически эффективное количество» используется для обозначения количества терапевтического агента, оказывающего благотворное воздействие на пациента, например эффект остановки роста или уничтожение клетки. В одном аспекте, терапевтически эффективное количество обладает апоптотической активностью или способно индуцировать гибель клеток. В другом аспекте, терапевтически эффективное количество относится к целевой концентрации в сыворотке, которая, как было показано, эффективна, например, для замедления прогрессирования заболевания. Эффективность можно измерить обычными способами, в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Например, при опухолевых заболеваниях или нарушениях, характеризующихся

клетками, экспрессирующими CD70, эффективность можно измерить путем оценки времени до прогрессирования заболевания (TTP) или определения частоты ответа (RR).

Используемый в настоящем документе термин «полный ответ» или «CR» относится к исчезновению всех поражений-мишеней; «частичный ответ» или «PR» относится к уменьшению, по меньшей мере, на 30% суммы самых длинных диаметров (SLD) поражений-мишеней, принимая в качестве эталона исходный SLD; и «стабильное заболевание» или «SD» относится либо к недостаточному уменьшению поражений-мишеней, чтобы квалифицировать их как PR, либо к недостаточному увеличению, чтобы квалифицировать как PD, принимая в качестве эталона наименьший SLD с момента начала лечения.

Используемый в настоящем документе термин «выживаемость без прогрессирования» или «PFS» относится к продолжительности времени во время и после лечения, в течение которого заболевание, подвергаемое лечению (например, рак), не ухудшается. Выживаемость без прогрессирования может включать количество времени, в течение которого у пациентов наблюдается полный или частичный ответ, а также количество времени, в течение которого у пациентов наблюдается стабилизация заболевания.

Используемый в настоящем документе термин «общая частота ответа» или «ORR» относится к сумме частоты полного ответа (CR) и частоты частичного ответа (PR).

Используемый в настоящем документе термин «общая выживаемость» или «OS» относится к доле лиц в группе, которые, вероятно, будут живы после определенного периода времени.

«Нежелательное явление» (АЕ), как используется в настоящем документе, представляет собой любой неблагоприятный и, как правило, непреднамеренный или нежелательный признак (включая аномальные лабораторные данные), симптом или заболевание, связанное с использованием медикаментозного лечения. Медикаментозное лечение может иметь одно или более связанных АЕ, и каждое АЕ может иметь одинаковую или разную степень тяжести. Ссылка на способы, способные «изменять нежелательные явления», означает схему лечения, которая снижает частоту и/или тяжесть одного или нескольких АЕ, связанных с применением другой схемы лечения.

«Серьезное нежелательное явление» или «SAE», используемое в настоящем документе, представляет собой нежелательное явление, которое соответствует одному из следующих критериев:

- Является смертельным или опасным для жизни (как используется в определении серьезного нежелательного явления, «угрожающее жизни» относится к событию, при котором пациент находился в опасности смерти во время события; это не относится к событию, которое гипотетически могло бы вызвать смерть, если бы оно было более серьезным.
  - Приводит к стойкой или значительной инвалидности/нетрудоспособности
  - Представляет собой врожденную аномалию/врожденный дефект

- Является значимым с медицинской точки зрения, *т. е.* определяется как событие, которое подвергает опасности пациента или может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения одного из исходов, перечисленных выше. При принятии решения о том, является ли АЕ «медицински значимым», должны применяться медицинские и научные суждения.
- Требуется стационарная госпитализация или продление имеющейся госпитализации, за исключением следующего: 1) плановое лечение или наблюдение за основным заболеванием, не связанное с каким-либо ухудшением состояния; 2) рекомендуемое или плановое лечение ранее существовавшего состояния, не связанного с исследуемым показанием и не ухудшившегося с момента подписания информированного согласия; 3) социальные причины и временный уход при отсутствии ухудшения общего состояния больного.

Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающую одну из альтернатив, обе или любую их комбинацию. Используемый в настоящем документе неопределенный артикль «а» или «ап» следует понимать как относящийся к «одному или нескольким» любого перечисленного или пронумерованного компонента.

Термины «примерно» или «состоящий по существу из» относятся к значению или композиции, которые находятся в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретного значения или композиции, как определено специалистом в данной области техники, который будет частично зависеть от того, как значение или состав измеряется или определяется, *т.е.* ограничения системы измерения. Например, «примерно» или «состоящий по существу из» может означать в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. Альтернативно,, «примерно» или «состоящий по существу из» может означать диапазон до 20%. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут означать значение на порядок или до 5-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения указаны конкретные значения или составы, если не указано иное, следует исходить из того, что значение «примерно» или «состоит по существу из» находится в допустимом диапазоне ошибок для этого конкретного значения или состава.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей. Термин «фармацевтически совместимый ингредиент» относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адъюванту, эксципиенту или носителю, с которым вводят анти-CD70-связывающий агент.

Фраза «фармацевтически приемлемая соль», используемая в настоящем документе, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям анти-CD70-связывающего агента или терапевтического агента. Анти-CD70-связывающий

агент или терапевтический агент содержит, по меньшей мере, одну аминогруппу, и, соответственно, кислотно-аддитивные соли могут быть образованы с этой аминогруппой или другими подходящими группами. Примеры солей включают, но не ограничены ими, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (например, 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может включать включение другой молекулы, такой как ион ацетата, ион сукцината или другой противоион. Противоион может быть любой органической или неорганической группой, которая стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре более одного заряженного атома. Случаи, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

«Фармацевтически приемлемый сольват» или «сольват» относится к ассоциации одной или нескольких молекул растворителя и анти-CD70-связывающего агента и/или терапевтического агента. Примеры растворителей, которые образуют фармацевтически приемлемые сольваты, включают, но не ограничены ими, воду, изопропанол, этанол, метанол, ДМСО, этилацетат, уксусную кислоту и этаноламин.

Аббревиатура «AFP» относится к диметилвалину-валину-долаизолейину-долапроину-фенилаланину-п-фенилендиамину.

Аббревиатура «ММАЕ» относится к монометилауристатину Е.

Аббревиатура «AEB» относится к сложному эфиру, полученному реакцией ауристатина Е с параацетилбензойной кислотой.

Аббревиатура «AEVB» относится к сложному эфиру, полученному реакцией ауристатина Е с бензоилвалериановой кислотой.

Аббревиатура «ММАF» относится к довалину-валину-долаизолейнину-долапроину-фенилаланину.

Сокращения «fk» и «phe-lys» относятся к линкеру фенилаланин-лизин.

Термины «Treg» или «регуляторные Т-клетки» относятся к CD4<sup>+</sup> Т-клеткам, которые подавляют CD4+CD25<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточную пролиферацию и/или эффекторную функцию, или которые иным образом подавляют иммунный ответ. Примечательно, что Treg может подавлять иммунные ответы, опосредованные естественными киллерами, естественными Т-киллерами, а также другими иммунными клетками.

Термины «регуляторная функция Т-клеток» или «функция Treg» используются взаимозаменяемо для обозначения любой биологической функции Treg, которая приводит к снижению пролиферации CD4+CD25<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток или к снижению опосредованного эффекторной Т-клеткой иммунного ответа. Функция Treg может быть

помощью методов, установленных данной области Неограничивающие примеры полезных in vitro анализов для измерения функции Treg включают анализы супрессии Transwell, а также in vitro анализы, в которых таргетные обычные Т-клетки (Tconv) и Treg, выделенные из периферической крови человека или пуповинной крови (или селезенки или лимфатического узла мыши) необязательно анти-CD3<sup>+</sup>анти-CD28 активируются микроносителями, покрытыми антигенпрезентирующими клетками (АРС), такими как, например, облученные спленоциты или очищенные дендритные клетки (DC) или облученные PBMC) с последующим in vitro обнаружением обычной пролиферации Т-клеток (например, путем измерения включения радиоактивных нуклеотидов (таких как, например, [H]-тимидин) или флуоресцентных нуклеотидов, или с помощью набора Cayman Chemical MTT Cell Proliferation Assay Kit, или путем мониторинга разбавления красителя зеленого эфирного флуорохрома CFSE или Seminaphtharhodafluor (SNARF-1) цитометрии). Другие общепринятые анализы измеряют ответы цитокинов Т-клеток. Полезные in vivo анализы функции Treg включают анализы на животных моделях заболеваний, в которых Treg играют важную роль, включая, например, (1) модель гомеостаза (с использованием нативных гомеостатически размножающихся CD4<sup>+</sup> Tклеток в качестве клеток-мишеней, которые в первую очередь подавляются Treg), (2) модель восстановления воспалительного заболевания кишечника (IBD) (с использованием Thl Т-клеток (Thl7) в качестве клеток-мишеней, которые в первую очередь подавляются Treg), (3) модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE) (с использованием Thl-7 и Thl Т-клеток в качестве клеток-мишеней, которые в первую очередь подавляются Treg), (4) модель меланомы B16 (подавление противоопухолевого иммунитета) (с использованием CD8<sup>+</sup> Т-клеток в качестве клеток-мишеней, которые в первую очередь подавляются Treg), (5) подавление воспаления толстой кишки при колите с адоптивном переносом, при котором наивные клетки CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>M</sup> Tconv переносят мышам RagV, и (6) модель восстановления Foxp3 (с использованием лимфоцитов в качестве клеток-мишеней, которые в первую очередь подавляются Treg). Согласно одному протоколу, все модели требуют мышей для популяций донорных Т-клеток, а также мышей Rag1<sup>-/-</sup> или Foxp3 для реципиентов. Для получения более подробной информации о различных полезных анализах см., например, Collison and Vignali, In Vitro Treg Suppression Assays, Chapter 2 in Regulatory T Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Kassiotis and Liston eds., Springer, 2011, 707:21-37; Workman et al, In Vivo Treg Suppression Assays, Chapter 9 in Regulatory T Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Kassiotis and Liston eds., Springer, 2011, 119-156; Takahashi et al, Int. Immunol, 1998, 10: 1969-1980; Thornton et al, J. Exp. Med., 1998, 188:287-296; Collison et al, J. Immunol, 2009, 182:6121-6128; Thornton and Shevach, J. Exp. Med., 1998, 188:287-296; Asseman et al, J. Exp. Med., 1999, 190:995-1004; Dieckmann et al, J. Exp. Med., 2001, 193: 1303-1310; Belkaid, Nature Reviews, 2007, 7:875-888; Tang and Bluestone, Nature Immunology, 2008, 9:239-244; Bettini and Vignali, Curr. Opin. Immunol, 2009, 21:612-618;

Dannull et al, J Clin Invest, 2005, 115(12):3623-33; Tsaknaridis, et al, J Neurosci Res., 2003, 74:296-308.

Как описано в настоящем документе, любой диапазон концентраций, долевой диапазон, диапазон отношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, его доли (например, одной десятой и одной сотой целого числа), если не указано иное.

Различные аспекты описания описаны более подробно в следующих подразделах.

#### II. Анти-CD70 антитела

Изобретение относится к анти-CD70 антителам, таким как гуманизированные антитела, полученные из антитела 1F6 мыши. 1F6 представляет собой моноклональное антитело иммуноглобулина G1 мыши (IgG1) против CD70. 1F6 и гуманизированные варианты 1F6 описаны в патенте США № 8,067,546 и международной патентной публикации WO 2006/113909. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело является нефукозилированным.

Аффинность связывания гуманизированных форм антитела 1F6 мыши (*т.е.* константа диссоциации, K<sub>D</sub>) предпочтительно находится в пределах пяти или двух раз от таковой антитела 1F6 мыши для CD70 человека. Гуманизированные антитела 1F6 специфически связываются с CD70 человека в нативной форме и/или рекомбинантно экспрессируются из клеток яичника китайского хомячка (CHO), как и антитела мыши, из которых они были получены. Предпочтительные гуманизированные антитела 1F6 имеют аффинность, равную или превышающую (т.е. превышающую предел погрешности измерения) аффинность 1F6 к CD70 человека (например, 1,1-5-кратно, 1,1-3-кратно, 1,5-3-кратно, 1,7-2,3-кратно или 1,7-2,1-кратно от аффинности или примерно в два раза от аффинности 1F6). Предпочтительные гуманизированные антитела 1F6 связываются с одним и тем же эпитопом и/или конкурируют с 1F6 за связывание с CD70 человека.

В некоторых вариантах осуществления, антитела по изобретению ингибируют рак (например, рост клеток, метастазирование и/или гибель организмов), как показано на раковых клетках, размножающихся в культуре, в модели на животных или в клинических быть испытаниях. Животные модели ΜΟΓΥΤ получены путем имплантации экспрессирующих СD70 линий опухолевых клеток человека в соответствующие штаммы иммунодефицитных грызунов, например бестимусным голым мышам или мышам SCID. Эти линии опухолевых клеток могут быть установлены у иммунодефицитных грызуновхозяев либо в виде солидной опухоли при подкожных инъекциях, либо в виде диссеминированных опухолей при внутривенных инъекциях.

После создания в организме хозяина, эти модели опухолей можно применять для оценки терапевтической эффективности анти-CD70 антител или их конъюгированных форм, как описано в примерах.

Как правило, анти-CD70 антитела по настоящему изобретению связывают CD70, *например*, CD70 человека, и оказывают цитостатическое и цитотоксическое действие на

злокачественные клетки, такие как раковые клетки. Анти-СD70 антитела по настоящему изобретению предпочтительно являются моноклональными и могут представлять собой мультиспецифические, человеческие, гуманизированные или химерные одноцепочечные антитела, Fab фрагменты, F(ab') фрагменты, фрагменты, продуцируемые CD70-связывающие библиотекой экспрессии Fab, И фрагменты любой вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитела по изобретению специфически связываются с CD70. Молекулы иммуноглобулина по описанию могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекулы иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления по описанию, анти-CD70 антитела представляют собой антигенсвязывающие фрагменты (*например*, антигенсвязывающие фрагменты человека), как описано в настоящем документе, и включают, но не ограничены ими, Fab, Fab' и  $F(ab')_2$ , Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидными связями (sdFv) и фрагменты, содержащие либо  $V_L$ , либо  $V_H$  домен. Антигенсвязывающие фрагменты, в том числе одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельную(ые) область(и) отдельно или в комбинации с полностью или частично из следующих: шарнирной областью, CH1, CH2, CH3 и CL доменами. Также в настоящее изобретение включены антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию вариабельной(ых) области(ей) с шарнирной областью, CH1, CH2, CH3 и CL доменами. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты принадлежат человеку, мыши (*например*, мыши и крысе), ослу, овце, кролику, козе, морской свинке, верблюду, лошади или курице.

антитела Анти-CD70 настоящему изобретению быть ПО могут моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими или более мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими к разным эпитопам СD70 или могут быть специфическими как к CD70, так и к гетерологичному белку. См., например, публикации РСТ WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60 69; патенты США. №№ 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547 1553.

Анти-CD70 антитела по настоящему изобретению могут быть гуманизированными антителами. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитела по настоящему изобретению представляют собой гуманизированные антитела 1F6 мыши. Гуманизированные версии 1F6 описаны в патенте США № 8,067,546. Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR нечеловеческого «донорного» антитела привиты к «акцепторным» последовательностям антител человека (см., например, Queen, US 5,530,101 и 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; и Foote, US 6,881,557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, последовательность зрелого

антитела человека, составную часть таких последовательностей, последовательность последовательностей антитела человека или последовательность зародышевой области. Предпочтительной акцепторной последовательностью для тяжелой цепи является  $V_H$  экзон зародышевой линии  $V_H$ 1-2 (также обозначаемый в литературе как HV1-2) (Shin et al, 1991, EMBO J. 10:3641-3645), и для шарнирной области (J<sub>H</sub>), экзон J<sub>H</sub>-6 (Mattila et al, 1995, Eur. J. Immunol. 25:2578-2582). Для легкой цепи, предпочтительной акцепторной последовательностью является экзон VK2-30 (также обозначаемый в литературе как KV2-30), и для шарнирной области, экзон JK-4 (Hieter et al, 1982, J. Biol. Сhem. 257:1516-1522). Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее некоторые или все CDR полностью или по существу из донорного антитела и каркасные последовательности вариабельной области и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогичным образом, гуманизированная тяжелая цепь имеет, по меньшей мере, одну, две и обычно все три CDR, полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если они присутствуют, по существу из последовательностей каркасной области вариабельной области тяжелой цепи и константных областей человека. Аналогичным образом, гуманизированная легкая цепь имеет, по меньшей мере, одну, две и обычно все три CDR, полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, и последовательности каркасной области вариабельной области легкой цепи и константной области легкой цепи, если они присутствуют, по существу из последовательностей каркасной области вариабельной области легкой цепи и константной области человека. Помимо нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе по существу происходит от соответствующей CDR в антителе нечеловеческого происхождения, когда, по меньшей мере, 60%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по Kabat) идентичны между соответствующими CDR. Последовательности каркасной области вариабельной области цепи антитела или константной области цепи антитела по существу происходят из последовательности каркасной области вариабельной области человека или константной области человека, соответственно, когда, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных по Kabat, идентичны.

Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно, как определено по Kabat) антитела мыши, они также могут быть получены с менее чем всеми CDR (например, по меньшей мере, 3, 4 или 5) CDR антитела мыши (например, Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al, Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

Определенные аминокислоты из остатков каркаса вариабельной области человека могут быть выбраны для замены на основании их возможного влияния на конформацию

CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний осуществляется путем моделирования, изучения характеристик аминокислот в конкретных местах или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза определенных аминокислот.

Например, когда аминокислота отличается между остатком каркасной области вариабельной области мыши и выбранным остатком каркасной области вариабельной области человека, аминокислота каркасной области человека может быть заменена эквивалентной аминокислотой каркасной области из антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота:

- (1) нековалентно связывает антиген напрямую,
- (2) находится рядом с CDR областью,
- (3) иным образом взаимодействует с CDR областью (например, находится в пределах примерно 6Å от CDR области); или
  - (4) опосредует взаимодействие между тяжелой и легкой цепями.

Анти-CD70 антитела по настоящему изобретению могут быть описаны или указаны с точки зрения конкретных CDR, которые они содержат. Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации «Chothia»); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745 (схема нумерации «Contact»); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»); Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70 (схема нумерации «Aho»); и Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272 (схема нумерации «AbM»). Границы данной CDR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. В некоторых вариантах осуществления, «CDR» или «определяющая комплементарность область» или отдельные указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области (например, его вариабельной области) следует понимать как охватывающую (или конкретную) CDR, как определено любой из вышеупомянутых схем. Например, когда указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> области аминокислотной последовательности, подразумевается, что такой CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) в пределах вариабельной области, как определено любой из вышеупомянутых схем. Может быть указана схема идентификации конкретной CDR или CDR, например, CDR, как определено

способом Kabat, Chothia, AbM или IMGT.

Последовательности CDR анти-CD70 антител и конъюгатов анти-CD70 антителолекарственное средство, описанные в настоящем документе, соответствуют схеме нумерации Kabat, как описано у Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, если не указано иное.

В одном аспекте, в настоящем документе предложено анти-CD70 антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определяются по схеме нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело дополнительно содержит Fc домен. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело является нефукозилированным.

Анти-CD70 антитело, описанное в настоящем документе, может содержать любую подходящую последовательность каркасной области вариабельного домена при условии, что антитело сохраняет способность связывать CD70 (например, CD70 человека). Используемые в настоящем документе каркасные области тяжелой цепи обозначены как «HC-FR1-FR4», и каркасные области легкой цепи обозначены как «LC-FR1-FR4».

В некоторых вариантах осуществления анти-CD70 антител, описанных в настоящем документе, вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQ APGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARDYGDYGMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1), и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKS VSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:2).

В некоторых вариантах осуществления анти-CD70 антител, описанных в настоящем документе, вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQ APGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARDYGDYGMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1) и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKS VSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:7).

В одном аспекте, в настоящем документе предложено анти-CD70 антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, или содержащее вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. В одном аспекте, в настоящем документе предложено анти-CD70 антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой

цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и содержащее вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

В одном аспекте, в настоящем документе предложено анти-CD70 антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, или содержащее вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. В одном аспекте, в настоящем документе предложено анти-CD70 антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и содержащее вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложено антиантитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью, и сохраняет способность связываться с СD70 (например, CD70 человека). В некоторых вариантах осуществления, в SEQ ID NO:1 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами CDR (m.e. в FR). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:1, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложено анти-

CD70 антитело, содержащее вариабельный домен легкой цепи, аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления, вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности SEO ID NO:2, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности и сохраняет способность связываться с CD70 (например, CD70 человека). В некоторых вариантах осуществления, в SEO ID NO:2 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами CDR (m.e. в FR). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO:2, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложено анти-CD70 антитело, содержащее вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых вариабельный осуществления, домен легкой цепи, аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности и сохраняет способность связываться с CD70 (например, CD70 человека). В некоторых вариантах осуществления, в SEQ ID NO:7 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами CDR (m.e. в FR). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO:7, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложено анти-CD70 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT

PGQGLKWMGW **INTYTGEPTY** NYGMNWVRQA **ADAFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDY GDYGMDYWGQ TKGPSVFPLA GTTVTVSSAS PSSKSTSGGT** AALGCLVKDY **FPEPVTVSWN** SGALTSGVHT **FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP** SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT **KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS** VFLFPPKPKD **TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST** YRVVSVLTVL **HQDWLNGKEY** KCKVSNKALP **KGQPREPQVY KNQVSLTCLV APIEKTISKA** TLPPSRDELT **KGFYPSDIAV NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK** LTVDKSRWOO **EWESNGOPEN GNVFSCSVMH** EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:3). В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью, и сохраняет способность связываться с СD70 (например, CD70 человека). В некоторых вариантах осуществления, в SEQ ID NO:3 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами CDR (m.e. в FR). В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:3, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложено анти-**CD70** антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности аминокислотной последовательности DIVMTQSPDS LAVSLGERAT **INCRASKSVS TSGYSFMHWY** QQKPGQPPKL LIYLASNLES **GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY** YCQHSREVPW **TFGQGTKVEI** KRTVAAPSVF **IFPPSDEQLK QWKVDNALQS SGTASVVCLL** NNFYPREAKV **GNSOESVTEO DSKDSTYSLS** STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:4). В некоторых вариантах осуществления, легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98% 99% идентичность последовательности аминокислотной 96%. или последовательности SEQ ID NO:4, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью и сохраняет способность связываться с CD70 (например, CD70 человека). В некоторых вариантах осуществления, в SEQ ID NO:4 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами CDR (m.e. в FR). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит последовательность легкой цепи SEQ ID NO:4, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, как в любом из вариантов осуществления, представленных выше, и вариабельный домен легкой цепи, как в любом из вариантов осуществления, представленных выше. В одном варианте осуществления, антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:1 и последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO:2, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело содержит: і) аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичность последовательности вариабельной областью тяжелой **SEQ** IDNO:1. ii) аминокислотную последовательность И аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичность последовательности с вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления, N-концевой глутамин вариабельного домена тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело представляет собой моноклональное антитело.

осуществления, анти-CD70 некоторых вариантах антитело вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR, или вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR, анти-CD70 антитела, описанного в патенте США № 8,067,546, патенте США. № 8,562,987, патенте США. № 9,428,585, патенте США № 9,701,752, US 2009/0148942, US 2012/0045436, US 2014/0178936, US 2017/0022282 или международной патентной публикации WO 2006/113909. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR, анти-СD70 антитела, описанного в патенте США № 8,067,546, патенте США № 8,562,987, патенте США № 9,428,585, патенте США № 9,701,752, US 2009/0148942, US 2012/0045436, US 2014/0178936, US 2017/0022282 или международной патентной публикации WO 2006/113909. В некоторых вариантах осуществления, CDR определяются схемой нумерации Kabat.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи анти-CD70 антитела, описанного в патенте США № 8,067,546, патенте США № 8,562,987, патенте США № 9,428,585, патенте США № 9,701,752, US 2009/0148942, US 2012/0045436, US 2014/0178936, US 2017/0022282 или международной патентной публикации WO 2006/113909. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-CD70 антитела, описанных в патенте США № 8,067,546, патенте США № 8,562,987, патенте США № 9,428,585, патенте США № 9,701,752, US 2009/0148942, US 2012/0045436, US 2014/0178936, US 2017/0022282 или международной патентной публикации WO 2006/113909.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело представляет собой анти-CD70 антитело, такое как гуманизированный вариант 1F6, как описано в патенте США № 8,067,546, патенте США № 8,562,987, патенте США № 9,428,585, патенте США № 9,701,752, US 2009/0148942, US 2012/0045436, US 2014/0178936, US 2017/0022282 или международной патентной публикации WO 2006/113909.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR, или вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR, анти-CD70 антитела ворсетузумаба. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR, анти-CD70 антитела ворсетузумаба. В некоторых вариантах осуществления, CDR определяются схемой нумерации Kabat.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи анти-CD70 антитела ворсетузумаба. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-CD70 антитела ворсетузумаба.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело представляет собой ворсетузумаб.

Анти-CD70 антитела по настоящему изобретению также могут быть описаны или указаны с точки зрения их аффинности связывания с CD70 (*например*, CD70 человека). Предпочтительные аффинности связывания включают аффинности с константой диссоциации или  $K_D$  менее 5 х10<sup>-2</sup> M, 10<sup>-2</sup> M, 5×10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-3</sup> M, 5×10<sup>-4</sup> M, 10<sup>-4</sup> M, 5×10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, 5×10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 5×10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 5×10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 5×10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 5×10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-10</sup> M, 5×10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-11</sup> M, 5×10<sup>-12</sup> M, 10<sup>-12</sup> M, 5×10<sup>-13</sup> M, 10<sup>-13</sup> M, 5×10<sup>-14</sup> M, 10<sup>-14</sup> M, 5×10<sup>-15</sup> M или 10<sup>-15</sup> M.

Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены соответственно  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ . Классы  $\gamma$  и  $\alpha$  далее подразделяются на подклассы, *например*, люди экспрессируют следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в виде нескольких полиморфных вариантов, называемых аллотипами (рассмотрено в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. Обычными аллотипическими вариантами в человеческих популяциях являются те, которые обозначаются буквами a, f, n, z или их комбинациями. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, антитело

может содержать Fc область тяжелой цепи, содержащую Fc область IgG человека. В дополнительных вариантах осуществления, Fc область IgG человека содержит IgG1 человека.

В вариантах осуществления, анти-CD70 некоторых антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, как в любом из вариантов осуществления, представленных выше, и вариабельный домен легкой цепи, как в любом из вариантов осуществления, представленных выше. В одном варианте осуществления, антитело константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность AS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN **SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP** SSSLGTQTYI **CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC** VFLFPPKPKD **TLMISRTPEV PAPELLGGPS** YRVVSVLTVL **TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT** KPREEQYNST KCKVSNKALP **HODWLNGKEY APIEKTISKA** KGQPREPQVY **TLPPSRDELT** KNQVSLTCLV **KGFYPSDIAV EWESNGQPEN** NYKTTPPVLD **SDGSFFLYSK** LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:5) и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность **TVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS THQGLSSPVT GNSOESVTEO DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV** KSFNRGEC (SEO ID NO:6), включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

Антитела также включают производные, которые модифицированы, *т.е.* путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, так что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с CD70 или проявлению цитостатического или цитотоксического действия на клетки. Например, но не в качестве ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, *например*, путем гликозилирования, ацетилирования, ПЭГилирования, фосфилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными методами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или более не классических аминокислот.

СD70-связывающий агент может необязательно включать эффекторный домен антитела, который опосредует или стимулирует реакцию ADCC, ADCP и/или CDC против экспрессирующей CD70 клетки-мишени. Эффекторный(ые) домен(ы) может быть, например, Fc доменом или доменами молекулы Ig. Такой CD70-связывающий агент может оказывать цитотоксическое или цитостатическое действие на экспрессирующие CD70 раковые клетки, или оказывать цитотоксическое, цитостатическое или иммуномодулирующее действие на активированные лимфоциты или дендритные клетки,

например, при лечении экспрессирующего CD70 рака или иммунологического нарушения, соответственно. Как правило, CD70-связывающий агент рекрутирует и/или активирует цитотоксические лейкоциты (например, естественные киллеры (NK), фагоцитирующие клетки (например, макрофаги) и/или компоненты сывороточного комплемента).

Анти-CD70 антитело может быть гуманизированным антителом, одноцепочечным антителом, scFv, диателом, Fab, минителом, scFv-Fc, Fv или подобным. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающая область СD70 может быть присоединена к эффекторному домену или доменам, таким как, например, домены шарнир-С<sub>н</sub>2-С<sub>н</sub>3 иммуноглобулина, или части или фрагменту эффекторного(ых) домена(ов), имеющих эффекторную функцию. Антигенсвязывающие фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать, например, вариабельную(ые) область(и) в комбинации с полным или частью эффекторного домена (например, доменом Сн2 и/или Сн3, отдельно или в комбинации с доменом Сн1, шарниром и/или доменом Сь). Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать любую комбинацию эффекторных доменов. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело может представлять собой одноцепочечное антитело, содержащее CD70-связывающую вариабельную область, присоединенную к доменам шарнир-С<sub>Н</sub>2-С<sub>Н</sub>3.

Эффекторные домены анти-CD70 антитела могут происходить из любого подходящего изотипа иммуноглобулина человека. Например, способность иммуноглобулина человека опосредовать CDC и ADCC/ADCP обычно находится в порядке  $IgM\approx IgG1\approx IgG3>IgG2>IgG4$  и  $IgG1\approx IgG3>IgG2/IgM/IgG4$ , соответственно. CD70-связывающий полипептид может быть экспрессирован в виде рекомбинантного слитого белка, содержащего соответствующие константные домены, для получения желаемой(ых) эффекторной(ых) функции(й). При связывании с клетками-мишенями, анти-CD70 антитела или производные могут запускать in vitro и in vivo разрушение клеток-мишеней посредством эффекторной функции антитела, такой как ADCC, CDC и ADCP.

CD70-связывающий необязательно агент может быть конъюгирован терапевтическим цитотоксический, цитостатический агентом, таким как или иммуномодулирующий Полезные классы цитотоксических агент. или иммуномодулирующих антитубулиновые агентов включают, например, ауристатины, агенты, связывающие малую бороздку ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как иис-платин, моно(платина), бис(платина) и трехядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, сенсибилизаторы химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, предварительно полученные соединения, пуриновые антиметаболиты, пуромицины, радиационные сенсибилизаторы, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и подобные. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет цитотоксический агент. Подходящие цитотоксические агенты включают, например, доластатины (например, ауристатин Е, АГР, ММАГ, ММАЕ), агенты, связывающие малую бороздку ДНК (например, енедиины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), пуромицины, алкалоиды барвинка, CC-1065, SN-38, топотекан, морфолино-доксорубицин, ризоксин, цианоморфолино-доксорубицин, эхиномицин, комбретастатин, нетропсин, эпотилон А и В, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтансиноиды, дискодермолид, элеутеробин и митоксантрон. В конкретных вариантах осуществления, цитотоксический или цитостатический агент представляет собой ауристатин Е (также известный в данной области как доластатин-10) или его производное. Обычно производное ауристатина Е представляет собой, например, сложный эфир, образованный ауристатином Е и кетокислотой. Например, ауристатин Е можно вводить в реакцию с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с образованием AEB и AEVB, соответственно. Другие типовые производные ауристатина включают AFP, MMAF и MMAE. Синтез и структура ауристатина E и его производных описаны в публикациях патентных заявок США №№ 20030083263 и 20050009751), международной патентной заявке № PCT/US03/24209, международной патентной заявке № РСТ/US02/13435 и патентах США №№ 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; и 4,486,414. В конкретных вариантах осуществления, цитотоксический агент представляет собой агент, связывающий малую бороздку ДНК. (См., например, патент США № 6,130,237.) Например, в некоторых вариантах осуществления, агент, связывающий малую бороздку, представляет собой соединение СВІ. В других вариантах осуществления, агент, связывающий малую бороздку, представляет собой енедиин (например, калихеамицин). Примеры антитубулиновых агентов включают, но не ограничены ими, таксаны (например, Taxol® (паклитаксел), Taxotere® (доцетаксел)), T67 (Tularik), алкилоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин) и доластатины (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Другие антитубулиновые агенты включают, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон А и В), нокодазол, колхицин и колцимид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтансиноиды, комбретастатины, дискодермолид и элеутеробин. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксический агент представляет собой майтансиноид, другую группу Например, в конкретных антитубулиновых агентов. вариантах осуществления, майтанзиноид представляет собой майтанзин или DM-1 (ImmunoGen, Inc.; см. также Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело может быть химерным, содержащим человеческую или нечеловеческую Fc участок или ее часть. Например, антитело может включать Fc домен или часть нечеловеческого происхождения, например, грызуна (например, мыши или крысы), осла, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюдовых, лошади, курицы или обезьяны (например, макаки, резуса и подобной).

Анти-CD70-связывающий агент, такой как антитело, может быть моноспецифическим, биспецифическим, триспецифическим более или полиспецифическим. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными к разным эпитопам СD70 и/или могут быть специфичными как к CD70, так и к гетерологичному белку. (См., например, публикации РСТ WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360 и WO 92/05793; Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; патенты США №№ 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; и 5,601,819; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.) Мультиспецифические антитела, включая биспецифические триспецифические антитела, полезные для применения на практике описанных в документе способов, представляют собой настоящем антитела, которые иммуноспецифически связываются и с CD70 (включающие, но не ограниченные ими, антитела, которые имеют CDR моноклонального антитела 1F6), и с вторым рецептором клеточной поверхности или рецепторным комплексом, который опосредует ADCC, ADCP и/или CDC, таким как CD16/FcyRIII, CD64/FcyRI, ингибирующие или активирующие рецепторы киллеров, или белок контроля комплемента СD59. В некоторых вариантах осуществления, связывание части мультиспецифического антитела со второй молекулой клеточной поверхности или рецепторным комплексом может усиливать эффекторные функции анти-CD70 антитела или другого агента, связывающего CD70.

Антитела могут быть получены способами, известными в данной области техники. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием самых разнообразных методов, включая, *например*, использование технологий гибридомы, рекомбинантных и фагового дисплея или их комбинации. Методы гибридомы обычно обсуждаются, например, в Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Quan and Carter, 2002, The rise of monoclonal antibodies as therapeutics in Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu and Fick Jr., eds., Marcel Dekker, New York, NY, Chapter 20, pp. 427-469; Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; заявке РСТ № РСТ/GВ91/01134; публикациях РСТ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и патентах США №№ 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 и 5,969,108 (описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки).

Примеры методов, которые можно использовать для получения одноцепочечных антител, включают таковые, описанные в патентах США 4,946,778 и 5,258,498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203:46-88; Shu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; и Skerra et al., 1988, Science 240:1038-1040.

Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, где две цепи обладают различной специфичностью (*см., например*, Milstein et al., 1983, Nature 305:537-39). Из-за случайного набора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь 10 различных молекул антител, некоторые из которых имеют правильную биспецифическую структуру. Подобные процедуры описаны в международной публикации № WO 93/08829 и в Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-59.

В соответствии с другим подходом, вариабельные домены антител с желаемой специфичностью связывания (сайты объединения антитело-антиген) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние происходит с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим, по меньшей мере, часть шарнирной области, областей С<sub>Н</sub>2 и С<sub>Н</sub>3. В некоторых вариантах осуществления, слияние включает первую константную область тяжелой цепи (С<sub>н</sub>1), содержащую сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующий, по меньшей мере, в одном из слияний. Нуклеиновые кислоты с последовательностями, кодирующими гибриды тяжелых цепей иммуноглобулина и, при желании, легкую цепь иммуноглобулина, встраивают в отдельные векторы экспрессии и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в регулировании взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в вариантах осуществления, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Однако возможно кодирующие вставить последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия, по меньшей мере, двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам, или когда соотношения не имеют особого значения.

В варианте осуществления этого подхода, биспецифические антитела имеют гибридную тяжелую цепь иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече, и пару гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина и легкой цепи (обеспечивающую вторую специфичность связывания) в другом плече. Эта асимметричная структура облегчает отделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения (*см.*, *например*, международную публикацию № WO 94/04690, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

Для дальнейшего обсуждения биспецифических антител см., например, Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210; Rodrigues et al., 1993, J. Immunology 151:6954-61; Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-67; Carter et al., 1995, J. Hematotherapy 4:463-70; Merchant et al., 1998, Nature Biotechnology 16:677-81. Используя такие методы, можно получить биспецифические антитела для применения в лечении или профилактике заболеваний, как определено в настоящем документе.

Бифункциональные антитела также описаны в публикации европейского патента №

ЕРА 0 105 360. Как описано в этой ссылке, гибридные или бифункциональные антитела могут быть получены либо биологически, *т.е.* методами слияния клеток, либо химически, особенно с использованием поперечно-сшивающих агентов или реагентов, образующих дисульфидные мостики, и могут включать целые антитела или их фрагменты. Способы получения таких гибридных антител описаны, например, в международной публикации WO 83/03679 и публикации европейского патента № ЕРА 0 217 577, обе которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, каркасные остатки в каркасных областях человека будут заменены соответствующим остатком из CDR донорного антитела для изменения, предпочтительно, улучшения связывания антигена. Эти замены каркаса идентифицируют способами, хорошо известными в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и остатков каркаса для идентификации остатков каркаса, важных для связывания антигена, и сравнения последовательностей для выявления необычных остатков каркаса в конкретных положениях. (См., например, патент США № 5,585,089; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323). Антитела могут быть гуманизированы с применением множества методик, известных в данной области техники, включая, например, прививки CDR (см., например, EP 0 239 400; публикацию PCT WO 91/09967; патенты США №№ 5,225,539; 5,530,101; и 5,585,089), венирование или перекладку (см., например, EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973), и перестановку цепей (см., например, патент США № 5,565,332) (все эти ссылки включены в настоящий документ посредством ссылки).

Гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены способами рекомбинантной ДНК. известными в данной области техники, использованием способов, описанных в международной публикации № WO 87/02671; публикации европейского патента № 0 184 187; публикации европейского патента № 0 171 496; публикации европейского патента № 0 173 494; международной публикации № WO 86/01533; патенте США № 4,816,567; публикации европейского патента № 0 012 023; Berter et al., 1988, Science 240:1041-43; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-43; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-26; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-18; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-59; Morrison, 1985, Science 229:1202-07; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; U.S. Patent No. 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-25; Verhoeyan et al., 1988, Science 239:1534; and Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-60; каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Как указано *выше*, CD70 связывающий агент, может быть производным анти-CD70 антитела. Как правило, производное анти-CD70 антитела содержит анти-CD70 антитело (включая, *например*, антигенсвязывающий фрагмент или консервативно замещенные

полипептиды) и, по меньшей мере, одну полипептидную область или другую группу, анти-CD70 антителу. Например, гетерологичную анти-CD70 антитело модифицировать, например, путем ковалентного присоединения любого типа молекулы. Типовые модификации включают, например, гликозилирование, ацетилирование, пэгилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление, связывание с клеточным лигандом (например, альбуминсвязывающей молекулой) или другим белком и Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными методами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д.

В некоторых вариантах осуществления, ковалентное присоединение не влияет на эффекторную функцию, *например*, предотвращает специфическое связывание производного антитела с CD70 через антигенсвязывающую область или полученную из нее область, или эффекторные домены от специфического связывания Fc рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, производное антитела представляет собой мультимер, такой как, например, димер, содержащий один или более мономеров, где каждый мономер включает (i) антигенсвязывающую область анти-CD70 антитела или полученную из него полипептидную область (например, путем консервативной замены нескольких аминокислот) и (ii) мультимеризующуюся (например, одной димеризующуюся) полипептидную область, так что производное антитела образует мультимеры (например, гомодимеры), которые специфически связываются с CD70. В типовых вариантах осуществления, антигенсвязывающая область анти-СD70 антитела, или полипептидная область, полученная из него, рекомбинантно или химически сливается с гетерологичным белком, где гетерологичный белок содержит домен димеризации или мультимеризации. Перед введением производного антитела субъекту с целью лечения или иммунологических нарушений профилактики или раковых заболеваний, экспрессирующих CD70, производное подвергают воздействию **условий**, обеспечивающих образование гомодимера или гетеродимера. Используемый в настоящем документе гетеродимер может содержать идентичные домены димеризации, но разные CD70 антигенсвязывающие области, идентичные CD70 антигенсвязывающие области, но разные домены димеризации, или разные CD70 антигенсвязывающие области и домены димеризации.

Типовыми доменами димеризации являются такие, которые происходят от факторов транскрипции. В одном варианте осуществления, домен димеризации представляет собой домен основной области лейциновой молнии («bZIP») (см. Vinson et al., 1989, Science 246:911-916). Полезные домены лейциновой молнии включают, например, домены фактора транскрипции дрожжей GCN4, фактора транскрипции млекопитающих CCAAT/энхансер-связывающего белка C/EBP и ядерной трансформации в продуктах онкогена, Fos и Jun (см., например, Landschultz et al., 1988, Science 240:1759-

64; Baxevanis and Vinson, 1993, Curr. Op. Gen. Devel. 3:278-285; O'Shea et al., 1989, Science 243:538-542). В другом варианте осуществления, домен димеризации представляет собой домен белка основной области спираль-петля-спираль («bHLH»). (См., например, Murre et al., 1989, Cell 56:777-783. См. также Davis et al., 1990, Cell 60:733-746; Voronova and Baltimore, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4722-26). Особенно полезными белками hHLH являются тус, так и тас.

В других вариантах осуществления, домен димеризации представляет собой константную область иммуноглобулина, такую как, например, константная область тяжелой цепи или ее домен (*например*,  $C_{H1}$  домен,  $C_{H2}$  домен и/или  $C_{H3}$  домен). (*См., например*, патенты США №№ 5,155,027; 5,336,603; 5,359,046; и 5,349,053; EP 0367166 и WO 96/04388.)

Известно, что гетеродимеры образуются между Fos и Jun (Bohmann et al., 1987, Science 238:1386-1392), среди членов семейства ATF/CREB (Hai et al., 1989, Genes Dev. 3:2083-2090), среди членов семейства C/EBP (Cao et al., 1991, Genes Dev. 5:1538-52; Williams et al., 1991, Genes Dev. 5:1553-67; Roman et al., 1990, Genes Dev. 4:1404-15), и между членами семейств ATF/CREB и Fos/Jun (Hai and Curran, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3720-24). Следовательно, когда CD70-связывающий белок вводят субъекту в виде гетеродимера, содержащего разные домены димеризации, можно использовать любую комбинацию вышеуказанных.

В других вариантах осуществления, производное анти-CD70 антитела представляет собой анти-CD70 антитело, конъюгированное со вторым антителом («гетероконъюгат антитела») (см., например, патент США № 4,676,980). Гетероконъюгаты, применимые для применения способов по настоящему изобретению, включают антитело, которое связывается с CD70 (например, антитело, имеющее CDR и/или тяжелые цепи моноклонального антитела 1F6), и антитело, которое связывается с поверхностным рецептором или рецепторным комплексом, который опосредует ADCC, фагоцитоз и/или CDC, такие как CD16/FcgRII, CD64/FcgRI, рецепторы, активирующие или ингибирующие клетки-киллеры, или белок контроля комплемента CD59. В типовом варианте осуществления, связывание части мультиспецифического антитела со второй молекулой клеточной поверхности или рецепторным комплексом усиливает эффекторные функции анти-CD70 антитела. В других вариантах осуществления, антитело может представлять собой терапевтический агент. Подходящие терапевтические агенты на основе антител описаны в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, любое из анти-CD70 антител, описанных в настоящем документе, не является фукозилированным.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена популяция анти-CD70 антител, содержащая множество анти-CD70 антител, как описано в настоящем документе, где анти-CD70 антитела в популяции анти-CD70 антител имеют сниженное коровое фукозилирование. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 20% антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового

фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 30% антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 40% антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% антител в популяции анти-СD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 60% антител в популяции антител к CD70 не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 70% антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 80% антител в популяции антител к СD70 не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% антител в популяции антител к СD70 не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 95% антител в популяции анти-СD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 98% антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 99% антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей 99,5% антител в популяции анти-СD70 антител не имеют фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, по существу ни одно (т.е. менее 0,5%) антител в популяции анти-СD70 антител не имеет корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, все антитела в популяции анти-СD70 антител не имеют корового фукозилирования.

Как описано в патенте США № 10,196,445, модификация гликозилирования антитела может быть осуществлена, например, путем экспрессии антитела в клеткехозяине с измененным механизмом гликозилирования. Описаны клетки с измененным механизмом гликозилирования, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела по настоящему изобретению, чтобы тем самым продуцировать антитело с измененным гликозилированием. Например, в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (α-(1,6)фукозилтрансфераза) (см. публикацию заявки на патент США № 20040110704; Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol. Bioeng. 87: 614), так что антитела, экспрессированные в этих клеточных линиях, не имеют фукозу на своих углеводах. В качестве другого примера, в ЕР 1176195 также описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, а также клеточные линии, которые обладают незначительной активностью или вообще не имеют активности в отношении добавление фукозы к Nацетилглюкозамину, который связывается с Fc областью антитела, например, клеточная линия миеломы крыс YB2/0 (ATCC CRL 1662). В публикации PCT WO 03/035835 описан вариант клеточной линии СНО, Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине. См. также Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733. Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также могут быть получены в куриных яйцах, как описано в Публикации РСТ № WO 2006/089231. Альтернативно, антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут быть получены в растительных клетках, таких как Lemna. См., например, публикацию США № 2012/0276086. В публикации РСТ № WO 99/54342 описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликозилтрансфераз, модифицирующих гликопротеин (например, бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют повышенные GlcNac в точках ветвления, что приводит к увеличению ADCC активности антител. См. также Umaña et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176. Альтернативно, остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с использованием фермента фукозидазы. Например, фермент альфа-L-фукозидаза удаляет остатки фукозила из антител. Tarentino et al. (1975) Biochem. 14:5516. Антитела со сниженным коровым фукозилированием могут быть получены путем продуцирования антител в клеточных линиях, которые были сконструированы для уменьшения корового фукозилирования с использованием нокаутов генов, нокинов генов или РНКи. Низкомолекулярные ингибиторы, которые действуют на ферменты пути гликозилирования, также могут быть использованы для получения антител со сниженным коровым фукозилированием. Такие способы описаны в патенте США № 8,163,551. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитела, описанные в настоящем документе, со сниженным коровым фукозилированием, получают путем культивирования клетки-хозяина, экспрессирующей антитела, в культуральной среде, содержащей эффективное количество аналога фукозы, которое снижает включение фукозы в комплекс, N-гликозид-связанных сахарных цепей антител или производных продуцируемых клеткой-хозяином. См. патент США № 8,163,551. Способы получения нефукозилированных антител также описаны у Pereira et al. (2018) MAbs 10(5):693-711.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело или его производное конкурентно ингибирует связывание mAb 1F6 с CD70, что определяется любым известным в данной области способом определения конкурентного связывания (таким как, *например*, иммуноанализы, описанные в настоящем документе). В типовых вариантах осуществления, антитело конкурентно ингибирует связывание 1F6 с CD70, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70% или, по меньшей мере, на 75%. В других вариантах осуществления, антитело конкурентно ингибирует связывание 1F6 с CD70, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95%.

Антитела можно анализировать на специфическое связывание с CD70 любым из различных известных способов. Иммуноанализы, которые могут быть использованы, включают, например, конкурентные и неконкурентные системы анализа с использованием таких методов, как вестерн-блоты, радиоиммуноанализы, ELISA (иммуноферментный анализ), «сэндвич»-иммуноанализы, анализы иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции диффузной преципитации в геле, иммунодиффузионные анализы,

анализы агглютинации, анализы фиксации комплемента, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммуноанализы и иммуноанализы белка А. Такие анализы являются обычными и хорошо известны в данной области техники. (См., например, Ausubel et al., eds., Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., New York, 4th ed. 1999); Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999).

Кроме того, с помощью анализов конкурентного связывания можно определить аффинность связывания антитела с CD70 и скорость диссоциации взаимодействия антитела с CD70. Одним из примеров анализа конкурентного связывания является радиоиммуноанализ, включающий инкубацию меченого CD70 (*например*, <sup>3</sup>H или <sup>125</sup>I) с представляющим интерес антителом в присутствии возрастающих количеств немеченого CD70, и обнаружение антитела, связанного с меченым CD70. Аффинность анти-CD70 антитела и скорость диссоциации связывания затем можно определить по данным с помощью анализа графика Скэтчарда. Конкуренцию со вторым антителом (таким как, например, mAb 1F6) также можно определить с помощью радиоиммуноанализа. В этом случае, СD70 инкубируют с представляющим интерес антителом, конъюгированным с меченым соединением (*например*, <sup>3</sup>H или <sup>125</sup>I) в присутствии возрастающих количеств немеченого второго антитела. Альтернативно, аффинность связывания антитела с CD70 и скорости ассоциации и диссоциации взаимодействия антитело-СD70 можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитела или их производные могут таргетировать мембрану клеток, экспрессирующих СD70, и накапливаться на ней.

Анти-CD70 антитела и их производные могут быть получены способами, известными в данной области техники для синтеза белков, обычно, например, методами рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантная экспрессия антитела или его производного, которое связывается с СD70, обычно включает создание вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его производное. Вектор для продуцирования белковой молекулы может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, известных в данной области техники. Стандартные методы, такие как, например, описаны в Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3rd ed., 2001); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2nd ed., 1989); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York, 4th ed., 1999); и Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press, Washington, D.C., 2nd ed., 1998) могут быть использованы для способов рекомбинантных нуклеиновых кислот, синтеза нуклеиновых кислот, клеточных культур, включения трансгенов и экспрессии рекомбинантных белков.

Например, для рекомбинантной экспрессии анти-CD70 антитела, вектор экспрессии может кодировать его тяжелую или легкую цепь или вариабельный домен

тяжелой или легкой цепи, функционально связанный с промотором. Вектор экспрессии может включать, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, публикацию РСТ WO 86/05807; публикацию РСТ WO 89/01036 и патент США № 5,122,464), и вариабельный домен антитела может быть клонирован в такой вектор для экспрессии всей тяжелой или легкой цепи. Вектор экспрессии переносят в клетку-хозяин обычными методами, и трансфицированные клетки затем культивируют обычными методами для получения анти-СD70 антитела. В типовых вариантах осуществления экспрессии двухцепочечных антител, векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина.

Для экспрессии анти-CD70 антитела или его производного можно использовать различные прокариотические и эукариотические системы хозяин - вектор экспрессии. Как правило, для экспрессии рекомбинантного белка используют эукариотические клетки, особенно для цельных молекул рекомбинантного анти-CD70 антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент основного промежуточного раннего гена цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии для продуцирования анти-CD70 антител и их производных (см., например, Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).

Другие системы хозяин - вектор экспрессии включают, например, системы экспрессии на основе плазмид в бактериальных клетках (см., например, Ruther et al., 1983, EMBO 1,2:1791; Inouye and Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke and Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); системы насекомых, такие как, например, использование вектора экспрессии вируса ядерного полиэдроза Autographa californica (AcNPV) в клетках Spodoptera frugiperda; и системы экспрессии на основе вирусов в клетках млекопитающих, такие как, например, системы на основе аденовирусов (см., например, Logan and Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359; Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт желаемым специфическим образом. Подходящие клеточные линии или системы-хозяева могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессирования (например, гликозилирования, фосфорилирования и расщепления) экспрессируемого белка. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для надлежащего процессирования первичного транскрипта и продукта гена. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, например, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3Т3 и W138.

Стабильная система экспрессии обычно используется для долговременного высокопроизводительного продуцирования рекомбинантного анти-CD70 антитела или его производного или другого CD70-связывающего агента. Например, клеточные линии,

которые стабильно экспрессируют анти-СD70 антитело или его производное, можно сконструировать путем трансформации клеток-хозяев ДНК, контролируемой соответствующими элементами контроля экспрессии (например, промоторными и терминаторами энхансерными последовательностями, транскрипции, сайтами полиаденилирования) селектируемым маркером., последующим И ростом трансформированных клеток в селективной среде. Селектируемый маркер придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать ДНК в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены в клеточные линии. Можно использовать ряд систем например, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса, селекции, включая, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы И аденинфосфорибозилтрансферазы, которые можно использовать в клетках tk, hgprt или aprt, соответственно. Кроме того, резистентность к антиметаболитам может быть использована в качестве основы для селекции следующих генов: dhfr, придающий резистентность к метотрексату; gpt, придающий резистентность к микофеноловой кислоте; пео, придающий резистентность к аминогликозиду G-418; и hygro, придающий резистентность к гигромицину. Способы, широко известные в области технологии рекомбинантных ДНК, могут быть обычным образом применены для выбора желаемого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. eds., John Wiley and Sons, N.Y., 1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, N.Y., 1990); Current Protocols in Human Genetics (Dracopoli et al. eds., John Wiley and Sons, N.Y., 1994, Chapters 12 and 13); и Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1.

Уровни экспрессии антитела или производного могут быть повышены путем векторной амплификации. (См. в целом, например, Bebbington and Hentschel, The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Когда маркер в векторная система, экспрессирующая анти-CD70 антитело или его производное, является амплифицируемой, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуральной среде клеток-хозяев, будет отбирать клетки-хозяева, которые имеют повышенное число копий маркерного гена, придающего резистентность к ингибитору. Число копий ассоциированного гена антитела также будет увеличиваться, тем самым увеличивая экспрессию антитела или его производного (см. Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

Если анти-CD70 антитело содержит как тяжелую, так и легкую цепь или их клетка-хозяин может быть котрансфицирована производные, двумя экспрессии, первым вектором, кодирующим белок тяжелой цепи, и вторым вектором, кодирующим белок легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию белков тяжелой и легкой цепей. Альтернативно, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать белки как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях, легкая цепь обычно располагается перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка нетоксичной тяжелой цепи (*см.* Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Кодирующие последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

После получения анти-CD70 антитела или его производного (например, с помощью животного, химического синтеза или рекомбинантной экспрессии), его можно очистить любым подходящим способом очистки белков, включая, например, хроматографию (например, ионообменную или аффинную хроматографию (такую как, например, хроматография с белком А для очистки антител, имеющих интактную Fc область)), центрифугирование, дифференциальную растворимость или любую другую стандартную методику очистки белков. Анти-CD70 антитело или его производное можно, например, слить с маркерной последовательностью, такой как пептид, для облегчения очистки с хроматографии. Подходящие маркерные помощью аффинной аминокислотные последовательности включают, например, гексагистидиновый пептид, такой как метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA, 91311), и «НА» метка, которая соответствует производному от эпитопа из белка гемагглютинина гриппа (Wilson et al., 1984, Cell 37:767) и метки «flag».

Как только получено анти-CD70 антитело или его производное, его способность оказывать цитостатическое или цитотоксическое действие на экспрессирующие CD70 раковые клетки или иммуномодулирующее действие на экспрессирующие CD70 иммунные клетки определяют способами, описанными *ниже*, или известными в данной области техники.

Чтобы минимизировать активность анти-CD70 антитела вне активированных иммунных клеток или CD70-экспрессирующих раковых клеток, можно использовать антитело, которое специфически связывается с CD70, связанным с клеточной мембраной, но не с растворимым CD70, так что анти-CD70 антитело концентрируется на клеточной поверхности активированной иммунной клетки или раковой клетки, экспрессирующей CD70.

Как правило, анти-CD70 антитело или производное является по существу очищенным (*например*, в значительной степени свободным от веществ, которые ограничивают его действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело или его производное имеют чистоту, по меньшей мере, примерно 40%, чистоту, по меньшей мере, примерно 50% или чистоту, по меньшей мере, примерно 60%. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело или его производное имеет, по меньшей мере, приблизительно 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, или 95-98% чистоту. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело или его производное имеют чистоту примерно 99%.

## III. Способы лечения

Изобретение относится к способам лечения экспрессирующих CD70 раков, таких как миелоидные злокачественные новообразования, у субъекта, включающим введение

субъекту терапевтически эффективного количества анти-СD70 антитела, такого как нефукозилированное анти-СD70 антитело, как описано в настоящем документе. Миелоидные злокачественные новообразования включают острый миелоидный лейкоз (AML), миелопролиферативные заболевания (MPDS), миелодиспластический синдром (MDS) и миелодиспластические/миелопролиферативные синдромы, все которые являются злокачественными нарушениями клональных стволовых клеток предшественников. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой MDS. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой AML. MDS охватывает несколько подтипов, в том числе MDS с однолинейной дисплазией, MDS с кольцевыми сидеробластами, MDS с мультилинейной дисплазией, MDS с избытком бластов, MDS с изолированной del(5q) и MDS, не поддающийся классификации. MDS характеризуется неэффективным гепомоэзом в одном или нескольких линиях клеток костного мозга. Ранний MDS чаще всего демонстрирует избыточный апоптоз гемопоэтических клеток. Примерно у трети пациентов с MDS этот неэффективный гемопоэз предшествует прогрессированию вторичного AML (sAML). AML представляет собой злокачественную опухоль миелоидной клеточной линии лейкоцитов. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества нефукозилированного анти-CD70 антитела, где анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определены по схеме нумерации Kabat, и Fc домен. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-СD70 антител, где, по меньшей мере, 30% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-СD70 антител, где, по меньшей мере, 40% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-CD70 антител, где, по меньшей мере, 50% анти-CD70 антител в популяции анти-СD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-CD70 антител, где, по меньшей мере, 60% анти-СD70 антител в популяции анти-СD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-СD70 антител, где, по меньшей мере, 70% анти-СD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-CD70 антител, где, по меньшей мере, 80% анти-CD70 антител в популяции антиантител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-CD70 антител, где, по меньшей мере, 90% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает

введение субъекту популяции анти-СD70 антител, где, по меньшей мере, 95% анти-СD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-CD70 антител, где, по меньшей мере, 98% анти-CD70 антител в популяции анти-СD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-CD70 антител, где, по меньшей мере, 99% анти-СD70 антител в популяции анти-СD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту популяции анти-СD70 антител, где, по меньшей мере, 99,5% анти-СD70 антител в популяции анти-CD70 антител не имеют корового фукозилирования. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с гипометилирующим агентом (НМА). В некоторых вариантах осуществления, НМА представляет собой азацитидин. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с миметиком ВНЗ. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело вводят в комбинации с венетоклаксом (VENCLEXTA®). В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с НМА и миметиком ВН3. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело вводят в комбинации с НМА и венетоклаксом. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с азацитидином и ВН3-миметиком. В некоторых вариантах осуществления, анти-СD70 антитело вводят в комбинации с азацитидином и венетоклаксом.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлен способ лечения MDS, экспрессирующего CD70, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело является нефукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, MDS представляет собой рецидивирующий или не поддающийся лечению MDS. В некоторых вариантах осуществления, MDS представляет собой рецидивирующий MDS. В некоторых вариантах осуществления, MDS представляет собой не поддающийся лечению MDS. В некоторых вариантах осуществления, субъект не достиг результата после предшествующей терапии MDS гипометилирующим агентом (HMA). HMA (также известный как деметилирующий агент) представляет собой препарат, который ингибирует метилирование ДНК. В некоторых вариантах осуществления, HMA представляет собой ингибитор ДНК метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления, HMA представляет собой децитабин.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлен способ лечения экспрессирующего CD70 AML у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD70 антитело является нефукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, AML представляет собой

рецидивирующий или не поддающийся лечению AML. В некоторых вариантах осуществления, AML представляет собой рецидивирующий AML. В некоторых вариантах осуществления, AML представляет собой не поддающийся лечению AML. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил 1 схему лечения для лечения AML. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил 2 схемы лечения для лечения AML. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил 3 схемы лечения для лечения AML. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил 3 схемы лечения для лечения AML.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, примерно 0,1%, по меньшей мере, примерно 1%, по меньшей мере, примерно 2%, по меньшей мере, примерно 3%, по меньшей мере, примерно 4%, по меньшей мере, примерно 5%, по меньшей мере, примерно 6%, по меньшей мере, примерно 7%, по меньшей мере, примерно 8%, по меньшей мере, примерно 9%, по меньшей мере, примерно 10%, по меньшей мере, примерно 15%, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 25%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 35%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 45%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70% или по меньшей мере, примерно 80% раковых клеток субъекта экспрессируют СD70. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 0,1%, по меньшей мере, 1%, по меньшей мере, 2%, по меньшей мере, 3%, по меньшей мере, 4%, по меньшей мере, 5%, по меньшей мере, 6%, по меньшей мере, 7%, по меньшей мере, 8%, при по меньшей мере, 9%, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 15%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 45%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70% или по меньшей мере, 80% раковых клеток субъекта экспрессируют СD70. В некоторых вариантах осуществления, долю клеток, экспрессирующих CD70, определяют c помощью иммуногистохимии (IHC). В некоторых вариантах осуществления, долю клеток, экспрессирующих СD70, определяют с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, долю клеток, экспрессирующих CD70, определяют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

В одном аспекте, способ лечения рака анти-CD70 антителом, описанный в настоящем документе, приводит к улучшению одного или нескольких терапевтических эффектов у субъекта после введения антитела, по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления, один или более терапевтических эффектов представляют собой объективную частоту ответа, продолжительность ответа, время до ответа, выживаемость без прогрессирования, общую выживаемость или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления, один или более терапевтических эффектов представляют собой стабильное заболевание. В одном варианте осуществления, один или более терапевтических эффектов представляют собой частичный ответ. В одном варианте осуществления, один или более терапевтических эффектов представляют собой полный ответ. В одном варианте осуществления, один или более терапевтических

эффектов представляют собой объективную скорость ответа. В одном варианте осуществления, один или более терапевтических эффектов представляют собой продолжительность ответа. В одном варианте осуществления, один или более терапевтических эффектов представляют собой время до ответа. В одном варианте осуществления, одним или несколькими терапевтическими эффектами является выживаемость без прогрессирования. В одном варианте осуществления, одним или несколькими терапевтическими эффектами является общая выживаемость. В одном варианте осуществления, один или более терапевтических эффектов представляют собой регрессию рака.

В одном варианте осуществления способов или применений или продукта для применений, представленных в настоящем документе, ответ на лечение анти-CD70 антителом, как описано в настоящем документе, может включать следующие критерии (критерии Чесона):

<u>Срок</u>	Определение (все критерии должны быть соблюдены, если не	
	<u>указано иное)<sup>а</sup></u>	
Морфологическая	Абсолютное количество нейтрофилов (ANC) ≥1000/мкл и	
полная ремиссия	тромбоцитов ≥100000/мкл без переливания и/или поддержки	
(CR)	экзогенным фактором роста (т. е. без переливания или экзогенного	
	фактора роста в течение 7 дней после оценки).	
	Костный мозг с <5% бластов	
	Нет признаков экстрамедуллярного заболевания	
Морфологическая	CRi(p)	
полная ремиссия с	(морфологическая CR с неполным восстановлением тромбоцитов)	
неполным	Костный мозг с <5% бластов	
восстановлением	Тромбоциты <100000/мкл или ≥100000/мкл, если субъекту	
формулы крови	переливали кровь в течение последних 7 дней	
(CRi)	ANC ≥1000/мкл без поддержки экзогенного фактора роста	
	Нет признаков экстрамедуллярного заболевания	
	CRi(n)	
	(морфологическая CR с неполным восстановлением нейтрофилов)	
	Костный мозг с <5% бластов	
	ANC <1000/мкл или ANC ≥1000/мкл с использованием экзогенных	
	факторов роста в последние 7 дней	
	Тромбоциты ≥100000/мкл без переливания за последние 7 дней	
	Нет признаков экстрамедуллярного заболевания	

Морфологическая	Костный мозг с <5% бластов, ANC >500/мкл и тромбоцитами	
полная ремиссия с	≥50000/мкл без переливаний и/или поддержки экзогенным	
частичным	фактором роста в течение последних 7 дней без квалификации как	
гематологическим	полная CR	
восстановлением	Нет признаков экстрамедуллярного заболевания	
(CRh)		
Морфологическое	Костный мозг c <5% бластов	
свободное от	Нет признаков экстрамедуллярного заболевания	
лейкоза состояние	Критерии восстановления анализа крови не соблюдены для CR,	
(mLFS)	CRi или CRh	
Частичная	ANC ≥1000/мкл и тромбоциты ≥100000/мкл без переливаний и/или	
ремиссия (PR)	поддержка экзогенным фактором роста (т. е. отсутствие	
	переливания или экзогенного фактора роста в течение 7 дней	
	оценки).	
	Костный мозг с содержанием бластов от 5% до 25% и, по меньшей	
	мере, 50% снижением бластов костного от исходного уровня	
	Нет признаков экстрамедуллярного заболевания	
Противолейкозный	Снижение количества бластов в костном мозге >25% по	
эффект	сравнению с исходным уровнем, и критерии PR не соблюдены	
Стабильное	Отсутствие CR, CRi, CRh, mLFS, PR или противолейкозного	
заболевание (SD)	эффекта. Критерии прогрессирующего заболевания (PD) не	
	соблюдены	
Прогрессирующее	>25% абсолютное увеличение доли бластов костного мозга по	
заболевание (PD)	сравнению с исходным уровнем или появление нового	
	экстрамедуллярного заболевания после 4 или более циклов	
	лечения. У субъектов с исходным уровнем бластов в костном	
	мозге >75% пропорциональное (вместо абсолютного) увеличение	
	количества бластов в костном мозге на 25% считается PD.	
Рецидив из	Повторное появление бластов в крови (если это не соответствует	
CR/CRi/CRh	регенерации костного мозга) или в костном мозге (>5%), или в	
	любом экстрамедуллярном сайте после достижения CR, CRi или	
	CRh	
	1	

а Модифицировано на основе пересмотренных рекомендаций Международной рабочей группы по диагностике, стандартизации критериев ответа, результатов лечения и стандартов отчетности для терапевтических испытаний при остром миелоидном лейкозе

(Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Lowenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD (2003). Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 21(24): 4642-9).

В одном варианте осуществления способов или применений или продукта для применений, представленных в настоящем документе, ответ на лечение анти-CD70 антителом, как описано в настоящем документе, может включать следующие критерии (критерии Чесона):

(критерии Чесона):		
<u>Категория</u>	Критерии ответа (ответы должны длиться по меньшей мере, 4	
	недель)	
Полная ремиссия	Костный мозг ≤5% миелобластов с нормальным созреванием всех	
	клеточных линий*	
	Будет отмечена стойкая дисплазия*†	
	Периферическая кровь‡	
	Hgb≥11 г/дл	
	Тромбоциты $\ge$ 100 х10 $^9$ /л	
	Нейтрофилы ≥1,0 х10 <sup>9</sup> /л†	
	Бласты 0%	
Частичная	Все критерии CR, если аномальные до лечения, за исключением:	
ремиссия	Количество бластов в костном мозге уменьшено на ≥50% по	
	сравнению с показателем до лечения, но все еще >5%	
	Клеточность и морфология не важны	
СR костного мозга†	Костный мозг: ≤5% миелобластов и уменьшение на ≥50% по	
	сравнению с показателем до лечения ф	
	Периферическая кровь: если HI ответы, они будут отмечены в	
	дополнение к CR костного мозга†	
Стабильное	Недостижение, по меньшей мере, PR, но отсутствие признаков	
заболевание	прогрессирования в течение >8 недель	
Недостижение	Смерть во время лечения или прогрессирование заболевания,	
результата	характеризующееся ухудшением цитопений, увеличением доли	
	бластов костного мозга или прогрессирование к более	
	продвинутому подтипу MDS FAB, чем до лечения	
l		

Рецидив после CR	По меньшей мере, 1 из следующего:
или PR	Возвращение к доле бластов костного мозга до лечения
	Снижение ≥50% от максимальных уровней ремиссии/ответа в
	гранулоцитах или тромбоцитах
	Снижение концентрации Hgb на ≥1,5 г/дл или зависимость от
	переливания
Цитогенетический	Полный
ответ	Исчезновение хромосомной аномалии без появления новых
	Частичный
	По меньшей мере, 50% уменьшение хромосомной аномалии
Прогрессирование	Для субъектов с:
заболевания	Менее 5% бластов: ≥50% увеличение количества бластов до >5%
	бластов
	5%-10% бластов: ≥50% увеличение количества бластов до >10%
	бластов
	10%-20% бластов: ≥50% увеличение количества бластов до >20%
	бластов
	20%-30% бластов: ≥50% увеличение количества бластов до >30%
	бластов
	Любое из следующего:
	По меньшей мере, 50% снижение от максимальной
	ремиссии/ответа в гранулоцитах или тромбоцитах
	Снижение Hgb на ≥2 г/дл
	Зависимость от переливания
Выживание	Конечные точки:
	Общее: смерть от любой причины
	Бессобытийное: недостижение результата или смерть по любой
	причине
	PFS: прогрессирование заболевания или смерть от MDS
	DFS: время до рецидива
	Смертность по причине смерти: смерть, связанная с MDS

Исключения из критериев ответа IWG не показаны.

Чтобы перевести гемоглобин из граммов на децилитр в граммы на литр, умножьте граммы на децилитр на 10. MDS указывает на миелодиспластические синдромы; Hgb, гемоглобин; CR, полная ремиссия; HI, гематологическое улучшение; PR, частичная

ремиссия; FAB, франко-американо-британская система; PFS, выживаемость без прогрессирования; DFS, безболезненная выживаемость.

- \* При диспластических изменениях следует учитывать нормальный диапазон диспластических изменений (модификацию). (Ramos F, Fernandez-Ferrero S, Suarez D, et al. Myelodysplastic syndrome: a search for minimal diagnostic criteria. Leuk Res. 1999;23:283-290)
  - † Изменение критериев ответа IWG.
- ‡ В некоторых случаях протокольная терапия может потребовать начала дальнейшего лечения (например, консолидация, поддерживающая терапия) до 4-недельного периода. Такие субъекты могут быть включены в категорию ответа, к которой они относились на момент начала терапии. Временные цитопении во время повторных курсов химиотерапии не следует рассматривать как нарушающие стойкость ответа, если они восстанавливаются до улучшенных показателей предыдущего курса. (Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, Pinto A, Beran M, de Witte TM, Stone RM, Mittelman M, Sanz GF, Gore SD, Schiffer CA, Kantarjian H (2006). Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood 108(2): 419-25).

Гематологическое улучшение<sup>а</sup> Критерии ответа (ответы должны длиться, по меньшей мере, 8 недель)<sup>b</sup> Увеличение Hgb на ≥1,5 г/дл Эритроидный ответ (до лечения, <11 г/дл) Соответствующее сокращение единиц переливаний RBC на абсолютное число? по меньшей мере, 4 переливаний RBC за 8 недель по сравнению с количеством переливаний до лечения в предыдущие 8 недель. Только переливания RBC, выполненные при уровне Hgb ≤9,0 г/дл до лечения будут учитываться при оценке ответа на переливание RBC Абсолютное увеличение  $\ge 30 \times 10^9$ /л для субъектов, Ответ тромбоцитов (до лечения,  $<100\times10^{9}/\pi$ ) начиная с  $> 20 \times 10^9 / л$  тромбоцитов Увеличение  $c < 20 \times 10^9 / \pi$  до  $> 20 \times 10^9 / \pi$  и, по меньшей мере, 100%<sup>b</sup> Ответ нейтрофилов (до лечения, По меньшей мере, 100% увеличение и абсолютное  $<1,0\times10^9/\pi$ ) увеличение  $> 0.5 \times 10^9 / \pi^b$ Прогрессирование или рецидив По меньшей мере, 1 из следующего: после HI<sup>c</sup> По меньшей мере, 50% снижение от уровней максимального ответа в гранулоцитах или

тромбоцитах
Снижение Hgb на ≥1,5 г/дл
Зависимость от переливаний

RBC=эритроцит

- а Предварительное лечение подсчитывает среднее значение, по меньшей мере, 2 измерений (не подверженных влиянию переливаний) с интервалом  $\geq 1$  недели (модификация).
  - b Изменение критериев ответа IWG.
- с При отсутствии других объяснений, таких как острая инфекция, повторные курсы химиотерапии (модификация), желудочно-кишечное кровотечение, гемолиз и так далее. Рекомендуется сообщать о 2 типах эритроидного и тромбоцитарного ответа в целом, а также по индивидуальному типу ответа (Cheson 2006).

В одном варианте осуществления способов или применений или продукта для применений, предложенных в настоящем документе, эффективность лечения анти-CD70 антителом, как описано в настоящем документе, оценивают путем измерения объективной частоты ответов. В некоторых вариантах осуществления, объективная частота ответов представляет собой долю пациентов с уменьшением размера опухоли на заданную величину и в течение минимального периода времени. В некоторых вариантах осуществления, объективная частота ответов основана на критериях Чесона. В одном варианте осуществления частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 25%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 35%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 45%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70% или по меньшей мере, примерно 80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 20%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 30%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет по меньшей мере, приблизительно 40%-80%. В одном варианте осуществления частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 50%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет по меньшей мере, примерно 60%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 70%-80%. В одном варианте осуществления частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 85%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 90%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 95%. В одном варианте осуществления частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, примерно 98%. В одном варианте осуществления, частота объективных

ответов составляет, по меньшей мере, примерно 99%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 45%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 20%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 30%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 40%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 50%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 60%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 70%-80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 80%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 85%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 90%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 95%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 98%. В одном варианте осуществления, частота объективных ответов составляет, по меньшей мере, 99%. В одном варианте осуществления, объективная частота ответов составляет 100%.

В одном варианте осуществления способов или применений или продукта для применений, предложенных в настоящем документе, ответ на лечение анти-CD70 антителом, как описано в настоящем документе, оценивают путем измерения времени выживаемости без прогрессирования после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования заболевания, составляющую, по меньшей мере, примерно 1 месяц, по меньшей мере, примерно 2 месяца, по меньшей мере, примерно 3 месяца, по меньшей мере, примерно 4 месяца, по меньшей мере, примерно 5 месяцев, по меньшей мере, примерно 6 месяцев, по меньшей мере, примерно 7 месяцев, по меньшей мере, примерно 8 месяцев, по меньшей мере, примерно 9 месяцев, по меньшей мере, примерно 10 месяцев, по меньшей мере, примерно 11 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере, примерно два года, по меньшей мере, примерно три года, по меньшей мере, примерно четыре года или, по меньшей мере, примерно пять лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, примерно 6 месяцев после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, примерно одного года после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых

вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, примерно двух лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, примерно трех лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, примерно четырех лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, примерно пяти лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования заболевания, составляющую, по меньшей мере, 1 месяц, по меньшей мере, 2 месяца, по меньшей мере, 3 месяца, по меньшей мере, 4 месяца, по меньшей мере, 5 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, по меньшей мере, 7 месяцев, по меньшей мере, 8 месяцев, по меньшей мере, 9 месяцев, по меньшей мере, 10 месяцев, по меньшей мере, 11 месяцев, по меньшей мере, 12 месяцев, по меньшей мере, восемнадцать месяцев, по меньшей мере, двух лет, по меньшей мере, трех лет, по меньшей мере, четырех лет или по меньшей мере, пяти лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования заболевания в течение, по меньшей мере, 6 месяцев после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, одного года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, двух лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, трех лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, четырех лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования в течение, по меньшей мере, пяти лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе.

В одном варианте осуществления способов или применений или продукта для применений, предложенных в настоящем документе, ответ на лечение анти-CD70 антителом, описанным в настоящем документе, оценивают путем измерения времени общей выживаемости после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, общая выживаемость субъекта составляет, по меньшей мере, примерно 1 месяц, по меньшей мере, примерно 2 месяца, по

меньшей мере, примерно 3 месяца, по меньшей мере, примерно 4 месяца, по меньшей мере, примерно 5 месяцев, по меньшей мере, примерно 6 месяцев, по меньшей мере, примерно 7 месяцев, по меньшей мере, примерно 8 месяцев, по меньшей мере, примерно 9 месяцев, по меньшей мере, примерно 10 месяцев, по меньшей мере, примерно 11 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере, примерно два года, по меньшей мере, примерно три года, по меньшей мере, примерно четыре года или, по меньшей мере, примерно пять лет после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость, по меньшей мере, примерно 6 месяцев после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость, по меньшей мере, примерно один год после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость, по меньшей мере, примерно два года после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость, по меньшей мере, примерно три года после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость, по меньшей мере, примерно четыре года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость, по меньшей мере, примерно пять лет после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, общая выживаемость субъекта составляет, по меньшей мере, 1 месяц, по меньшей мере, 2 месяца, по меньшей мере, 3 месяца, по меньшей мере, 4 месяца, по меньшей мере, 5 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, по меньшей мере, 7 месяцев, по меньшей мере, 8 месяцев, по меньшей мере, 9 месяцев, по меньшей мере, 10 месяцев, по меньшей мере, 11 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, восемнадцать месяцев, по меньшей мере, два года, по меньшей мере, три года, по меньшей мере, четыре года или, по меньшей мере, пять лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость в течение, по меньшей мере, 6 месяцев после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость в течение, по меньшей мере, одного года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость в течение, по меньшей мере, двух лет после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость в течение, по меньшей мере, трех лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость в течение, по

меньшей мере, четырех лет после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует общую выживаемость в течение, по меньшей мере, пяти лет после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе.

В одном варианте осуществления способов или применений или продукта для применений, предложенных в настоящем документе, ответ на лечение анти-СD70 антителом, описанным в настоящем документе, оценивают путем измерения продолжительности ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-CD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, примерно 1 месяц, по меньшей мере, примерно 2 месяца, по меньшей мере, примерно 3 месяца, по меньшей мере, примерно 4 месяца, по меньшей мере, примерно 5 месяцев, по меньшей мере, примерно 6 месяцев, по меньшей мере, примерно 7 месяцев, по меньшей мере, примерно 8 месяцев, по меньшей мере, примерно 9 месяцев, по меньшей мере, примерно 10 месяцев, по меньшей мере, примерно 11 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере, примерно два года, по меньшей мере, примерно три года, по меньшей мере, примерно четыре года или, по меньшей мере, примерно пять лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, примерно 6 месяцев после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, примерно один год после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, примерно два года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, примерно три года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, примерно четыре года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, примерно пять лет после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, 1 месяц, по меньшей мере, 2 месяца, по меньшей мере, 3 месяца, по меньшей мере, 4 месяца, по

меньшей мере, 5 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, по меньшей мере, 7 месяцев. месяцев, по меньшей мере, 8 месяцев, по меньшей мере, 9 месяцев, по меньшей мере, 10 месяцев, по меньшей мере, 11 месяцев, по меньшей мере, 12 месяцев, по меньшей мере, восемнадцать месяцев, по меньшей мере, два года, по меньшей мере, три года, по меньшей мере, четыре года или, по меньшей мере, пять лет после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, 6 месяцев после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-CD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, один год после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, два года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, три года после введения анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, четыре года после введения анти-CD70 антитела, настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, описанного В продолжительность ответа на анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, пять лет после введения анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, способов или применений или продукта для применений, предложенных в настоящем документе, введение субъекту анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе, такого как нефукозилированное анти-CD70 антитело, приводит к истощению раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе, такого как нефукозилированное анти-СD70 антитело, приводит к истощению раковых клеток, по меньшей мере, примерно на 5%, по меньшей мере, примерно на 6%, по меньшей мере, примерно на 7%, по меньшей мере, примерно на 8%, по меньшей мере, примерно на 9%, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 15%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 35%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 45%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или примерно на 100% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением анти-СD70 антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 5% по сравнению с количеством раковых

клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 10% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 20% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 30% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 40% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 50% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 60% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 70% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 80% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 90% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 95% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, примерно на 99% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются примерно на 100% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе, такого как нефукозилированное анти-СD70 антитело, приводит к истощению раковых клеток, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 6%, по меньшей мере, на 7%, по меньшей мере, на 8%, по меньшей мере, на 9%, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, на 95% или 100% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 5% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки

истощаются, по меньшей мере, на 10% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 20% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 30% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 40% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 50% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 60% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 70% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 80% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 90% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 95% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются, по меньшей мере, на 99% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки истощаются на 100% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту анти-CD70 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, способов или применений или продукта для применений, описанных в настоящем документе, введение описанного в настоящем документе анти-CD70 антитела, такого как нефукозилированное анти-CD70 антитело, субъекту не приводит к истощению CD70+ T-регуляторных клеток (CD70+ Treg) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе, такого как нефукозилированное анти-CD70 антитело, приводит к истощению CD70+ Treg не более чем на примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10%, примерно 9%, примерно 8%, примерно 7%, примерно 6%, примерно 5%, примерно 4%, примерно 3%, примерно 2%, примерно 1% или примерно 0,1% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением анти-CD70 антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg перед введением СD70+ Treg перед введением CD70+ Treg перед введением CD70+ Treg перед введением СD70+ Treg перед СD70+ Treg перед СD70+ Treg перед СD70+ Treg перед СD70+ Treg пере

CD70+ Treg истощаются не более чем примерно на 30% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, СD70+ Treg истощаются не более чем примерно на 20% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, СD70+ Treg истощаются не более чем примерно на 10% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем примерно на 5% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем примерно на 1% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем примерно на 0,1% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-СD70 антитела, описанного в настоящем документе, такого как нефукозилированное анти-СD70 антитело, приводит к истощению CD70+ Treg не более чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,1% по сравнению с количеством СD70+ Treg до введения субъекту анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 50% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 40% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 30% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 20% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 10% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 5% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 1% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, CD70+ Treg истощаются не более чем на 0,1% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением субъекту анти-СD70 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, фукозилированное анти-CD70 антитело истощает CD70+ Treg у субъекта в большей степени, чем нефукозилированная форма анти-CD70 антитела, содержащая такие же аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей. В некоторых вариантах осуществления, фукозилированное анти-CD70 антитело истощает CD70+ Treg у субъекта в большей степени, чем нефукозилированная форма анти-CD70 антитела, содержащая такие же аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, когда субъект является гомозиготным по высокоаффинному

ГсүRIIIа рецептору (V/V 158). В некоторых вариантах осуществления, фукозилированное анти-CD70 антитело истощает CD70+ Treg у субъекта в той же степени, что и нефукозилированная форма анти-CD70 антитела, содержащая такие же аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, когда субъект является гомозиготным по низкоаффинному ГсүRIIIа рецептору (F/F 158). В некоторых вариантах осуществления, ни фукозилированное анти-CD70 антитело, ни нефукозилированная форма анти-CD70 антитела, содержащие одинаковые аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, не истощают CD8 Т-клетки, когда субъект является гомозиготным по высокоаффинному рецептору ГсүRIIIа (V/V 158). В некоторых вариантах осуществления, ни фукозилированное анти-CD70 антитело, ни нефукозилированная форма анти-CD70 антитела, содержащие одинаковые аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, не истощают CD8 Т-клетки, когда субъект является гомозиготным по низкоаффинному рецептору ГсүRIIIa (F/F 158).

## IV. Анализы цитотоксической, цитостатической и иммуномодулирующей активности

Известны способы определения того, опосредует ли антитело эффекторную функцию против клетки-мишени. Иллюстративные примеры таких способов описаны *ниже*.

Для определения того, опосредует ли анти-CD70 антитело антителозависимую клеточную цитотоксичность в отношении активированных иммунных клеток или раковых клеток, экспрессирующих СD70, можно использовать анализ, который измеряет гибель клеток-мишеней в присутствии антитела и эффекторных иммунных клеток. Анализ, используемый для измерения этого типа цитотоксичности, может быть основан на определении высвобождения <sup>51</sup>Cr из метаболически меченых клеток-мишеней после инкубации в присутствии эффекторных клеток и антител, специфичных к мишени (см., например, Perussia and Loza, 2000, Methods in Molecular Biology 121:179-92; and "<sup>51</sup>Cr Release Assay of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC)" in Current Potocols in Immunology, Coligan et al. eds., Wileyand Sons, 1993). Например, активированные иммунные клетки (например, активированные лимфоциты) или CD70экспрессирующие раковые клетки, меченные  $Na_2^{51}CrO_4$  и высеянные с плотностью 5000 клеток на лунку 96-луночного планшета, обрабатывают различными концентрациями анти-СD70 антитела в течение 30 минут, затем смешивают с нормальными мононуклеарными клетками периферической крови человека (РВМС) в течение 4 часов. Разрушение мембраны, которое сопровождает гибель клетки-мишени, высвобождает <sup>51</sup>Сг в супернатант культуры, который собирают и оценивают на радиоактивность как меру цитотоксической активности. Другие анализы для измерения ADCC могут включать не или основываться на индуцированном высвобождении радиоактивные метки специфических ферментов. Например, коммерчески доступен не радиоактивный анализ, основанный на флуорометрии с временным разрешением (Delphia, Perkin Elmer). Этот анализ основан на загрузке клеток-мишеней ацетоксиметиловым эфиром лиганда,

усиливающего флуоресценцию (ВАТDA), который проникает через клеточную мембрану, а затем гидролизуется с образованием непроницаемого для мембраны гидрофильного лиганда (ТDA). При смешивании с специфическими антителами-мишенями и эффекторными клетками РВМС, ТDA высвобождается из лизированных клеток и может образовывать высокофлуоресцентный хелат при смешивании с европием. Сигнал, измеренный флуорометром с временным разрешением, коррелирует со степенью лизиса клеток.

Чтобы определить, опосредует ли анти-CD70 антитело антителозависимый клеточный фагоцитоз против активированных иммунных клеток или раковых клеток, экспрессирующих СD70, следует провести анализ, который измеряет интернализацию клетки-мишени эффекторными иммунными клетками (например, свежими культивируемыми макрофагами или установленной линией макрофагоподобных клеток) (см., например, Munn and Cheung, 1990, J. Exp. Med. 172:231-37; Keler et al., 2000, J. Immunol. 164:5746-52; Akewanlop et al., 2001, Cancer Res. 61:4061-65). Например, клеткимишени могут быть помечены липофильным мембранным красителем, таким как РКН67 (Sigma), покрыты мишень-специфическим антителом и смешаны с эффекторными иммунными клетками в течение 4-24 часов. Затем эффекторные клетки могут быть идентифицированы путем контрастного окрашивания меченым флуорохромом антителом, специфичным к маркеру фагоцитарной клеточной поверхности (например, CD14), и клетки анализируют с помощью двухцветной проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии. Двойные положительные клетки представляют собой эффекторные клетки, которые имеют интернализованные клетки-мишени. Для этих анализов, эффекторными клетками могут быть моноциты, полученные из РВМС, которые были дифференцированы в макрофаги путем культивирования в течение 5-10 дней с M-CSF или GM-CSF (см., например, Munn and Cheung, выше). Макрофагоподобные клеточные линии человека U937 (Larrick et al., 1980, J. Immunology 125:6-12) или THP-1 (Tsuchiya et al., 1980, Int. J. Cancer 26:171-76), которые доступны из АТСС, можно использовать в качестве альтернативного источника фагоцитарных клеток.

Также известны способы определения того, опосредует ли антитело комплементзависимую цитотоксичность при связывании с клетками-мишенями. Те же способы можно применять для определения того, опосредует ли анти-CD70 антитело CDC на активированных иммунных клетках или раковых клетках, экспрессирующих CD70. Иллюстративные примеры таких способов описаны *ниже*.

Источником активного комплемента может быть либо нормальная сыворотка человека, либо и очищенная от лабораторных животных, включая кроликов. В стандартном анализе, анти-CD70 антитело инкубируют с экспрессирующими CD70 активированными иммунными клетками (*например*, активированными лимфоцитами) или экспрессирующими CD70 раковыми клетками в присутствии комплемента. Способность такого анти-CD70 антитела опосредовать лизис клеток можно определить с помощью нескольких показаний. В одном примере используют анализ высвобождения Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>. В

этом анализе, клетки-мишени метят Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>. Невключенный Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> смывают, и клетки высевают с подходящей плотностью, обычно от 5000 до 50000 клеток/лунку, в 96луночный планшет. Инкубация с анти-CD70 антителом в присутствии нормальной сыворотки или очищенного комплемента обычно длится 2-6 часов при 37°C в атмосфере с 5% СО2. Высвобожденную радиоактивность, указывающую на лизис клеток, определяют в аликвоте культурального супернатанта с помощью гамма-излучения. Максимальный лизис клеток определяют по высвобождению включенного Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> при обработке детергентом (0,5-1% NP-40 или Triton X-100). Спонтанный фоновый лизис клеток определяют в лунках, где присутствует только комплемент без каких-либо анти-CD70 антител. Долю лизиса клеток рассчитывают как (лизис, индуцированный анти-CD70 антителами - спонтанный лизис)/максимальный лизис клеток). Второй показатель представляет собой восстановление метаболических красителей, например, Alamar Blue, жизнеспособными клетками. В этом анализе, клетки-мишени инкубируют с анти-CD70 антителами с комплементом и инкубируют, как описано выше. В конце инкубации добавляют 1/10 объема Alamar Blue (Biosource International, Camarillo, CA). Инкубацию продолжают до 16 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Снижение содержания Alamar Blue как показатель метаболически активных жизнеспособных клеток определяют флуорометрическим анализом с возбуждением при 530 нм и испусканием при 590 нм. Третье значение представляет собой проницаемость клеточной мембраны для йодида пропидия (РІ). Образование пор в плазматической мембране в результате активации комплемента облегчает проникновение РІ в клетки, где он будет диффундировать в ядра и связываться с ДНК. При связывании с ДНК, значительно увеличивается флуоресценция РІ в области 600 нм. Обработку клеток-мишеней анти-CD70 антителами и комплементом проводят, как описано выше. В конце инкубации добавляют РІ до конечной концентрации Затем клеточную суспензию исследуют проточной цитометрией с использованием 488 нм аргонового лазера для возбуждения. Лизированные клетки определяют по эмиссии флуоресценции при 600 нм.

# V. Фармацевтические композиции, содержащие анти-CD70 антитела, и их введение

Композицию, содержащую анти-CD70 антитело, можно вводить субъекту, имеющему или подверженному риску развития рака, экспрессирующего CD70. Изобретение дополнительно относится к применению анти-CD70 антитела в производстве лекарственного средства для профилактики или лечения экспрессирующего CD70 рака. Используемый в настоящем документе термин «субъект» означает любого пациентамлекопитающего, которому может быть введен CD70 связывающий агент, включая, например, людей и млекопитающих, отличных от человека, таких как приматы, грызуны и собаки. Субъекты, специально предназначенные для лечения с использованием описанных в настоящем документе способов, включают людей. Антитела можно вводить либо отдельно, либо в комбинации с другими композициями для профилактики или лечения экспрессирующего CD70 рака.

Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения анти-CD70 антитела. Способы введения включают, но не ограничены ими, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Анти-СD70 антитело можно вводить, например, путем инфузии или болюсной инъекции (например, внутривенно или подкожно), путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.п.) и можно другими биологически активными агентами, химиотерапевтические агенты. Введение может быть системным или местным. В одном варианте осуществления, анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе, вводят парентерально. Парентеральное введение относится к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, интракраниальную, внутригрудную, эпидуральную и интрастернальну. инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления, способ введения анти-СD70 антитела, описанный в настоящем документе, представляет собой внутривенную инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах осуществления, способ введения анти-СD70 антитела, описанный в настоящем документе, представляет собой внутривенную инфузию.

В конкретных вариантах осуществления, композицию анти-CD70 антитела вводят путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, где имплантат представляет собой пористый, не пористый или гелеобразный материал, включая мембрану, такую как сиаластическая мембрана, или волокно. Как правило, при введении композиции используют материалы, с которыми анти-CD70 антитело не абсорбируется.

Анти-CD70 антитело можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела и один или более фармацевтически совместимых ингредиентов. Например, фармацевтическая композиция обычно включает один или более фармацевтических носителей (например, стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и подобные). Вода является более типовым носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия,

сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и подобные. Композиция, при желании, может также содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих агентов или рН буферных агентов. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и подобных. Композиция может быть составлена в виде суппозитория с традиционными связующими и носителями, такими как триглицериды. Пероральные составы могут включать стандартные носители, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, целлюлозы, карбоната магния *и т.д.* Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences» by E.W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество белка, обычно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Составы соответствуют способу введения.

В типичных вариантах осуществления, фармацевтическую композицию составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости, фармацевтический препарат может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо смешиваются друг с другом в стандартной дозированной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если фармацевтический препарат следует вводить путем инфузии, его можно бутылки инфузий, содержащей вводить помощью для фармацевтического качества или солевой раствор. Если фармацевтический препарат вводят путем инъекции, может быть предложена ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

Кроме того, фармацевтическая композиция может быть предоставлена в виде фармацевтического набора, включающего (а) контейнер, содержащий анти-CD70 антитело в лиофилизированной форме, и (b) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (*например*, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизированного анти-CD70 антитела. Необязательно с таким контейнером(ами) может быть предоставлено уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, которое отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеку.

Количество анти-СD70 антитела, которое является эффективным при лечении или

профилактике CD70-экспрессирующего рака, можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы in vitro, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны дозировок. Точная доза, используемая в препарате, также будет зависеть от пути введения и стадии рака, экспрессирующего CD70, и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в тест-системах in vitro или на животных моделях.

Например, токсичность и терапевтическую эффективность анти-CD70 антитела можно определить в клеточных культурах или на экспериментальных животных с помощью стандартных фармацевтических процедур определения  $LD_{50}$  (дозы, летальной для 50% популяции) и  $ED_{50}$  (дозы, терапевтически эффективной у 50% населения). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено как отношение  $LD_{50}/ED_{50}$ . Анти-CD70 антитело, которое демонстрирует большой терапевтический индекс, является предпочтительным. Если анти-CD70 антитело проявляет токсические побочные эффекты, можно использовать систему доставки, которая нацеливает анти-CD70 антитело на участок пораженной ткани, чтобы минимизировать потенциальное повреждение клеток, не экспрессирующих CD70, и, таким образом, уменьшить побочные эффекты.

Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка анти-CD70 антитела обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает  $ED_{50}$  с небольшой или без токсичности. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой дозированной формы и используемого пути введения. Для анти-CD70 антитела, используемого в способе, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить из анализов клеточных культур. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, который включает  $IC_{50}$  (*т.е.* концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Как правило, дозировка анти-CD70 антитела, вводимого пациенту с экспрессирующим CD70 раком, составляет примерно от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта. Более типично, доза, вводимая субъекту, составляет от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела субъекта, еще более типично, от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 1 мг/кг до 12 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг или от 1 мг/кг до 7,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления, доза анти-CD70 антитела составляет 1,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет 5 мг/кг. В

осуществления, доза составляет 20 мг/кг. Как правило, антитела человека имеют более длительный период полураспада в организме человека, чем антитела других видов, из-за иммунного ответа на чужеродные белки. Таким образом, часто возможны более низкие дозы анти-CD70 антитела, включающего гуманизированные или химерные антитела, и менее частое введение.

Дозу анти-CD70 антитела можно вводить, например, ежедневно, один раз в неделю (еженедельно), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, раз в две недели, ежемесячно или иным образом, по мере необходимости.

В некоторых вариантах осуществления, дозировка анти-CD70 антитела соответствует субоптимальной дозе (m.e. ниже  $EC_{50}$  для анти-CD70 антитела. Например, доза анти-CD70 антитела может включать дозу, выбранную из самых низких 25%, самых низких 15%, самых низких 10% или самых низких 5% терапевтического окна. Используемый в настоящем документе, термин «терапевтическое окно» относится к диапазону дозировок лекарственного средства или его концентрации в системе организма, которая обеспечивает безопасную и эффективную терапию.

В некоторых вариантах осуществления, дозировка анти-CD70 антитела составляет от примерно 0,05 мг/кг до примерно 1 мг/кг, или от примерно 0,1 мг/кг до примерно 0,9 мг/кг, или от примерно 0,15 до примерно 0,75 мг/кг массы тела субъекта. Такую дозу можно вводить от 1 до примерно 15 раз в неделю. Каждая доза может быть одинаковой или разной. Например, дозу примерно 0,15 мг/кг анти-CD70 антитела можно вводить от 1 до 10 раз в течение четырех дней, пяти дней, шести дней или семи дней.

вариантах осуществления, фармацевтические некоторых содержащие анти-CD70 антитело, могут дополнительно содержать терапевтический агент (например, неконъюгированный цитотоксический или иммуномодулирующий агент, такой как, например, любой из агентов, описанных в настоящем документе). Анти-СD70связывающий агент также можно вводить совместно с одним или несколькими терапевтическими агентами для лечения или профилактики рака, экспрессирующего СD70. Например, комбинированная терапия может включать терапевтический агент (например, цитостатический, цитотоксический или иммуномодулирующий агент, такой как неконъюгированный цитостатический, цитотоксический или иммуномодулирующий агент, такой как те, которые обычно используются для лечения рака). Комбинированная терапия также может включать, например, введение агента, который таргетирует рецептор или рецепторный комплекс, отличный от СD70, на поверхности активированных лимфоцитов, дендритных клеток или экспрессирующих CD70 раковых клеток. Пример такого агента включает второе, отличное от CD70 антитело, которое связывается с молекулой на поверхности активированного лимфоцита, дендритной клетки или раковой клетки, экспрессирующей СD70. Другой пример включает лиганд, таргетирующий такой рецептор или рецепторный комплекс. Как правило, такое антитело или лиганд связывается с рецептором клеточной поверхности на активированных лимфоцитах, дендритных клетках или раковых клетках, экспрессирующих СD70, и усиливает

цитотоксический или цитостатический эффект анти-СD70 антитела путем доставки цитостатического или цитотоксического сигнала активированному дендритной клетке или экспрессирующая СD70 раковой клетке. Такое комбинированное введение может оказывать аддитивный или синергический эффект на параметры заболевания (например, тяжесть симптома, количество симптомов или частоту рецидивов). Другой пример включает гипометилирующий агент (НМА). В некоторых вариантах осуществления, НМА представляет собой азацитидин (VIDAZA®). Другой пример включает миметик ВН3. Другой пример включает венетоклакс (VENCLEXTA®). В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит анти-СD70 антитело, НМА и миметик ВН3. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит анти-СD70 антитело, НМА и венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит анти-CD70 антитело, азацитидин и миметик ВНЗ. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит анти-CD70 антитело, азацитидин и венетоклакс.

Что касается терапевтических схем комбинированного введения, в конкретном варианте осуществления, анти-CD70 антитело вводят одновременно с терапевтическим агентом. В другом конкретном варианте осуществления, терапевтический агент вводят до или после введения анти-CD70 антитела, по меньшей мере, в течение часа и вплоть до нескольких месяцев, например, по меньшей мере, в течение часа, пяти часов, 12 часов, дня, недели, месяца или трех месяцев до или после введения анти-CD70 антитела. В некоторых вариантах осуществления, субъект находится под наблюдением после введения анти-CD70 антитела и, необязательно, терапевтического агента.

#### VI. Готовые изделия и наборы

В другом аспекте предлагается готовое изделие или набор, который содержит анти-СD70 антитело, описанное в настоящем документе. Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе, в способах по изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, готовое изделие или набор содержат инструкции по применению анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе, в способах лечения рака (например, миелоидных новообразований) у субъекта, включающих введение субъекту эффективного количества анти-CD70 антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой MDS. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой AML. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой рецидивирующий или не поддающийся лечению рак. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек.

Готовое изделие или комплект могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как однокамерные или двухкамерные шприцы) и пробирки. В некоторых вариантах осуществления, контейнер представляет собой флакон. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или

пластик. Контейнер содержит состав.

Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать этикетку или вкладыш в упаковку, которые находятся на контейнере или связаны с ним, могут содержать указания по восстановлению и/или применению состава. На этикетке или вкладыше в упаковку может быть дополнительно указано, что состав используется или предназначен для подкожного, внутривенного (например, внутривенного вливания) или других способов введения для лечения рака у субъекта. Контейнер, содержащий состав, может быть одноразовым или многоразовым флаконом, что позволяет повторно вводить восстановленный состав. Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Готовое изделие или набор могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой, терапевтической и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

Готовое изделие или набор в настоящем документе необязательно дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, где анти-CD70 антитело представляет собой первое лекарственное средство, и такое готовое изделие или комплект дополнительно содержит инструкции на этикетке или вкладыше в упаковке для лечения субъекта вторым лекарственным средством, в эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления, на этикетке или вкладыше в упаковку указано, что первое и второе лекарственные средства следует вводить последовательно или одновременно.

В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антиСD70 антитело присутствует в контейнере в виде лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах осуществления, лиофилизированный порошок находится в герметично закрытом контейнере, таком как флакон, ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если фармацевтическое средство вводят путем инъекции, ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором может быть, например, предоставлена необязательно как часть набора, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением. Такие наборы могут дополнительно включать, при желании, один или более различных обычных фармацевтических компонентов, таких как, например, контейнеры с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры и т. д., как будет очевидно специалистам в данной области техники. В набор также могут быть включены печатные инструкции в виде вкладышей или этикеток с указанием количества вводимых компонентов, рекомендаций по применению и/или рекомендаций по смешиванию компонентов.

Изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в свете этого будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть

включены в суть и содержание настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

### ПРИМЕРЫ

### Пример 1: Оценка связывания SEA-CD70 с Fcy рецепторами

In vivo моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и NK-клетки могут опосредовать ADCP (антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз) и ADCC (антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность через  $Fc\gamma RII$ ,  $Fc\gamma RIII$ а и  $Fc\gamma RIII$ а. Хотя все три рецептора могут участвовать в ADCP, считается, что  $Fc\gamma RIII$ а является преобладающим  $Fc\gamma$  рецептором, участвующим в ADCC. Нефукозилирование антител  $IgG_1$  приводит к более высокой аффинности связывания с  $Fc\gamma RIII$ а и b, и, таким образом, может повышать активность ADCC и ADCP.

SEA-CD70 (нефукозилированный hIF6) представляет собой гуманизированное нефукозилированное моноклональное антитело, таргетирующее CD70, разработанное Seattle Genetics для пациентов с трудно поддающимся лечению и/или рецидивирующим острым миелоидным лейкозом (AML) или миелодиспластическим синдромом (MDS), для которых не существует действующего стандарта лечения. SEA-CD70 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1, которое связывает CD70. SEA-CD70 представляет собой нефукозилированное антитело, которое связывается с FcγRIIIa с более высокой аффинностью, чем фукозилированное родительское антитело SGN-70 (hIF6), и вызывает повышенное таргетное уничтожение CD70-положительных клеток посредством CDC, ADCP и амплифицированной ADCC.

Биослойную интерферометрию (BLI) используют для оценки кинетики связывания SGN-70 и SEA-CD70 с FcγR I, IIa, IIIa, IIb и FcRN. На ФИГ. 1 показаны сенсограммы связывания SGN-70 (обозначенного как h1F6 WT) и SEA-70 (обозначенного как h1F6 SEA) с FcγRI, IIa, IIIa, IIb и FcRN.

Кинетику связывания SGN-70 и SEA-CD70 с FcγRI, FcγRIIa H131, FcγRIIa R131, FcγRIIIa F158 и FcγRIIIa V158 человека оценивают с помощью BLI. Параметры приведены в таблице 1. Слитые белки биотинилированного avi-меченого FcγR-мономерного Fc человека N297A LALA-PG и Fc рецептора неонатального (FcRN) мономерного Fc N297A IHH слияния (сконструированные и экспрессированные в Seattle Genetics) загружают в высокоточные стрептавидиновые биосенсоры (ForteBio) для ответов от 0,3 до 1 нм после 100-секундной проверки сенсора в буфере A (0,1% альбумин бычьей сыворотки [BSA], 0,02% Tween20, 1х фосфатно-солевой буфер [PBS], pH 7,4). После другого базового измерения, титруемые антитела связывают в течение 600, 10, 100, 50 и 10 секунд и диссоциируют в течение 1000, 50, 100, 500 и 50 секунд в буфере В (1% казеин, 0,2% Tween20, 1 х PBS pH 7,4) для FcγRI, IIa, IIIa, FcRN pH 6 и FcRN pH 7,4, соответственно. Перед анализом, эталоны вычитают в каждом анализе. Все сенсограммы обрабатывают с выравниванием по оси Y в начале ассоциации и поправкой на диссоциацию между стадиями. Для подгонки кривых используют глобальную подгоночную модель изотермы Ленгмюра 1:1.

Таблица 1: Параметры протокола связывания BLI для SGN-70 и SEA-CD70

Биосенсор:	SAX	,,,					
•	SAX hCD64 P2 mFc.67 N297A LALA-PG avi E143815 hFcgR 2a H131 mFc.67 N297A LALAPG avi биотин E142954 hFcgR 2a R131 mFc.67 N297A LALAPG avi биотин E142954	(40 мкг/мл, нагрузка 750 с) (4 мкг/мл, нагрузка 400 с) (4 мкг/мл, нагрузка 400 с)	Ассоциация подгонки 600 с. Диссоциация 1000 с. Ассоциация подгонки 10 с. Диссоциация 3 с. Ассоциация подгонки 10 с. Диссоциация				
Зонды (иммобилизован	hFcgR 2b mFc.67 N297A LALAPG avi биотин E142954	(1 мкг/мл, нагрузка 400 с)	Ассоциация подгонки 10 с. Диссоциация 10 с.				
ные):	hFcgR 3a F158 mFc.67 N297A LALAPG avi биотин E142954	(2 мкг/мл, нагрузка 400 с)	Ассоциация подгонки 100 с. Диссоциация 20 с.				
	hFcgR 3a V158 mFc.67 N297A LALAPG avi биотин E142954	(2 мкг/мл, нагрузка 400 с)	Ассоциация подгонки 100 с. Диссоциация 10 с.				
	hFcRN mFc.67 N297A IHH avi биотин E143815-01	(5 мкг/мл, нагрузка 400 с)	Ассоциация подгонки 50 с. Диссоциация 50 с для pH 6 (10 с и 3-4 с для pH 7,4)				
Анализируемое	h1F6 WT	E133368-02					
вещество (титрованное):	h1F6 SEA	E133368-01					
Иммобилизирую	0,1% BSA; 0,02% Tween20;						
щий буфер:	1× PBS pH 7,4						
Кинетический буфер:	1% казеин; 0,2% Tween20; 1 x PBS pH 7,4 (hFcγR's); 1% BSA, 0,2% Tween20, фосфатно-цитратный буфер pH 6,09 (hFcRN pH 6), фосфатно-цитратный буфер pH 7,46 (hFcRN pH 7,4)						
Параметры	Глобальная (групповая,	(эталон вычтен до					

подгонки:	полная) 1:1; Rmax датчик не	анализа)	
	связан		

BLI=биослойная интерферометрия; BSA=альбумин бычьей сыворотки; FcRN=неонатальный рецептор Fc; PBS=фосфатно-солевой буфер; с=секунды.

Сродство СD70 человека определяют с помощью BLI с использованием параметров, перечисленных в таблице 2. Исходные измерения в буфере А (0,1% BSA, 0,02% Tween20, 1х PBS, pH 7,4) проводят до и после иммобилизации антител в концентрации 6 мкг/мл в течение 57 секунд с биосенсорами AHC (анти-Fc), приобретенными у ForteBio. После того, как второй базовый уровень получают в буфере В (1% казеин, 0,2% Tween20, 1х PBS, pH 7,4), титруемый аналит hCD70 ассоциируют в течение 600 секунд и диссоциируют в течение 1000 секунд в буфере В. Антиген hCD70 приобретают у R&D (кат. № 9328-CL, партия № DGSR0217071) и биотинилируют с использованием 1,5-кратного молярного избытка EZ-Link N-гидроксисукцинимидобиотина, приобретенного у Thermo Fisher Scientific (кат. № 20217, партия № SI249775).

Таблица 2: Параметры протокола связывания BLI для CD70 человека

Биосенсор:	АСН (анти-Fc)	,,,	
Зонды (иммобилизован ные):	hCD70 Биотин E131664-01	(6 мкг/мл, загрузка 57 с)	Ассоциация подгонки 600 с. Диссоциация 1000 с.
Аналит	h1F6 WT	E133368-03	33,3, 11,1, 3,7, 1,2, 0,4, 0,1 нМ
(титрованный):	h1F6 SEA	E133368-01	33,3, 11,1, 3,7, 1,2, 0,4, 0,1 нМ
Иммобилизирую щий буфер:	0,1% BSA; 0,02% Tween20; 1x PBS pH 7,4		
Кинетический буфер:	1% казеин; 0,2% Tween20; 1х	PBS pH 7,4	
Параметры подгонки:	Глобальная (групповая, полная) 1:1; Rmax датчик не связан	(эталон вычтен до анализа)	

BSA=альбумин бычьей сыворотки; PBS=фосфатно-солевой буфер; с=секунды.

SEA-CD70 и SGN-70 имеют сходную скорость связывания с hFcγRI и IIa. Однако SEA-CD70 проявляет гораздо более высокую аффинность связывания с FcγRIIIA, чем SGN-70. Эксперимент BLI проводят для изучения скорости ассоциации и диссоциации SEA-CD70 и SGN-70, и аффинности связывания с FcγRI, FcγRIIa (аллели H/H с высокой аффинностью и R/R с низкой аффинностью) и FcγRIIIa (F/F с низкой аффинностью и V/V

с высокой аффинностью). Также исследуют кинетику связывания с FcRn, и обнаруживают, что SEA-CD70 и SGN-70 связываются с аналогичной кинетикой и аффинностью.

Для оценки кинетики связывания SGN-70 и SEA-CD70 с высокоаффинным вариантом рецептора FcyRIIIa (158V) используют биослойную интерферометрию (BLI) (таблица 3). Нефукозилированный остов SEA-CD70 демонстрирует 8-кратное увеличение (158V). FcγRIIIa аффинности связывания c рецептором Слитые биотинилированного avi-меченого FcyR-мономерного Fc человека N297A LALA-PG и FcRN мономерного Fc N297A IHH (сконструированные и экспрессированные в Seattle Genetics) загружают в высокоточные стрептавидиновые биосенсоры (ForteBio) для получения ответов от 0,3 до 1 нм после 200-300-секундной проверки датчика в буфере А (0,1% BSA, 0,02% Tween20, 1x PBS, pH 7,4). После второго исходного уровня, титрованные SEA-CD70 или SGN-70 антитела ассоциируют до тех пор, пока максимальная концентрация не достигает равновесия, и диссоциируют до тех пор, пока ответ не приближается к исходному уровню. Перед анализом, эталоны вычитают в каждом анализе. Все сенсограммы обрабатывают с выравниванием по оси У в начале ассоциации и поправкой на диссоциацию между стадиями. Для подгонки кривых используют глобальную подгоночную модель изотермы Ленгмюра 1:1.

Таблица 3. Кинетические параметры связывания SGN-70 и SEA-CD70 FcyRIIIa с помощью BLI

	Антител 0	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>on</sub> (1/Mc)	k <sub>off</sub> (1/c)	χ²	К <sub>D</sub> ошибка	k <sub>on</sub> ошибка	k <sub>off</sub> ошибк а
hFcγRI IIa	SGN-70	8,60x10 <sup>-7</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	$4.0 \times 10^{-2}$	1,3	1,73x10 <sup>-</sup>	$8,00 \times 10^2$	3,93x1 0 <sup>-4</sup>
V158	SEA- CD70	1,10x10 <sup>-7</sup>	$2,1x10^5$	2,2x10 <sup>-2</sup>	0,4	9,69x10 <sup>-</sup>	1,68x10 <sup>3</sup>	1,02x1 0 <sup>-4</sup>

 $K_{D}$ =равновесная константа диссоциации;  $k_{off}$ =константа диссоциации;  $k_{on}$ =константа ассоциации.

# Пример 2. Связывание SGN-70 и SEA-CD70 с hFcγRIIIa и cFcγRIIIa с помощью проточной цитометрии

Хотя методология BLI используется для оценки аффинности к рецептору путем мониторинга кинетики связывания, она в первую очередь предназначена для мониторинга одновалентного связывания. Для добавления к наборам данных BLI также выполняют проточную цитометрию (ФИГ. 2A и 2B). Клетки CHO трансформируют для сверхэкспрессии высокоаффинного рецептора FcyRIIIa человека (158V) (ФИГ. 2A) или рецептора FcyRIIIa яванского макака (ФИГ. 2B), и осуществляют связывание нефукозилированного антитела SEA-CD70 (обозначенного как SEA-70) или исходного фукозилированного антитела SGN-70. Как наблюдают в экспериментах BLI,

нефукозилированное антитело SEA-CD70 связывается с более высокой аффинностью, чем SGN-70, как с FcyRIIIa человека, так и с FcyRIIIa яванского макака.

Анализ связывания CHO-FcyRIIIa проводят следующим образом:

1. Размораживание клеток: Клетки размораживают 11 июня 2019 и культивируют в культуральной среде в течение 1 недели для восстановления после замораживанияразмораживания.

Данные Vi-CELL XR2.04, Beckman Coulter, Inc.

Идентификатор образца	Коэффициен т разведения	Дата взятия образца	Жизнеспосо бные клетки		Средний диаметр (микрон)
CHO-FcγRIIIa	1,0	20 июня 2019, 12:17:42	1584	1,81	18.17
CHO-cynoFcγIII	1,0	20 июня 2019, 12:18:57	1241	1,42	15.30

- 2. Промывка: 60 миллионов клеток промывают 1 раз в PBS в 50 мл пробирках. Клетки снова подсчитывают и ресуспендируют при  $2.2 \times 10^6$ /мл. Затем пипетируют по 0.1 мл на лунку.
- 3. Делают 10х разведения антитела: готовят 10х разведения (3 мг/мл, 1 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,03 мг/мл, 0,01 мг/мл, 0,003 мг/мл, 0,001 мг/мл и 0,0003 мг/мл в планшете для разведения).

		L'avvvavenave		Объемны	15 лунок (3 х	Объемный
Антитело	Партия №		5) по 330 мкл	й буфер	5) по 330 мкл	буфер
		ия (мг/мл)	3000 мкг/мл	(PBS)	1000 мкг/мл	(PBS)
SGN-70	GZG002	25	0,040	0,290	0,013	0,317
SEA-CD70	145567	25	0,040	0,290	0,013	0,317
SGN-h00	E12057-01	10,4	0,095	0,235	0,032	0,298
SEA-h00	1913-020A	10	0,099	0,231	0,033	0,297

PBS=фосфатно-солевой буфер.

- 4. Аспирация: Промывку отсасывают в лунках, и 100 мкл соответствующих разведений антител пипетируют многоканальной пипеткой. Соответствующие концентрации составляют 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,03, 0,01, 0,003, 0,001 и 0,0003 мкг/мл в трех повторах. Концентрации снижают по вертикали вниз по 96-луночному круглодонному планшету.
- 5. Встряхивание: После сильного постукивания по каждой стороне планшета используют встряхивание для легкого перемешивания. Затем планшет инкубируют при 4°C в течение 1 часа.

- 6. Центрифугирование. Клетки центрифугируют, отсасывают и промывают в 200 мкл 1х буфера для окрашивания BD на лунку. Клетки ресуспендируют путем встряхивания планшета на встряхивателе после отсасывания последней промывки.
- 7. Приготовление антитела: Анти-человеческий IgG-PE (Jackson, кат. № 109-116-170) готовят путем разведения 1 мг/мл концентрата 1:50 с получением насыщающей концентрации 33 мкг/мл. Смесь антител хорошо перемешивают, постукивая по краям планшета. Смесь инкубируют в течение 30 минут в темноте в холодильнике (4°C).
- 8. Промывка. Смесь центрифугируют. Затем супернатант отсасывают. Каждую лунку промывают 200 мкл 2х буфера для окрашивания BD.
- 9. Анализ образцов. Образцы анализируют с помощью проточной цитометрии в режиме высокопроизводительного пробоотборника (HTS) на Attune. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) наносят на график (геометрическое среднее) и равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) для каждого из них рассчитывают в PRIZM.

### Пример 3: ADCC SEA-CD70 и SGN-70 в клетках AML CD70+

Хотя SGN-70 напрямую не индуцирует апоптоз в CD70-положительных клетках-мишенях, SEA-CD70 опосредует эффекторные функции, которые потенциально приводят к элиминации положительных клеток-мишеней. В стандартных анализах ADCC с использованием PBMC в качестве источника естественных киллеров (NK), SEA-CD70 индуцирует лизис двух CD70-положительных клеточных линий AML дозозависимым образом, в то время как с несвязывающим контрольным IgG человека лизис не достигнут. Эти эксперименты демонстрируют, что SEA-CD70 обладает антителозависимой клеточной цитотоксической активностью, которая выше, чем у антитела SGN-CD70.

Активность ADCC оценивают с использованием двух клеточных линий CD70+ AML в качестве мишени ADCC (ФИГ. 3A и 3B). Линии клеток AML, MOLM-13 (ФИГ. 3A) и NOMO-1 (ФИГ. 3B) метят и смешивают с титрованием тестируемых антител или изотипическим контролем. Эффекторные клетки выделяют из криоконсервированных нормальных донорских PBMC с использованием набора EasySep Human NK Cell Enrichment Kit (Stem Cell Technologies). Эффекторные клетки добавляют при соотношении клеток эффектор к мишени 10:1 с 25000:250000. После 4-часовой инкубации, рассчитывают долю специфического лизиса клеток.

Линии клеток AML выращивают в подходящей питательной среде при инкубации при  $37^{\circ}$ C в 5% CO<sub>2</sub>. Суспендированные клетки подсчитывают с использованием счетчика клеток ViCell XR. Необходимый объем клеток смешивают со свежей питательной средой и высевают при плотности посева 0,5 М/мл.

Для оценки активности АРСС используют следующий протокол:

- 1. Два флакона с huPBMC размораживают на водяной бане при 37°C и ресуспендируют в 1% среде FBS-RPMI. Клетки центрифугируют, и затем NK-клетки выделяют с использованием набора для обогащения NK-клеток человека EasySep в соответствии с протоколом производителя.
  - 2. Титрование антител проводят с использованием антител SGN-70 и SEA-CD70 с

исходной концентрацией 2 мкг/мл (рабочая концентрация 6 мкг/мл) и разведением от 10x до 20 пг/мл в 1% среде FBS-RPMI.

- 3. Опухолевые клетки-мишени (MOLM-3 или NOMO-1) высевают по 50 мкл/лунку в 1% FBS-RPMI в 96-луночный круглодонный планшет. Затем в тот же планшет высевают разведения антител и изотипический контроль в количестве 50 мкл/лунку. Затем выделенные эффекторные клетки NK высевают в количестве 50 мкл/лунку при 1:10 соотношении опухоль:NK клетки в среде 1% FBS-RPMI в тот же 96-луночный круглодонный планшет.
  - 4. Добавляют контрольные лунки и доводят общий объем средой до 150 мкл.
- 5. Тестируемый планшет инкубируют в течение 4 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Когда до окончания инкубации остается 45 минут, в контрольные лунки Max Lysis добавляют 15 мкл/лунку лизисного раствора и снова помещают в инкубатор для оставшейся 4-часовой инкубации.
- 6. Тестируемый планшет центрифугируют в течение 4 мин при 250 х g, и 50 мкл супернатанта из каждой лунки переносят в новый прозрачный планшет с плоским дном.
- 7. Добавляют реагенты CytoTox 96 по 50 мкл/лунку и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем во все лунки добавляли стоп-раствор по 50 мкл/лунку.
- 8. Абсорбцию на лунку измеряют с помощью планшетного ридера SpectraMax 190 при 490 нм, полученные значения превращают в текстовый файл и экспортируют в Excel и в GraphPad Prism для дальнейшего анализа данных.
- 9. Цитотоксичность записывают с вычитанием фона и как долю от максимального лизиса, достигнутого при обработке лизисным раствором.

#### Пример 4: влияние SGN-70 и SEA-CD70 на регуляторные Т-клетки

Чтобы оценить влияние SEA-CD70 на истощение CD70+ Т-клеток, PBMC, содержащие субпопуляции наивных клеток, памяти и Treg, обрабатывают возрастающими концентрациями SGN-70 или SEA-CD70 в течение 24 часов. В конце эксперимента, клетки окрашивают красителем Zombie Aqua Viability Dye и оценивают общее количество жизнеспособных Treg наивных и памяти CD4 и CD8 Т-клеток. Оценку истощения проводят с донором, гомозиготным по низкоаффинному FcyRIIIa рецептору (F/F 158) (ФИГ. 4C и 4D) или гомозиготным по высокоаффинному FcyRIIIa рецептору (V/V 158) (ФИГ. 4A и 4B). Фукозилированные (WT Клон 13 IgG1) и нефукозилированные (SEA Клон 13 IgG1) антитела, таргетирующие TIGIT, используют в качестве положительных контролей (ФИГ. 4Е-4Н). Ни одно антитело, таргетирующее СD70, не индуцирует истощение Т-регуляторных клеток у низкоаффинного донора F/F 158 (ФИГ. 4С). Фукозилированное анти-CD70 антитело (обозначенное как SGN-CD70) приводит к истощению Т-регуляторных клеток при использовании высокоаффинного донора V/V, однако, неожиданно, нефукозилированное антитело SEA-CD70, обладая повышенной ADCC активностью на CD70+ клеточных линиях AML, не индуцирует истощение Treg клеток (ФИГ. 4А). Ни фукозилированные, ни нефукозилированные анти-СD70 антитела не истощают CD8+ клетки независимо от того, используют ли донора V/V с высокой аффинностью (ФИГ. 4B) или донора с низкой аффинностью (ФИГ. 4D).

В отличие от того, что наблюдается для антител, таргетирующих CD70, нефукозилированное анти-TIGIT антитело (обозначенное как SEA Клон 13 IgG1) истощает Treg клетки в большей степени, чем фукозилированное анти-TIGIT антитело (обозначенное как WT Клон 13 IgG1), когда используют либо V/V высокоаффинного донора (ФИГ. 4E), либо низкоаффинного донора (ФИГ. 4G).

Отсутствие истощения Treg SEA-CD70 по сравнению с SGN-70 является неожиданным не только с точки зрения результатов сравнения фукозилированных и нефукозилированных анти-TIGIT антител, но также с учетом публикаций, сообщающих об активности других нефукозилированных антител. Например, в US 2019/0284287 показано, что нефукозилированное анти-CD25 антитело обладает большей активностью ADCC, что приводит к большему лизису и истощению индуцированных Treg (iTreg), чем соответствующее фукозилированное анти-CD25 антитело. Аналогично, патент США № 10,196,445 демонстрирует, что нефукозилированное анти-CTLA4 антитело приводит к лизису и истощению Treg, в то время как соответствующее фукозилированное анти-CTLA4 антитело этого не делает.

Было показано, что истощение Treg может иметь негативные и даже потенциально фатальные последствия. Например, было продемонстрировано, что истощение Treg с помощью дифтерийного токсина приводит к тяжелым аутоиммунным нарушениям на двух моделях мышей. См. Кіт et al. (2009) J. Immunol. 183:7631-7634. Кроме того, резкое удаление популяции клеток Treg может привести к смертельному аутоиммунному заболеванию. См. Кіт et al. (2007) Nat. Immunol. 8(2):191-7.

## Пример 5: Клиническое исследование фазы I SEA-CD70 у пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями

Это открытое многоцентровое исследование фазы 1 с увеличением дозы и расширением когорты, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (РК) и противоопухолевой активности SEA-CD70 у взрослых с миелоидными злокачественными новообразованиями. В настоящем документе оценивают безопасность и эффективность SEA-CD70 у пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями, такими как миелодиспластический синдром (MDS) и острый миелоидный лейкоз (AML). В этом испытании оценивают, какие побочные эффекты возникают, и является ли SEA-CD70 эффективным средством лечения MDS и AML.

Исследование состоит из трех частей, в которых принимают участие 60 человек. Часть А представляет собой когорту повышения дозы, предназначенную для определения максимально переносимой дозы (МТD) или рекомендуемой дозы расширения монотерапии SEA-CD70 у субъектов с рецидивирующим/не поддающимся лечению MDS, например, после неудачного лечения гипометилирующими агентами (недостижение ответа на НМА). Часть В представляет собой расширенную когорту, предназначенную для оценки безопасности и переносимости монотерапии SEA-CD70 у субъектов с

рецидивирующим/не поддающимся лечению MDS, например, после недостижения ответа на НМА. Часть С представляет собой расширенную когорту, предназначенную для оценки безопасности монотерапии SEA-CD70 И переносимости субъектов рецидивирующим/не AML. Субъекты, поддающимся лечению включенные исследование, имеют возраст ≥18 лет, и среди них есть как мужчины, так и женщины. SEA-CD70 вводят в дни 1 и 15 каждого цикла лечения. Все лечебные компоненты вводят внутривенно. Критерии включения и критерии исключения для субъектов, включенных в исследование, показаны в таблице 4.

### Таблица 4. Перечень критериев включения и исключения Часть А. Критерии включения Критерии Субъекты с цитологически/гистологически подтвержденным включения миелодиспластическим синдромом (MDS) в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) со следующим: ○ 5-20% бластов костного мозга. о MDS, который является рецидивирующим или не поддающимся лечению и не должен иметь других доступных терапевтических вариантов, которые, как известно, обеспечивают клиническую пользу при MDS. • Недостижение ответа при лечении после предшествующей терапии MDS гипометилирующим агентом (HMA), определяемое как одно из следующего: ■ Прогрессирование (по критериям Международной рабочей группы [IWG] 2006) в любое время после начала терапии HMA. ■ Отсутствие ответа (неспособность достичь полной ремиссии [CR], частичного ответа [PR] или гематологического улучшения [HI] по критериям IWG 2006) после, по меньшей мере, 6 циклов азацитидина или 4 циклов децитабина. ■ Рецидив после достижения CR, PR или HI (по критериям IWG 2006). ■ Непереносимость НМА (негематологическая токсичность 3 степени или выше, приводящая к прекращению лечения). ■ Субъекты с выделенным 5q-/5q- синдромом должны иметь прогрессирование, отсутствие ответа, рецидив или непереносимость леналидомида в дополнение к НМА. Необходимо прекратить все виды лечения MDS в течение ≥4

недель; факторы роста и переливания разрешены до и во время исследования по клиническим показаниям.

• Функциональный статус по Восточной кооперативной онкологической группе (ECOG) 0-1.

### Часть В. Критерии включения

Субъекты с цитологически/гистологически подтвержденным MDS по классификации BO3 со следующим:

- 5-20% бластов костного мозга.
- MDS, который является рецидивирующим или не поддающимся лечению и не должен иметь других доступных терапевтических вариантов, которые, как известно, обеспечивают клиническую пользу при MDS.
- Недостижение ответа после предшествующей терапии MDS HMA определяется как одно из следующих:
- Прогрессирование (по критериям IWG 2006) в любое время после начала терапии HMA.
- Отсутствие ответа (недостижение CR, PR или HI по критериям IWG 2006) после, по меньшей мере, 6 циклов азацитидина или 4 циклов децитабина.
- Рецидив после достижения CR, PR или HI (по критериям IWG 2006).
- Непереносимость НМА (негематологическая токсичность 3 степени или выше, приводящая к прекращению лечения).
- Субъекты с выделенным 5q-/5q- синдромом должны иметь прогрессирование, отсутствие ответа, рецидив или непереносимость леналидомида в дополнение к НМА.
- Необходимо прекратить все виды лечения MDS (включая HMA) в течение ≥4 недель; факторы роста (например, G-CSF, эритропоэтин и тромбопоэтин) и переливания разрешены до и во время исследования по клиническим показаниям.
- По меньшей мере, одна цитопения (абсолютное количество нейтрофилов [ANC] <1800/мкл или количество тромбоцитов <100000/мкл или гемоглобин [Hgb] <10 г/дл).
- Функциональный статус по ECOG 0-2

Часть С. Критерии включения

- Субъекты с рецидивирующим или не поддающимся лечению острым миелоидным лейкозом (AML) в соответствии с классификацией ВОЗ 2016 (за исключением острого промиелоцитарного лейкоза [APL]):
- Которые получили 2 или 3 предыдущих схемы лечения активного заболевания. Лечение после ремиссии, интратекальная химиотерапия и лучевая терапия не считаются предыдущими схемами.
- Которые получили 1 предыдущую схему лечения активного заболевания и имеют хотя бы одно из следующего:
- Возраст >60 и ≤75 лет.
- Первично-резистентный AML (определяемый как неспособность достичь полного ответа после 1-2 курсов индукционной терапии)
- Продолжительность первого CR <6 месяцев</p>
- Неблагоприятный риск по стратификации генетического риска European LeukemiaNet (ELN) (Dohner 2017)
- Вторичный AML (анамнез MDS или связанный с терапией)
- Возраст 18-75 лет
- Функциональный статус по ECOG 0-2

### Критерии исключения

- Наличие в анамнезе другого злокачественного новообразования в течение 3 лет до первой дозы исследуемого препарата или любых признаков остаточного заболевания от ранее диагностированного злокачественного новообразования. Исключением являются злокачественные новообразования с незначительным риском метастазирования или летального исхода.
- Наличие в анамнезе миелопролиферативного новообразования (MPN), включая хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML)
- Предыдущее воздействие агентов, таргетирующих CD70
- Предшествующая аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при любом состоянии
- Лейкоз центральной нервной системы на основании визуализации или документально подтвержденной положительной цитологии в спинномозговой жидкости
- Любая неконтролируемая вирусная, бактериальная или грибковая инфекция степени 3 или выше в течение 14 дней до первой дозы исследуемого препарата. Допускается антимикробная профилактика

или постоянное лечение разрешающейся/контролируемой инфекции.

- Субъекты, перенесшие серьезное хирургическое вмешательство (определяемое как требующее общей анестезии и госпитализации на срок >24 часов) или серьезное травматическое повреждение, которое, по мнению исследователя, подвергает субъекта неоправданному риску в связи с процедурами исследования, в течение 14 дней до первой дозы исследуемого лечения.
- Положительный результат на гепатит В по экспрессии поверхностного антигена. Активная инфекция гепатита С (положительный результат ПЦР или противовирусная терапия гепатита С в течение последних 6 месяцев). Субъекты, получавшие лечение от инфекции гепатита С, допускаются, если у них задокументирован устойчивый вирусологический ответ в течение 12 недель.
- Известный положительный результат на вирус иммунодефицита человека (HIV)
- Известный активный или латентный туберкулез
- Наличие в анамнезе клинически значимой серповидноклеточной анемии, аутоиммунной гемолитической анемии или идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.
- Наличие в анамнезе клинически значимого хронического заболевания печени (например, цирроза печени) и/или продолжающееся злоупотребление алкоголем.
- Задокументированный анамнез церебрального сосудистого события (инсульта или транзиторной ишемической атаки), нестабильной стенокардии, инфаркта миокарда или сердечных симптомов, соответствующих классу III-IV Нью-Йоркской кардиологической ассоциации, в течение 6 месяцев до первой дозы SEA-CD70.
- Химиотерапия, системная лучевая терапия, биопрепараты, другие противоопухолевые или экспериментальные препараты и/или другое противоопухолевое лечение с иммунотерапией, которое не завершено за 4 недели до первой дозы SEA-CD70. Фокальная лучевая терапия, которая не завершена за 2 недели до первой дозы SEA-CD70. Гидроксимочевину или 6-меркаптопурин, используемые для циторедукции, можно вводить за 24 часа до лечения.

- Субъекты с одним из следующих:
- Состояние, требующее системного лечения либо кортикостероидами (> 10 мг преднизона в день или эквивалентом), либо другими иммунодепрессантами в течение 2 недель после первой дозы SEA-CD70.
- Активное известное или подозреваемое клинически значимое аутоиммунное заболевание или клинически значимая аутоиммунная токсичность, связанная с предшествующей иммуноонкологической терапией.
- Субъекты, которые кормят грудью, беременны или планируют забеременеть с момента информированного согласия до 2 месяцев (монотерапия) или 6 месяцев (комбинированная терапия) после последней дозы исследуемого препарата.
- Известная гиперчувствительность к любому эксципиенту, содержащемуся в лекарственной форме SEA-CD70.
- Расчетная продолжительность жизни <12 недель

Показатели результатов описаны в таблице 5. Все компоненты лечения будут вводиться внутривенно.

Таблица 5. Измерение результатов

Мера результата	Временные рамки
<u>Первичный</u>	
• Количество участников с	• Через 30-37 дней после последней дозы
нежелательными явлениями (АЕ)	SEA-CD70; примерно до 2 лет
• Количество участников с	• Через 30-37 дней после последней дозы
лабораторными отклонениями	SEA-CD70; примерно до 2 лет
• Количество участников с	• Несмотря на окончание периода оценки
дозолимитирующей токсичностью (DLT)	DLT; примерно до 2 недель
при каждом уровне дозы (только часть А)	
<u>Средний</u>	
• Площадь под кривой зависимости	• Через 30-37 дней после последней дозы
концентрации в плазме от времени	SEA-CD70; примерно до 2 лет
• Время достижения максимальной	• Через 30-37 дней после последней дозы
концентрации	SEA-CD70; примерно до 2 лет
• Максимальная наблюдаемая	• Через 30-37 дней после последней дозы
концентрация в плазме	SEA-CD70; примерно до 2 лет

- Минимальная концентрация в плазме на интервал дозирования
- Период полувыведения в конечной фазе
- Антилекарственные антитела
- Частота полной ремиссии (CR)
- Полная ремиссия с уровнем неполного восстановления тромбоцитов (CRi)
- Полная ремиссия с частичным гематологическим восстановлением (CRh)
- Скорость гематологического ответа (HI)
- Частота объективного ответа (ORR)
- Скорость клиренса бластов
- Продолжительность ответа (DOR)
- Общая выживаемость (ОС)
- Бессобытийная выживаемость (EFS)
- Минимальная остаточная болезнь (MRD) отрицательный ORR
- Время ответа (TTR)
- Скорость перехода к независимости от переливания
- Сохранение TI

- Через 30-37 дней после последней дозы SEA-CD70; примерно до 2 лет
- Через 30-37 дней после последней дозы SEA-CD70; примерно до 2 лет
- Через 30-37 дней после последней дозы SEA-CD70; примерно до 2 лет
- Примерно до 4 лет

## Пример 6: Дозозависимые эффекты h1F6SEA на выживаемость в мышиной модели Raji NHL лимфомы Беркитта.

Исследования показали, что острый миелоидный лейкоз (AML) и миелодиспластическая болезнь (MDS) экспрессируют CD70 и его рецептор CD27. Целью этого исследования является проверить выживаемость животных в ответ на анти-CD70 моноклональное антитело SEA-CD70 (h1F6SEA). Выживаемость животных оценивают в ответ на введение SEA-CD70 в мышиной модели ксенотрансплантата экспрессирующих CD70 клеток, модели Raji NHL-Буркитта.

Мышам SCID имплантируют 1х10<sup>6</sup> клеток Raji внутривенно в хвостовую вену в нулевой день. Через один день после имплантации, животных рандомизируют в группы лечения по восемь мышей в группе. Животным вводят дозу один раз в день каждые четыре дня в течение 4 циклов (Q4dx4) h1F6SEA в дозах 0,3, 1 и 3 мг/кг в 1 день после имплантации опухоли внутрибрюшинно. Исходную концентрацию антител разводят до

соответствующей концентрации и вводят животным в дозе 10 мкл/г массы тела. Затем животных контролируют на наличие симптомов заболевания. За животными наблюдают до появления симптомов заболевания, после чего их усыпляют. Анализ животных проводят с течением времени, и животных умерщвляют, когда у них проявляются симптомы заболевания. Медиана выживаемости животных в группе, не получавшей лечение, составляет 20 дней, в то время как у животных, получавших 0,3 мг/кг h1F6SEA, продолжительность жизни прогрессирует до 36,5 дней, и у животных, получавших 1 или 3 мг/кг, прогрессирует до 68 и 69,5 дней после имплантации. Общее количество животных в каждой группе в отдельные дни исследования показано в таблице 6. Долю выживаемости рассчитывают для животных во всех группах лечения (ФИГ. 5). График Каплана-Мейера показывает значительное увеличение доли выживаемости между обработанными и необработанными животными, а также реакцию на дозу между 0,3 мг/кг и 1 или 3 мг/кг (ФИГ. 5). Долю выживаемости определяют количественно в течение экспериментальных дней для всех групп лечения, включая дозы h1F6SEA 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг. Лечение мышей h1F6SEA повышает выживаемость по сравнению с нелеченными мышами (ФИГ. 5).

Таблица 6. Результаты Каплана-Мейера по противоопухолевой активности h1F6SEA в модели Raji NHL лимфомы Буркитта.

Дни	Нелеченные	NHL лимфомы Бурки h1F6SEA 0,3 мг/кг	h1F6SEA 1 мг/кг	h1F6SEA 3 мг/кг
0	8	8	8	8
5		8		
19	8			
20	5			
22	3			
23	1		8	
25				
28				8
30			7	
31				
33		7		7
35		6		
36		5		
37		4		
44				
46				
54			6	
61			5	

64			5
69	3		
75		4	4
79			
90	2	3	3

Пример 7. Дозозависимые эффекты h1F6SEA на рост опухоли в мышиной модели острого миелоидного лейкоза MV411.

В этом исследовании, рост опухоли в ответ на введение анти-CD70 антитела SEA-CD70 (h1F6SEA) оценивают на мышиной модели ксенотрансплантата клеток, экспрессирующих CD70, линии MV-411, модели острого миелоидного лейкоза. Рост опухоли записывают в виде объема и рассчитывают как среднее по животным в каждой группе лечения (ФИГ. 6), а также записывают для каждого индивидуума в каждой группе лечения (ФИГ. 7A-D, таблица 7). Ежедневные объемы опухолей (мм³) у отдельных животных в различных группах лечения суммированы в таблице 7.

Мышам SCID имплантируют  $5x10^6$  клеток MV-411 подкожно в бок на 0 день. По достижении среднего размера опухоли 50 мм<sup>3</sup> (измеренного с применением формулы: Объем  $(mm^3)=0.5*длину*ширину^2$ , где длина является большим размером), мышей рандомизируют в группы лечения по шесть мышей в группе. Животных лечат на группу лечения; группы, получающие антитело, лечат каждые 4 дня в течение четырех циклов, животных, получающих азацитидин, лечат каждые 4 дня в течение четырех циклов. Лечение проводят внутрибрюшинно. Исходные концентрации антитела и химиопрепарата разводят до соответствующей концентрации и вводят животным по 10 мкл/г массы тела. Длину и ширину опухоли, а также массу животного измеряют два раза в неделю на протяжении всего исследования, и объем опухоли рассчитывают по приведенной выше формуле. За животными наблюдают до тех пор, пока объем опухоли не достигает ~1000 мм<sup>3</sup>, после чего животных подвергают эвтаназии. Животным вводят дозы по различным схемам, основанным на лечении, полученном через девять дней после имплантации опухоли; животных, получающих антитело, лечат Q4dx4, и животным, получающим азацитидин, вводят дозу один раз в день каждые четыре дня, всего четыре цикла (Q4dx4). Анализ изменений объема опухоли с течением времени показывает умеренную задержку опухоли по сравнению с животными в группе, не получающей лечение, или животными, которых лечат несвязывающими антителами (ФИГ. 6 и ФИГ. 7А-D). Если посмотреть на время, которое требуется для того, чтобы опухоли в каждой группе достигли 10х изменения, без лечения в среднем требуется 26,8 дней, в то время как в группе, получающей 10 мг/кг h1F6SEA, в среднем требуется 32,65 дня, что представляет собой 18% задержку роста опухоли (ФИГ. 6 и ФИГ. 7А-D). Однако это может быть дольше, поскольку одно животное так и не достигло 10х изменения. Животные, получающие азацитидин (обозначенные как Видаза на ФИГ. 6, ФИГ. 7D и Таблице 7), также демонстрируют задержку роста 33,68 дней до достижения 10х изменения, 20,5% задержку

роста опухоли (Фиг. 6 и ФИГ. 7A-D). Следует также отметить, что у одной мыши в группе, получающей h1F6SEA в дозе 10 мг/кг, наблюдается очень выраженная задержка роста опухоли, что увеличивает продолжительность исследования (ФИГ. 7A и таблица 7).

Таблица 7. Противоопухолевая эффективность h1F6SEA, h1F6G1V1, h00SEA и Видаза на модели острого миелоидного лейкоза MV-411.

Дни после имплантации	_		Нелеченн	ые					h1F6SEA 1	IO мг/кг		
. 9	0.0	50.3	56.9	54.4	58.3	50.7	52.1	54.1	58.6	51.0	59.2	59.0
13	66.3	81.3	70.8	94.2	94.7	50.1	48.7	68.7	59.9	47.1	56.4	72.6
16	95.4	116.4	81.8	116.8	135.7	76.8	90.8	83.5	67.6	65.3	60.4	98.2
20	146.2	203.7	155.1	240.6	271.7	117.9	151.0	142.8	93.1	63.1	42.0	165.9
24	279.6	326.0	224.0	489.0	633.3	179.0	336.7	299.1	165.4	161.4	70.9	266.6
27	522.2	616.5	453.6	670.7	871.2	268.4	447.0	337.6	231.0	254.6	0.0	392.1
30	813.3	1012.1	766.1	1060.9	1090.0	464.8	831.7	494.8	365.1	352.6	0.0	661.5
34	1099.2		1163.4			773.7	1042.3	655.6	531.6	666.1	15.4	998.9
38								1005.8	751.7	988.1	63.1	
41									1024.7		66.6	
Дни после												
имплантации			h1F6G1V1						h00SEA 2			
9	48.0	62.8	51.3	49.1	52.1	58.2	55.5	60.3	51.0	52.6	56.3	50.1
13	46.1	64.4	65.7	61.5	56.8	65.4	65.1	62.5	101.8	76.4	72.8	43.4
16	59.3	109.1	97.7	68.1	64.7	103.8	76.7	94.2	131.0	106.9	70.D	34.3
20	91.5	234.8	241.3	80.6	104.4	127.2	73.6	135.4	287.0	199.5	126.6	75.5
24	188.7	449.2	338.1	96.3	198.9	274.9	90.9	234.5	499.1	349.4	215.2	165.8
27	306.6	606.7	567.6	213.6	325.4	433.0	154.9	490.1	905.1	544.0	364.4	344.4
30	474.6	1156.6	1039.1	325.4	470.6	847.7	202.6	649.0	1112.9	872.9	589.5	497.7
34	782.9			709.0	1001.0	1081.8	432.6	1062.8		1321.2	801.4	1034.7
38	1269.5			1330.9			696.2				1203.9	
41							1109.2					
Дни после		_	_									
имплантации	45.6		идаза 5 мг/									
9	45.0	50.0	49.9	57.6	59.5	55.2						
13	47.9	47.5	73.3	50.9	84.1	65.6						
16	35.9	42.5	48.9	47.2	99.2	70.8						
20	45.2	47.1	86.6	69.9	162.6	63.4						
24	74.2	66.4	136.7	125.0	301.0	92.0						
27	141.5	129.0	344.5	295.9	465.4	202.5						
30	161.8	130.7	469.6	379.5	778.9	279.0						
34	303.9	260.2	649.8	640.9	1238.8	451.9						
38	568.7	452.8	1164.6	993.8		740.5						
41	978.2	688.1				1063.7						

Пример 8. Оценка активности ADCP, опосредованной SEA-CD70 и SGN-CD70, в отношении клеточных линий AML.

АDCP, опосредованную SEA-CD70 и SGN-CD70 (также называемую SGN-70), определяют с использованием клеток-мишеней CD70+ (NOMO-1 и MOLM-13), загруженных липофильным флуоресцентным красителем и смешанных с макрофагами, полученными из моноцитов, в течение ночи. Фагоцитоз флуоресцентно меченных клеток-мишеней определяют методом проточной цитометрии. Фагоцитоз измеряют по появлению совпадающих событий с двойной меткой (флуоресцентные клетки-мишени) и анти-CD11с положительности для идентификации моноцитов/макрофагов. Макрофаги легко фагоцитируют клетки-мишени, покрытые либо SEA-CD70, либо SGN-CD70 в зависимости от дозы антитела (ФИГ.8А и ФИГ.8В). SEA-CD70 и SGN-CD70 опосредуют фагоцитоз до аналогичных уровней.

Следующий протокол используют для оценки активности ADCC на клеточных линиях AML:

1. Клетки-мишени метят с использованием мини-набора красного флуоресцентного линкера PKH26 (Sigma Aldrich) и следуя инструкциям производителя.

- 2. Клетки (4000 клеток/лунку) инкубируют с указанными тестируемыми образцами в течение 30 минут, промывают и ресуспендируют в RPMI плюс 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG.
- 3. Макрофаги, происходящие из PBMC (100000 клеток/лунку), полученные путем инкубации моноцитов, происходящих из PBMC, с 500 ЕД/мл (50 нг/мл) GM-CSF в течение 10-12 дней, добавляют к клеткам-мишеням и инкубируют при 37°C в течение 2 часов.
- 4. Планшеты центрифугируют, клетки ресуспендируют в 100 мкл антитела APC-CD11 (маркер макрофагов) и инкубируют на льду в течение 30 минут.
- 5. Клетки промывают, ресуспендируют в PBS и анализируют с помощью проточной цитометрии для определения доли фагоцитоза.

## Пример 9. Оценка активности CDC, опосредованной SEA-CD70 и SGN-CD70, в отношении клеточных линий AML.

SEA-CD70 и SGN-CD70 дополнительно тестируют способность на ИХ индуцировать лизис клеток путем связывания комплемента. Клеточные линии АМL, положительные на CD70, флуоресцентно метят и обрабатывают увеличивающимися концентрациями анти-CD70 антител. Затем клетки подвергают воздействию человеческого комплимента, и лизис определяют как высвобождение флуоресцентного красителя. Линии клеток CD70+ AML MOLM-13 и NOMO-1 лизируют антителоспецифическим дозозависимым образом при покрытии либо SEA-CD70, либо SGN-CD70 в присутствии нормальной человеческой сыворотки, которая не инактивирована нагреванием (ФИГ. 9А и 9В).

Для оценки активности CDC на клеточных линиях AML используют следующий протокол:

- 1. Клетки инкубируют со смесью 10 мг/мл анти-CRP моноклональных антител (анти-hCD46, анти-hCD55, анти-hCD59) в течение 30 минут на льду.
- 2. Клетки промывают и высевают (200000 клеток/лунку) в среду, содержащую не инактивированную нагреванием сыворотку, Sytox Green (Life technology) и антитела, которые добавляют в указанной конечной концентрации, на 2 часа при 37°С.
- 3. Мертвые клетки количественно определяют путем обнаружения флуоресцентного сигнала Sitox Green на планшетном ридере Envison (Perkin Elmer) и нормализуют относительно положительного контроля (клетки, обработанные 1% Triton X-100).

# Пример 10. Влияние комбинации SEA-CD70 и азацитидина на рост опухоли в мышиной модели ксенотрансплантата AML MV411

В этом исследовании, рост опухоли в ответ на введение нефукозилированного анти-CD70 антитела SEA-CD70 (h1F6SEA) отдельно или в комбинации с азацитидином (VIDAZA®) оценивают в мышиной модели с ксенотрансплантатом экспрессирующих CD70 клеток MV4-11. Рост опухоли записывают в виде объема и рассчитывают как среднее значение для животных в каждой группе лечения (ФИГ. 10). Мышам SCID имплантируют  $5 \times 10^6$  клеток MV4-11 подкожно в бок в 0 день. По достижении среднего

размера опухоли 50  $\text{мм}^3$  (измеренном по формуле: Объем ( $\text{мм}^3$ )=0,5\*длину\*ширину<sup>2</sup>, где длина представляет собой наиболее длинное измерение), мышей случайным образом распределяют по группам лечения по 9 мышей в группе. Лечение проводят внутрибрюшинно. Исходные концентрации антитела и химиопрепарата разводят до соответствующей концентрации и вводят животным по 10 мкл/г массы тела. Длину и ширину опухоли, и массу животного измеряют два раза в неделю на протяжении всего исследования, и объем опухоли рассчитывают по приведенной выше формуле. За животными наблюдают до тех пор, пока объем опухоли не достигает ~1000 мм<sup>3</sup>, после чего животных подвергают эвтаназии. Животным вводят дозы по различным схемам в зависимости от полученного лечения; животных, получающих антитела, лечат дозой 10 мг/кг (Q4dx5), животным, получающим азацитидин, вводят дозу один раз в день в течение пяти дней подряд (азацитидин 2 мг/кг; Q1dx5) в общей сложности 3 цикла (3 недели), животные, получающие комбинацию обработок, получают каждую обработку в той же дозе и схеме, что и отдельные обработки. Анализ изменений объема опухоли с течением времени показывает, что как азацитидин, так и SEA-CD70 уменьшают рост опухоли по сравнению с контрольными нелеченными животными. Кроме того, когда животных лечат комбинацией SEA-CD70 и азацитидина, наблюдают дальнейшее увеличение задержки развития опухоли по сравнению как с животными, не получавшими лечения, так и с однократным лечением SEA-CD70 или азацитидином (ФИГ. 10). Как и ожидалось, лечение антителами SEA-CD70 G1V1, которые несут мутации в доменах Fc, снижающие связывание с рецепторами Fсгамма (E233P, L234V, L235A) (см. McEarchern et al., 2008, Clin. Cancer Res. 14(23):7763-72; Armour et al., 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613-2624) He является эффективным для снижения роста опухоли. Неожиданно, когда SEA-CD70 G1V1 комбинируют с азацитидином, наблюдается значительная задержка роста опухоли (ФИГ. 10). Не желая быть связанными какой-либо теорией, механизм, лежащий в основе такого наблюдения, может быть связан с изменениями экспрессии CD70 или CD27, вызванными лечением азацитидином, или ингибированием передачи сигналов CD27/CD70. Если посмотреть на время, которое потребовалось для того, чтобы опухоли в каждой группе достигли 10х изменения, у нелеченных животных это занимает в среднем 17,82 дня, в то время как группе, получающей SEA-CD70, требуется в среднем 25,08 дня, т. е. задержка роста опухоли на 31% (РИС. 10). У животных, получающих азацитидин, также наблюдается задержка роста, которая достигает 10х изменения в течение 26,59 дней, т.е. задержка роста опухоли на 33% по сравнению с нелеченным контролем (ФИГ. 10). У животных, получающих комбинацию азацитидина и SEA-CD70, требуется в среднем 33,81 дня для достижения 10х увеличения (47,3% задержки роста опухоли) (ФИГ. 10), что указывает на то, что комбинация SEA-CD70 и азацитидина эффективно задерживает рост опухоли по сравнению с двумя агентами, используемыми в качестве отдельных агентов.

Пример 11. Влияние SEA-CD70 в комбинации с азацитидином, венетоклаксом (ABT-199) или обоими (азацитидином+венетоклаксом) на рост опухоли в мышиной модели ксенотрансплантата AML MV4-11.

В этом исследовании, рост опухоли в ответ на введение афукозилированного анти-CD70 антитела SEA-CD70 (h1F6SEA) отдельно или в комбинации с азацитидином (VIDAZA®), венетоклаксом (VENCLEXTA®; ABT-199) или SEA-СD70+азацитидином+венетоклаксом (тройная комбинация) оценивают на мышиной модели линии MV4-11 с ксенотрансплантатом экспрессирующих CD70 клеток. Рост опухоли записывают в виде объема и рассчитывают как среднее значение для животных в каждой группе лечения (ФИГ. 11A). Мышам SCID с ослабленным иммунитетом имплантируют  $5 \times 10^6$  клеток MV4-11 подкожно в бок на 0 день. По достижении среднего размера опухоли 50  $\text{мм}^3$  (измеренном по формуле: Объем ( $\text{мм}^3$ )=0,5\*длину\*ширину<sup>2</sup>, где длина представляет собой наиболее длинное измерение), мышей случайным образом распределяют по группам лечения по 10 мышей в группе. Исходные концентрации антитела и химиопрепарата разводят до соответствующей концентрации и вводят животным по 10 мкл/г массы тела. Длину и ширину опухоли, и массу животного измеряют два раза в неделю на протяжении всего исследования, и объем опухоли рассчитывают по приведенной выше формуле. За животными наблюдают до тех пор, пока объем опухоли не достигает ~1000 мм<sup>3</sup>, после чего животных подвергают эвтаназии. Животным вводят дозы по различным схемам в зависимости от полученного лечения; животных, получающих антитело, лечат 10 мг/кг антитела (Q4dx5), животным, получающим азацитидин, ежедневно вводят дозу (2 мг/кг) в течение пяти последовательных дней (Q1dx5) каждую неделю, всего 3 цикла (3 недели); венетоклакс вводят в дозе 25 мг/кг каждый день через желудочный зонд в течение 21 дня подряд (Q1dx21). Животное, получающее комбинацию обработок, получает каждую обработку в той же дозе и по схеме, что и при одиночной обработке.

Как показано на ФИГ. 11А, лечение SEA-CD70, азацитидином и венетоклаксом задерживает рост опухоли при дозировании в виде отдельных агентов. Примечательно, что добавление SEA-CD70 либо к азацитидину, либо к венетоклаксу значительно снижает рост опухоли по сравнению с относительным лечением одной группы (p<0,05 в обоих сравнениях на 39 день, двухсторонний ANOVA). Комбинация венетоклакс+азацитидин также дополнительно ингибирует рост опухоли по сравнению с отдельными агентами (p<0,01 и p<0,001 по сравнению с отдельными группами азацитидина или венетоклакса соответственно на 39 день, двухсторонний ANOVA).

Добавление SEA-CD70 к венетоклаксу и азацитидину (тройная комбинация) дополнительно замедляет рост опухоли по сравнению с комбинацией двух агентов (p=0,0594 на 39 день, двухфакторный ANOVA). На 46 день в группе комбинации азацитидин+венетоклакс средний размер опухоли составляет  $349.9 \pm 141.7$  мм³ (среднее значение  $\pm$  COC), тогда как в группе тройной комбинации средний размер опухоли составляет  $85 \pm 11.09$  мм³ (среднее значение  $\pm$  COC) (p<0,05; односторонний t-критерий). Как показано на ФИГ. 11В, при наблюдении за кривыми роста опухоли отдельного животного, у пяти животных, получающих комбинацию венетоклакс+азацитидин, на 56 день достигается 10x увеличение объема опухоли, в то время как только одно животное,

получающее тройную комбинацию, достигает 10х порога на момент прерывания эксперимента.

В целом, эти результаты показывают, что при добавлении к стандартным средствам лечения (азацитидин, венетоклакс или комбинация азацитидин+венетоклакс) SEA-CD70 дополнительно замедляет рост опухоли.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Способ лечения экспрессирующего CD70 рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нефукозилированного анти-CD70 антитела, где указанный способ приводит к истощению раковых клеток у субъекта, где указанный способ не приводит к истощению CD70+ T-регуляторных клеток (CD70+ Treg) у субъекта, где анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определены по схеме нумерации Kabat, и Fc домен, и где рак выбран из группы, состоящей из миелодиспластического синдрома (MDS) и острого миелоидного лейкемия (AML).
- 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.
- 3. Способ по п.1, отличающийся тем, что анти-CD70 антитело имеет вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.
- 4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что Fc домен представляет собой эффекторный домен антитела, опосредующий одну или более из антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и комплементзависимой клеточной цитотоксичности (CDC).
- 5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что Fc домен представляет собой эффекторный домен антитела, опосредующий ADCC.
- 6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что Fc домен представляет собой Fc домен человека.
- 7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что анти-CD70 антитело представляет собой ворсетузумаб.
- 8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что антитело конъюгировано с терапевтическим агентом.
- 9. Способ по п.8, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент или иммуномодулирующий агент.
- 10. Способ по п.8, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.
- 11. Способ по п.10, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой монометилауристатин E (MMAE) или монометилауристатин F (MMAF).
- 12. Способ по п.8, отличающийся тем, что терапевтическое средство представляет собой иммуномодулирующее средство.

- 13. Способ по любому из пп. 1-12, включающий введение популяции анти-CD70 антител, где каждое антитело в популяции анти-CD70 антител содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определены по схеме нумерации Kabat, и Fc домен, где, по меньшей мере, 50% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител лишены корового фукозилирования.
- 14. Способ по п.13, отличающийся тем, что по меньшей мере 70% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител лишены корового фукозилирования.
- 15. Способ по п.13, отличающийся тем, что по меньшей мере 90% анти-CD70 антител в популяции анти-CD70 антител лишены корового фукозилирования.
- 16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что рак представляет собой MDS.
- 17. Способ по п.16, отличающийся тем, что MDS представляет собой рецидивирующий или не поддающийся лечению MDS.
- 18. Способ по п.17, отличающийся тем, что субъект не достиг успеха после предшествующей терапии MDS гипометилирующим агентом (HMA).
- 19. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что рак представляет собой AML.
- 20. Способ по п.19, отличающийся тем, что AML является рецидивирующим или не поддающимся лечению AML.
- 21. Способ по п.20, отличающийся тем, что субъект ранее получил 2 схемы лечения для лечения AML.
- 22. Способ по п.20, отличающийся тем, что субъект ранее получил 3 схемы лечения для лечения AML.
- 23. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что по меньшей мере примерно 0,1%, по меньшей мере примерно 1%, по меньшей мере примерно 2%, по меньшей мере примерно 3%, по меньшей мере примерно 4%, по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 6%, по меньшей мере примерно 7%, по меньшей мере примерно 8%, по меньшей мере примерно 9%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 70% или по меньшей мере примерно 80% раковых клеток экспрессируют CD70.
- 24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что введение субъекту нефукозилированного анти-CD70 антитела приводит к истощению раковых клеток по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 6%, по меньшей мере примерно на 9%, по меньшей мере примерно на 9%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%,

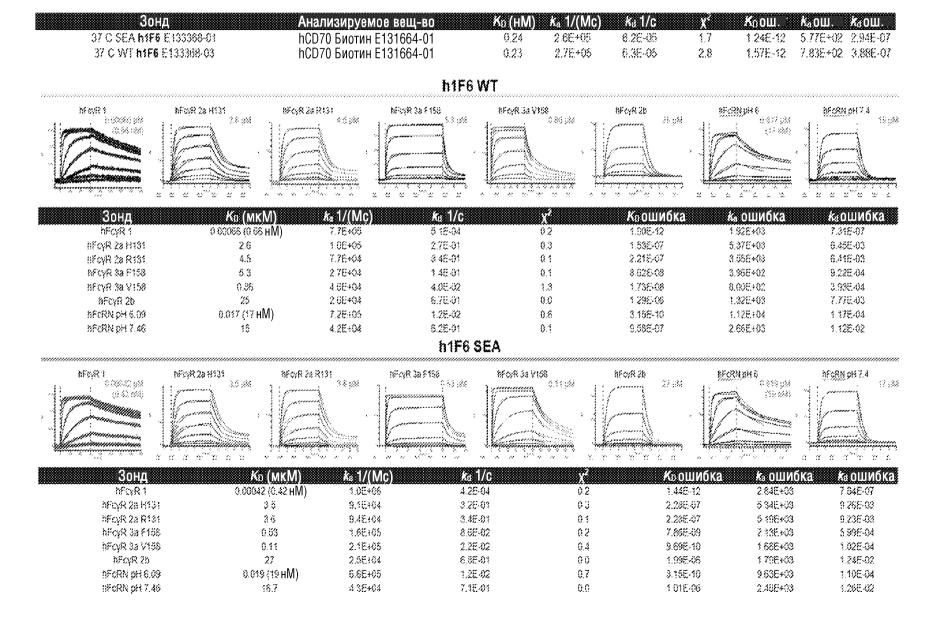
по меньшей мере примерно на 35%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 45%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95% или примерно на 100% по сравнению с количеством раковых клеток перед введением субъекту нефукозилированного анти-CD70 антитела.

- 25. Способ по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что введение субъекту нефукозилированного анти-CD70 антитела приводит к истощению CD70+ Treg не более чем примерно на 20%, примерно на 10%, примерно на 9%, примерно на 8%, примерно на 7%, примерно на 6%, примерно на 5%, примерно на 4%, примерно на 3%, примерно на 2%, примерно на 1% или примерно на 0,1% по сравнению с количеством CD70+ Treg перед введением афукозилированного анти-CD70 антитела субъекту.
- 26. Способ по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что один или более терапевтических эффектов у субъекта улучшаются после введения нефукозилированного анти-CD70 антитела по сравнению с исходным уровнем.
- 27. Способ по п.26, отличающийся тем, что один или более терапевтических эффектов выбраны из группы, состоящей из: объективной частоты ответа, продолжительности ответа, времени до ответа, выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости.
- 28. Способ по любому из пп.1-27, отличающийся тем, что частота объективных ответов составляет по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70% или по меньшей мере примерно 80%.
- 29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что субъект демонстрирует выживаемость без прогрессирования заболевания в течение по меньшей мере примерно 1 месяца, по меньшей мере примерно 2 месяцев, по меньшей мере примерно 3 месяцев, по меньшей мере примерно 5 месяцев, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 7 месяцев, по меньшей мере примерно 8 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере примерно 10 месяцев, по меньшей мере примерно 11 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно двух лет, по меньшей мере примерно трех лет, по меньшей мере примерно четырех лет или по меньшей мере примерно пяти лет после введения нефукозилированного анти-CD70 антитела.
- 30. Способ по любому из пп. 1-29, где общая выживаемость субъекта составляет по меньшей мере примерно 1 месяц, по меньшей мере примерно 2 месяца, по меньшей мере примерно 3 месяца, по меньшей мере примерно 4 месяца, по меньшей мере примерно 5 месяцев, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мер, примерно 7 месяцев, по

меньшей мере примерно 8 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере примерно 10 месяцев, по меньшей мере примерно 11 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере примерно два года, по меньшей мере примерно три года, по меньшей мере примерно четыре года или ПО меньшей мере примерно введения пять лет после нефукозилированного анти-СD70 антитела.

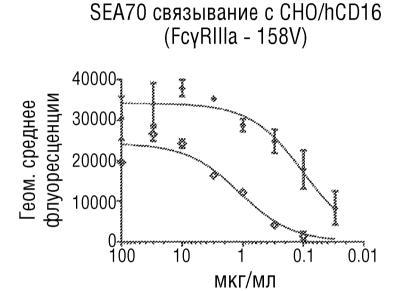
- 31. Способ по любому из пп.1-30, отличающийся тем, что продолжительность ответа на анти-CD70 антитело составляет по меньшей мере примерно 1 месяца, по меньшей мере примерно 2 месяца, по меньшей мере примерно 3 месяца, по меньшей мере примерно 4 месяца, по меньшей мере примерно 5 месяцев, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 7 месяцев, по меньшей мере примерно 8 месяцев, по меньшей мере примерно 10 месяцев, по меньшей мере примерно 11 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно восемнадцать месяцев, по меньшей мере примерно два года, по меньшей мере примерно три года или по меньшей мере примерно пять лет после введения нефукозилированного анти-CD70 антитела.
- 32. Способ по любому из пп.1-31, отличающийся тем, что путь введения анти-CD70 антитела является внутривенным.
- 33. Способ по любому из пп.1-32, отличающийся тем, что субъектом является человек.
- 34. Способ по любому из пп.1-33, отличающийся тем, что анти-CD70 антитело вводят в комбинации с азацитидином.
- 35. Способ по любому из пп.1-33, отличающийся тем, что анти-CD70 антитело вводят в комбинации с венетоклаксом.
- 36. Способ по любому из пп.1-33, отличающийся тем, что анти-CD70 антитело вводят в комбинации с азацитидином и венетоклаксом.
- 37. Способ по любому из пп.1-35, отличающийся тем, что анти-CD70 антитело вводят в комбинации с фторхинолоном.
- 38. Фармацевтическая композиция для лечения экспрессирующего CD70 рака, содержащая нефукозилированное анти-CD70 антитело, где анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определены по схеме нумерации Kabat, и Fc домен, и по меньшей мере один фармацевтически совместимый ингредиент, где композиция предназначена для применения в способе по любому из пп. 1-37.
- 39. Набор, содержащий нефукозилированное анти-CD70 антитело, где анти-CD70 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:1, вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO:2, где CDR анти-CD70 антитела определены по схеме нумерации Kabat, и Fc домен, и инструкции по применению анти-CD70 антитела в способе по любому из пп. 1-37.

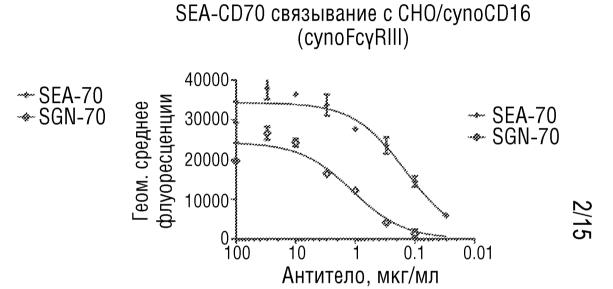
## ФИГ.1



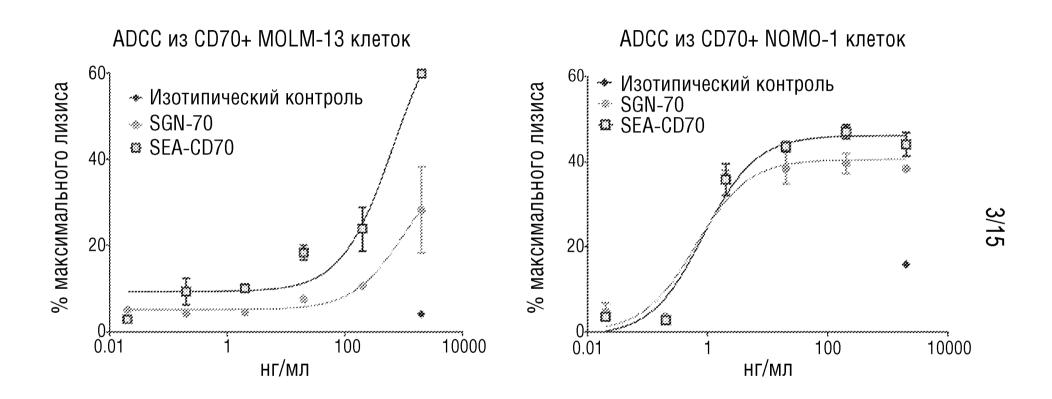
ФИГ.2А

ФИГ.2В

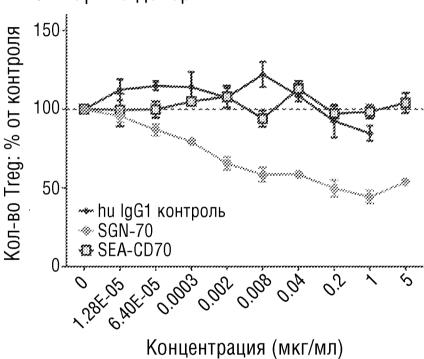




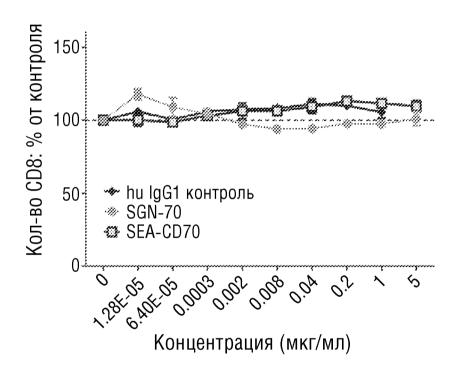
ФИГ.ЗА ФИГ.ЗВ



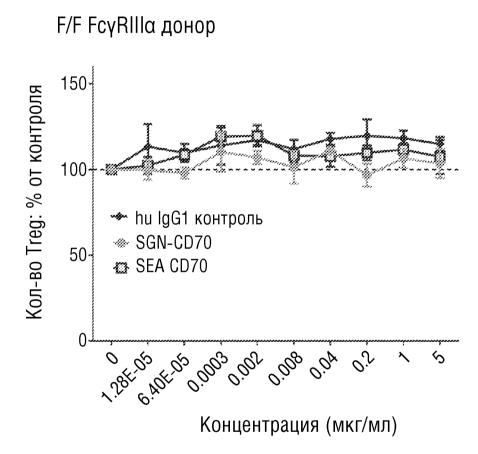


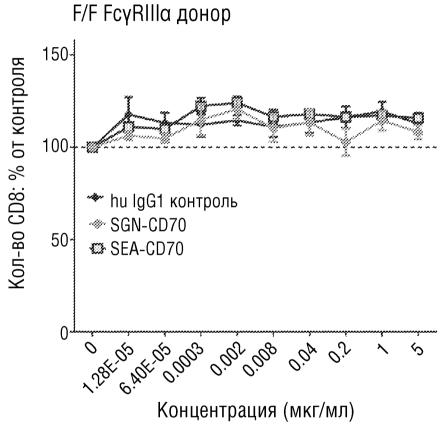


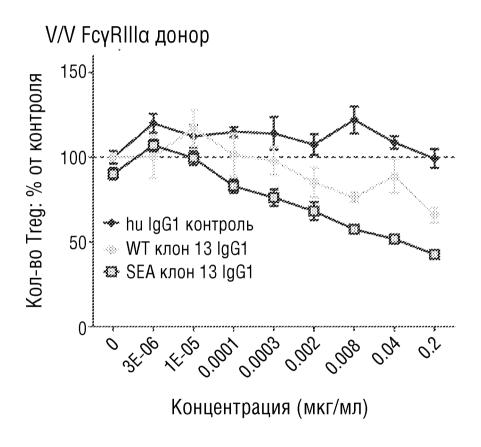
## V/V FcyRIIIа донор

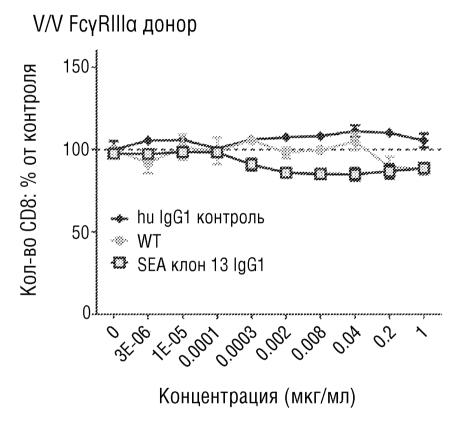


4/15



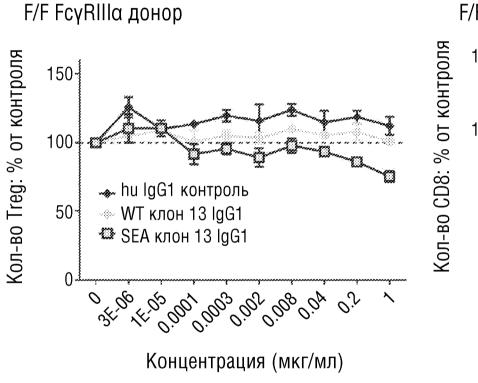


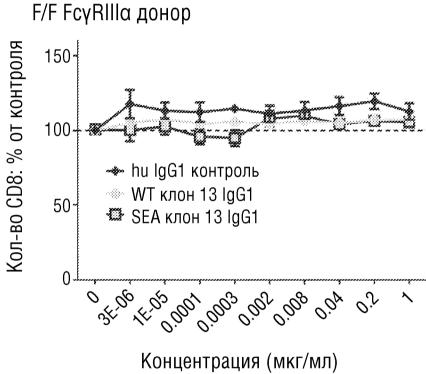


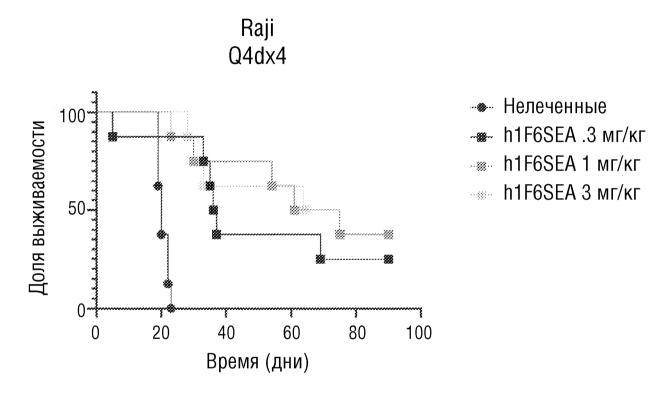


6/15

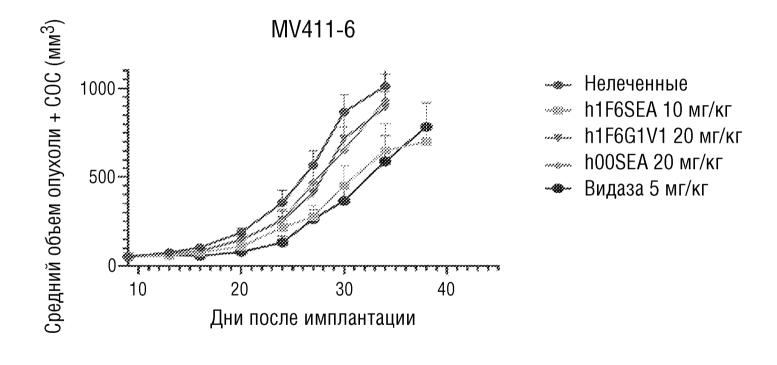


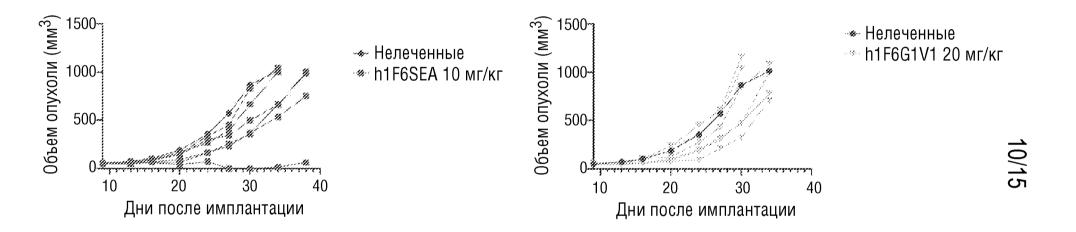


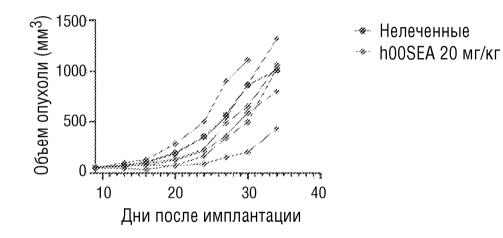


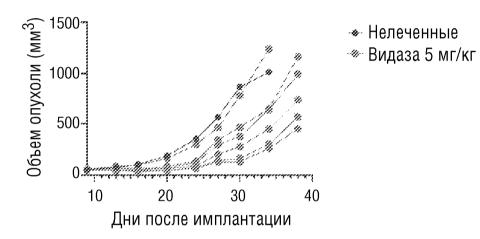




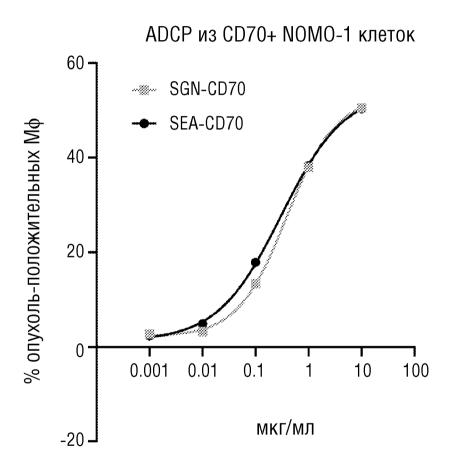


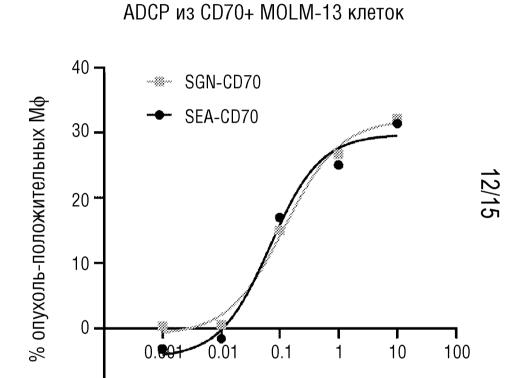






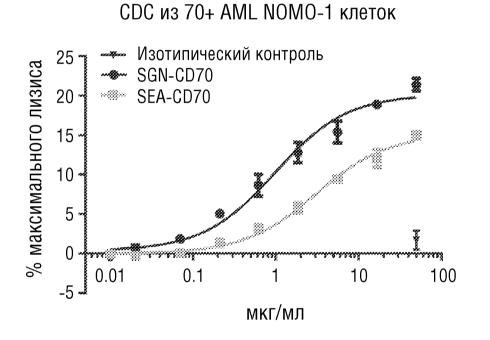
-10 ---

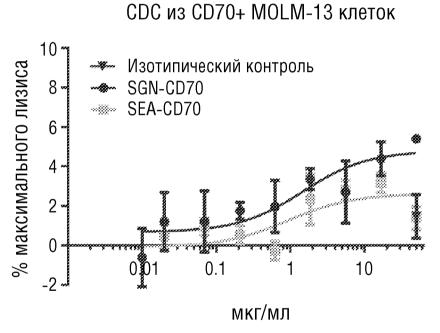


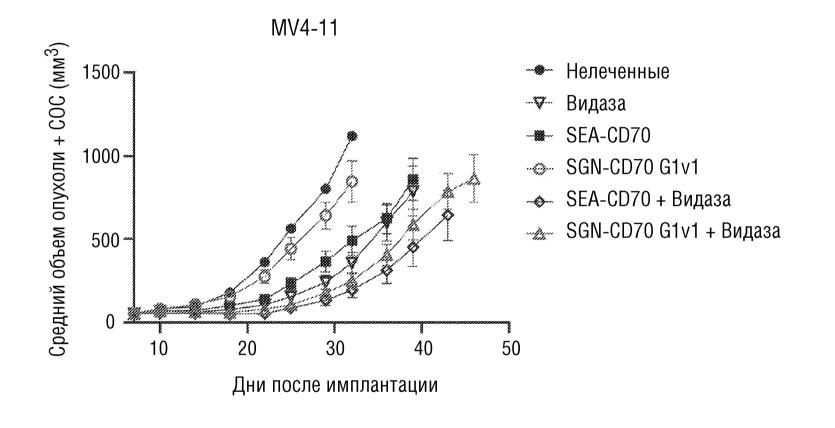


мкг/мл

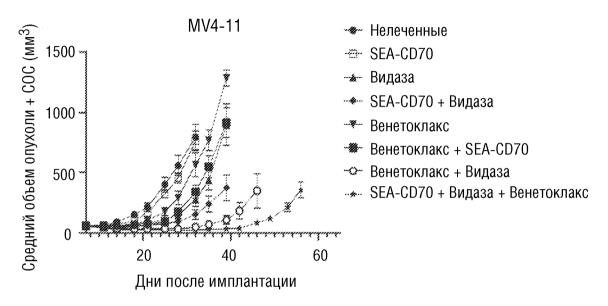








## ФИГ.11А



ФИГ.11В

