



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119539** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 17/14** (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2016 02538**

(22) Дата подання заявки: **20.08.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.07.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/869,510, 61/907,749, 13198784, 61/990,475**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **23.08.2013, 22.11.2013, 20.12.2013, 08.05.2014**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US, EP, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **11.07.2016, Бюл.№ 13**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2019, Бюл.№ 13**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2014/051790, 20.08.2014**

(72) Винахідник(и):
**Бонвіні Езю (US),
Джонсон Леслі С. (US),
Хуан Лін (US),
Мур Пол А. (US),
Чічілі Гурунадх Редді (US),
Алдерсон Ральф Фроман (US)**

(73) Власник(и):
**МАКРОДЖЕНІКС, ІНК.,
9640 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America (US)**

(74) Представник:
Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457

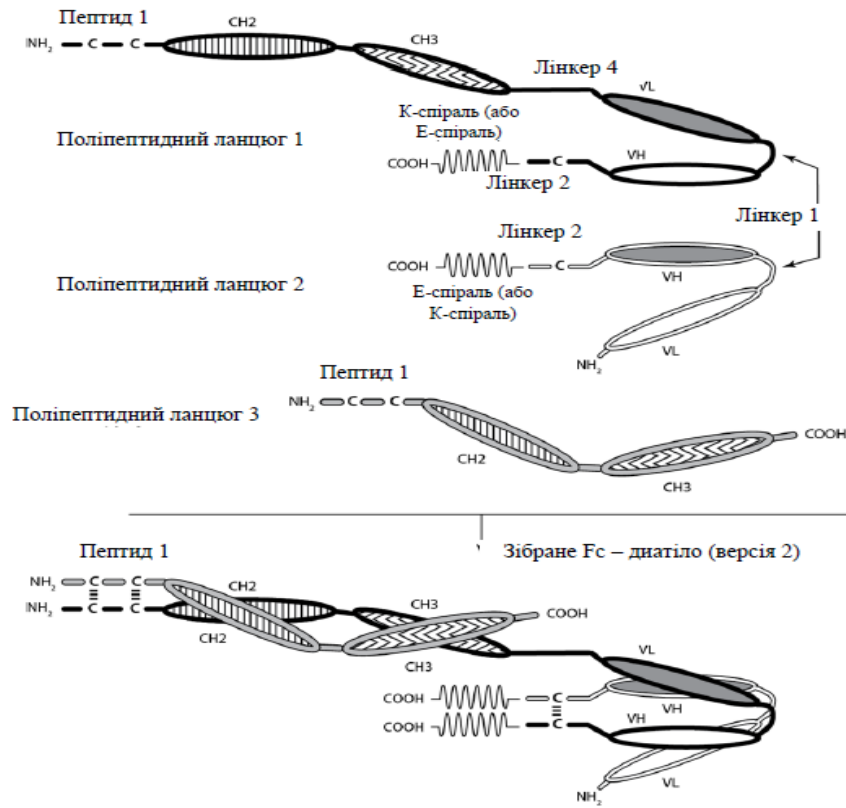
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
High resolution NMR-based model for the structure of a scFv- IL-1-beta complex: potential for NMR as a key tool in therapeutic antibody design and development / Ian C. Wilkinson, Catherine J. Hall, Vaclav Veverka et al. // J. biol. chem. – 2009. - Vol. 284. – no. 46. – P. 31928 - 31935
WO 2012162067 A2, 29.11.2012
WO 2011100786 A1, 25.08.2011
US 20100291112 A1, 18.11.2010
US 20120189540 A1, 26.07.2012
WO 2012021934 A1, 23.02.2012
WO 2013092001 A1, 27.06.2013
Engineering a CD123xCD3 bispecific scFvimmunofusion for the treatment of leukemiaand elimination of leukemia stem cells / Shu-Ru Kuo, Lucas Wong, Jen-Sing Liu // Protein engineering. – Design & Selection. – 2012. - Vol. 25. - no. 10. - P. 561 – 570
MacroGenics - Dual affinity retargeting (DART TM) Platform / Anonymous. - MacroGenics. – 2011. – [Retrieved from the Internet] URL: https://web.archive.org/web/20120831231403/http://www.macrogenics.com/content/file/MacroGenics_Factsheet_DART.pdf. - (retrieved 04.03.2014)
MacroGenics, Inc. Product Pipeline Review 2013. - Anonymous. - JSB Market Research, 2013. – [Retrieved from the Internet] URL: <http://www.jsbmarketresearch.com/healthcare-medical/r-MacroGenics-Inc-Product-Pipeline-Review-2013-31719>. - (retrieved 04.03.2014)
The intriguing options of multispecific antibody formats for treatment of cancer / Ulrich H. Weidle, Georg Tiefenthaler, Elisabeth H. Weiss et al. // Cancer genomics proteomics. – 2013. - Vol. 10. - no. 1. – P. 1 – 18

UA 119539 C2

(54) БІСПЕЦИФІЧНЕ МОНОВАЛЕНТНЕ ДІАТІЛО, ЯКЕ ЗДАТНЕ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З CD123 І CD3, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується біспецифічного моновалентного діатіла, що одночасно зв'язується з CD123 і CD3, фармацевтичної композиції, що містить таке діатіло, та їх застосування для лікування захворювання або стану, пов'язаного з надекспресією CD123.



Фігура 3В

Посилання на споріднені заявки

Згідно з даною заявкою вимагається пріоритет відповідно до заявок на видачу патентів США №№ 61/869510 (поданою 23 серпня 2013 р.; у стадії розгляду), 61/907749 (поданою 22 листопада 2013 р.; у стадії розгляду) і 61/990,475 (поданою 8 травня 2014 р.; у стадії розгляду), і заявкою на видачу Європейського патенту № 13198784 (поданою 20 грудня 2013 р.), кожна з яких повністю включена у даний документ за допомогою посилання.

Посилання на перелік послідовностей

Дана заявка містить у собі один або декілька переліків послідовностей відповідно до 37 C.F.R. 1.821 et seq., які розкриті як на паперовому, так і на машинозчитувальному носії, і чиї паперові і машинозчитувальні розкриття повністю включені в даний документ за допомогою посилання.

Область техніки, до якої відноситься даний винахід

Даний винахід відноситься до CD123 x CD3 біспецифічних моновалентних диатіл, які здатні одночасно зв'язуватися з CD123 і CD3, і до застосувань таких молекул у лікуванні гематологічних злоякісних пухлин.

Попередній рівень техніки даного винаходу

I. CD123

CD123 (альфа-рецептор інтерлейкіну 3, IL-3Ra) являє собою молекулу з молекулярною масою 40 кДа і є частиною комплексу рецепторів інтерлейкіну 3 (Stomski, F.C. et al. (1996) "Human Interleukin-3 (IL-3) Induces Disulfide-Linked IL-3 Receptor Alpha-And Beta-Chain Heterodimerization, Which Is Required For Receptor Activation But Not High-Affinity Binding", Mol. Cell. Biol. 16(6):3035-3046). Інтерлейкін 3 (IL-3) керує ранньою диференціацією мультипотентних стовбурових клітин у клітини еритроїдних, мієлоїдних і лімфоїдних попередників. CD123 експресується на CD34+ комітованих клітинах - попередниках (Taussig, D.C. et al. (2005) "Hematopoietic Stem Cells Express Multiple Myeloid Markers: Implications For The Origin And Targeted Therapy Of Acute Myeloid Leukemia", Blood 106:4086-4092), але не на CD34+/CD38- нормальних гемопоетичних стовбурових клітинах. CD123 експресується базофілами, тучними клітинами, плазмацитоїдними дендритними клітинами, деяка експресія спостерігається у моноцитів, макрофагів і еозинофілів, і низька експресія або її відсутність спостерігається у нейтрофілів і мегакаріоцитів. Деякі, які не відносяться до гемопоетичних тканини (плацента, клітини Лейдига в яєчках, певні клітинні елементи головного мозку і деякі ендотеліальні клітини) експресують CD123; проте, експресія є, головним чином, цитоплазматичною.

Повідомлялося, що CD123 експресується лейкобластиками і лейкозними стовбуровими клітинами (LSC) (Jordan, C.T. et al. (2000) "The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells", Leukemia 14:1777-1784; Jin, W. et al. (2009) "Regulation Of Th17 Cell Differentiation And EAE Induction By MAP3K NIK", Blood 113:6603-6610 (фігура 1). У нормальних популяціях клітин - попередників у людини CD123 експресується підкласом гемопоетичних клітин - попередників (HPC), але не нормальними гемопоетичними стовбуровими клітинами (HSC). CD123 також експресується плазмацитоїдними дендритними клітинами (pDC) і базофілами і меншою мірою моноцитами і еозинофілами (Lopez, A.F. et al. (1989) "Reciprocal Inhibition Of Binding Between Interleukin 3 And Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor To Human Eosinophils", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:7022-7026; Sun, Q. et al. (1996) "Monoclonal Antibody 7G3 Recognizes The N-Terminal Domain Of The Human Interleukin-3 (IL-3) Receptor Alpha Chain And Functions As A Specific IL-3 Receptor Antagonist", Blood 87:83-92; Muñoz, L. et al. (2001) "Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies", Haematologica 86(12):1261-1269; Masten, B.J. et al. (2006) "Characterization Of Myeloid And Plasmacytoid Dendritic Cells In Human Lung", J. Immunol. 177:7784-7793; Korpelainen, E.I. et al. (1995) "Interferon-Gamma Upregulates Interleukin-3 (IL-3) Receptor Expression In Human Endothelial Cells And Synergizes With IL-3 In Stimulating Major Histocompatibility Complex Class II Expression And Cytokine Production", Blood 86:176-182).

Повідомлялося, що CD123 надлишково експресується на злоякісних клітинах у широкому спектрі гематологічних злоякісних пухлин, включаючи в себе гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ) і мієлодиспластичний синдром (МДС) (Muñoz, L. et al. (2001) "Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies", Haematologica 86(12):1261-1269). Надлишкова експресія CD123 зв'язана з більш несприятливим прогнозом при ГМЛ (Tettamanti, M.S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor", Br. J. Haematol. 161:389-401).

Вважається, що ГМЛ і МДС виникають і підтримуються невеликою популяцією лейкозних стовбурових клітин (LSC), які, як правило, є дрімаючими (тобто клітинами, які не швидко діляться) і, отже, є стійкими до клітинної смерті (апоптозу) і традиційних хіміотерапевтичних

засобів. LSC характеризуються високими рівнями експресії CD123, що відсутні у відповідній нормальній популяції гемопоетичних клітин у нормальному кістковому мозку людини (Jin, W. et al. (2009) "Regulation Of Th17 Cell Differentiation And EAE Induction By MAP3K NIK", Blood 113:6603-6610; Jordan, C.T. et al. (2000) "The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells", Leukemia 14:1777-1784). CD123 експресується в 45 %-95 % випадків ГМЛ, 85 % випадків волохатоклітинного лейкозу (ВКЛ) і 40 % випадків гострого В-лімфобласного лейкозу (В-ГЛЛ). Експресія CD123 також пов'язана з іншими численними злоякісними пухлинами/передраковими станами: клітини - попередники хронічного мієлоїдного лейкозу (ХМЛ) (включаючи в себе ХМЛ із бласним кризом); клітини Рид-Штернберга (RS) при ходжкінській лімфомі; трансформована неходжкінська лімфома (НХЛ); деякі типи хронічного лімфоцитарного лейкозу (ХЛЛ) (CD11c+); підклас гострого Т-лімфобласного лейкозу (Т-ГЛЛ) (16 %, найбільш незрілий підклас, головним чином вражає дорослих), злоякісні пухлини із плазмацитоїдних дендритних клітин (pDC) (DC2) і злоякісні пухлини з CD34+/CD38-клітин кісткового мозку при мієлодиспластичному синдромі (МДС).

ГМЛ являє собою клональне захворювання, що характеризується проліферацією і нагромадженням трансформованих мієлоїдних клітин - попередників у кістковому мозку, яке в підсумку призводить до гемопоетичної недостатності. Частота виникнення ГМЛ збільшується з віком, і пацієнти більш старшого віку, як правило, мають гірші результати лікування, ніж більш молоді пацієнти (Robak, T. et al. (2009) "Current And Emerging Therapies For Acute Myeloid Leukemia", Clin. Ther. 2:2349-2370). На жаль, на даний час більшість дорослих пацієнтів з ГМЛ вмирає внаслідок свого захворювання.

Лікування ГМЛ початково фокусується на індукції ремісії (індукційна терапія). Як тільки досягається індукція, фокус лікування зрушується на закріплення цієї ремісії (післяремісійна, або консолідаційна терапія) і в деяких випадках на підтримуючу терапію. Стандартна парадигма індукції ремісії для ГМЛ являє собою хіміотерапію за допомогою комбінації антрацикліну і цитарабіну з наступною або консолідаційною хіміотерапією (як правило, за допомогою підвищених доз тих же лікарських засобів, які використовувалися протягом періоду індукції ремісії), або трансплантацією стовбурових клітин людини залежно від здатності пацієнта переносити інтенсивне лікування і імовірності видужання тільки за допомогою хіміотерапії (див., наприклад, Roboz, G.J. (2012) "Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia", Curr. Opin. Oncol. 24:711-719).

Засоби, часто використовувані в індукційній терапії, містять у собі цитарабін і антрациклін. Цитарабін, також відомий як АгаС, знищує злоякісні клітини (і інші нормальні клітини, що швидко діляться), перешкоджаючи синтезу ДНК. Побічні ефекти, пов'язані з лікуванням за допомогою АгаС, містять у собі знижену стійкість до інфекції як результат зниженої продукції лейкоцитів; кровотеча як результат зниженої продукції тромбоцитів; і анемію внаслідок потенційного зниження кількості еритроцитів. Інші побічні ефекти містять у собі нудоту і блювання. Антрацикліни (наприклад, даунорубіцин, доксорубіцин і ідарубіцин) характеризуються декількома механізмами дії, включаючи в себе інгібування синтезу ДНК і РНК, руйнування структур ДНК більш високих порядків і виробництво ушкоджуючих клітини вільних кисневих радикалів. Найбільш значний побічний ефект антрациклінів являє собою кардіотоксичність, яка суттєво обмежує дозу, що вводиться протягом життя, і у деякій мірі застосовність антрациклінів.

Таким чином, на жаль, незважаючи на істотний прогрес у лікуванні вперше виявленого ГМЛ, 20 % - 40 % пацієнтів не досягають ремісії за допомогою стандартної індукційної хіміотерапії, і в 50 % - 70 % пацієнтів, які досягли спочатку повної ремісії, як припускають, виникне рецидив не пізніше ніж через 3 роки. Оптимальна стратегія в період рецидиву або для пацієнтів зі стійким до лікування захворюванням, залишається неясною. Встановлено, що трансплантація стовбурових клітин є найбільш ефективною формою протилейкозної терапії у пацієнтів з ГМЛ при першій або наступній ремісії (Roboz, G.J. (2012) "Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia", Curr. Opin. Oncol. 24:711-719).

II. CD3

CD3 являє собою Т -клітинний корецептор, що складається із чотирьох різних ланцюгів (Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling", Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; pages 1-14). У ссавців комплекс CD3 містить ланцюг CD3 γ , ланцюг CD3 δ і два ланцюги CD3 ϵ . Зазначені ланцюги зв'язуються з молекулою, відомою як Т-клітинний рецептор (TCR), для створення сигналу активації в Т-лімфоцитах. При відсутності CD3 не відбувається правильного складання TCR, і вони розпадаються (Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer", Immunology 129(2):170–

177). CD3 виявлений зв'язаним з мембранами всіх зрілих Т-клітин і практично ні з яким іншим типом клітин (див. Janeway, C.A. et al. (2005) In: Immunobiology: The Immune System In Health And Disease, " 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214-216; Sun, Z. J. et al. (2001) "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer", Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex", Immunity. 2006 Feb.;24(2):133-139).

III. Біспецифічні діатіла

Здатність інтактного, немодифікованого антитіла (наприклад, IgG) зв'язувати епітоп антигену залежить від присутності варіабельних доменів на легких і важких ланцюгах імуноглобуліну (тобто доменів VL і VH, відповідно). Конструкція діатіла заснована на одноланцюговому конструкті Fv (scFv) (див., наприклад, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; патентну публікацію США № 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Взаємодія легкого ланцюга антитіла і важкого ланцюга антитіла і, зокрема, взаємодія його доменів VL і VH формує один із сайтів зв'язування епітопа антитіла. Напроти, конструкт scFv містить домен VL і VH антитіла, що міститься в одному поліпептидному ланцюзі, причому в домені відділені гнучким лінкером, довжина якого достатня для забезпечення можливості самоскладання двох доменів у функціональний сайт зв'язування епітопа. Якщо самоскладання доменів VL і VH стає неможливим внаслідок недостатньої довжини лінкера (менше ніж приблизно 12 амінокислотних залишків), два конструкти scFv взаємодіють один з одним з утворенням бівалентної молекули, у якій VL одного ланцюга асоціюються з VH іншого (розглянуто в Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Природні антитіла здатні зв'язуватися тільки з одним видом епітопів (тобто є моноспецифічними), хоча вони можуть зв'язуватися із множинними копіями цього виду (тобто проявляючи бівалентність або мультивалентність). У відомому рівні техніки повідомлялося про здатність робити діатіла, які відрізняються від таких природних антитіл у тому, що вони здатні зв'язувати два або більше різних видів епітопів (тобто проявляючи біспецифічність або мультиспецифічність на додаток до бівалентності або мультивалентності) (див., наприклад, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Mertens, N. et al., "New Recombinant Bi-and Trispecific Antibody Derivatives", In: Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Забезпечення не моноспецифічними діатілами надає істотну перевагу: здатність колігування та колокалізації клітин, які експресують різні епітопи. Таким чином, біспецифічні діатіла характеризуються широким діапазоном застосувань, включаючи в себе терапію та

імунодіагностику. Біспецифічність забезпечує можливість великої гнучкості в конструюванні та розробці діатіла в різних застосуваннях, забезпечуючи підвищену авидність у відношенні мультимерних антигенів, перехресну зшивку різних антигенів і спрямований націлений вплив на конкретні типи клітин на підставі присутності обох цільових антигенів. У зв'язку з їхньою підвищеною валентністю низькі швидкості дисоціації і швидке виведення із циркуляції (для діатілу невеликого розміру, що становить ~50 кДа або нижче), відомі в даній області техніки молекули діатілу також продемонстрували конкретне застосування в області візуалізації пухлин (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumor Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*, " *Protein Eng.* 10:1221). Особливе значення представляє колігування різних клітин, наприклад, перехресна зшивка цитотоксичних Т-клітин з пухлинними клітинами (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells, " *Nature* 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody, " *Protein Eng.* 9:299-305).

Доменні зв'язування з епітопом діатіла також можуть бути спрямовані на поверхневу детермінанту будь-якої імунної ефektorної клітини, такої як CD3, CD16, CD32 або CD64, які експресуються на Т - лімфоцитах, клітинах - природних кілерів (NK) або інших мононуклеарних клітинах. У багатьох дослідженнях також виявили, що зв'язування діатіла з детермінантами ефektorних клітин, наприклад, рецепторами Fcγ (FcγR), активує ефektorну клітину (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody, " *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-cd3 x Anti-cea Bispecific Diabodies And B7 x Anti-cea Bispecific Fusion Proteins, " *Cancer Res.* 59:2909-2916; міжнародні патентні публікації №№ WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Як правило, активація ефektorних клітин запускається зв'язуванням антигену, зв'язаного антитілом, з ефektorною клітиною за допомогою взаємодії Fc-FcγR; таким чином, у зв'язку з цим, молекули діатілу можуть проявляти Ig-подібну функціональність, незалежно від того, чи містять вони домен Fc (наприклад, згідно з результатами будь-якого аналізу ефektorної функції, відомого в даній області техніки або представленого в якості прикладу в даному документі (наприклад, аналізу ADCC)). Шляхом перехресної зшивки пухлинних і ефektorних клітин діатіло не тільки приводить ефektorну клітину в просторову близькість щодо пухлинних клітин, але приводить до ефективного лізису пухлинних клітин (див., наприклад, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics, " *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197).

Проте, перераховані вище переваги зустрічаються з суттєвою вартістю. Утворення таких не моноспецифічних діатілів вимагає успішного складання двох або більше окремих і різних поліпептидів (тобто таке утворення вимагає, щоб діатіла утворювалися за допомогою гетеродимеризації різних видів поліпептидних ланцюгів). Цей факт контрастує з моноспецифічними діатілами, які утворюються за допомогою гомодимеризації ідентичних поліпептидних ланцюгів. Оскільки необхідно надати щонайменше два несхожі поліпептиди (тобто два види поліпептидів) для утворення не моноспецифічного діатілу, і оскільки гомодимеризація таких поліпептидів приводить до неактивних молекул (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System, " *Protein Eng.* 13(8):583-588), одержання таких поліпептидів має здійснюватися таким шляхом, який запобіжить утворенню ковалентних зв'язків між поліпептидами того самого виду (тобто так, щоб запобігти гомодимеризації) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System, " *Protein Eng.* 13(8):583-588). У зв'язку з цим у даній області техніки розкрито нековалентне зв'язування таких поліпептидів (див., наприклад, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications, " *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain, " *Abstract 3P-683, J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System, " *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity, " *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

Проте, у даній області техніки встановлено, що біспецифічні діатіли, які складаються з нековалентно зв'язаних поліпептидів, є нестабільними і легко дисоціюються до нефункціональних мономерів (див. наприклад, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity, " *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

Через таку проблему, у даній області техніки досягли успіху в розробці стабільних, ковалентно зв'язаних гетеродимерних не моноспецифічних диатіл (див., наприклад, міжнародні патентні публікації №№ WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion, " J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold, " Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma, " Blood 117(17):4542-4551). Такі підходи передбачають конструювання одного або декількох цистеїнових залишків у кожному з використовуваних видів поліпептидів. Наприклад, було показано, що додавання цистеїнового залишку до С-кінця таких конструктів забезпечує утворення дисульфідного зв'язку між поліпептидними ланцюгами, стабілізуючи отриманий гетеродимер, не створюючи перешкоди для характеристик зв'язування бівалентної молекули.

Незважаючи на такий успіх, одержання стабільних, функціональних гетеродимерних, не моноспецифічних диатіл може бути додатково оптимізоване шляхом ретельного розгляду і розміщення цистеїнових залишків в одній або декількох використовуваних поліпептидних ланцюгах. Такі оптимізовані диатіла можна одержати з більш високим виходом і з підвищеною активністю, ніж не оптимізовані диатіла. Таким чином, даний винахід відноситься до проблеми одержання поліпептидів, які спеціально розроблені і оптимізовані для утворення гетеродимерних диатіл. Даний винахід вирішує зазначену проблему шляхом забезпечення ілюстративних, оптимізованих CD123 x CD3 диатіл.

Коротке розкриття даного винаходу

Даний винахід відноситься до CD123 x CD3 біспецифічних диатіл, які здатні одночасно зв'язуватися з CD123 і CD3, і до застосувань таких молекул у лікуванні захворювання, зокрема гематологічних злоякісних пухлин.

CD123 x CD3 біспецифічні диатіла згідно із даним винаходом містять щонайменше два різні поліпептидні ланцюги, які асоціюються один з одним гетеродимерним чином з утворенням одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопа CD123, і одного сайтом зв'язування, специфічного у відношенні епітопа CD3. Таким чином, CD123 x CD3 диатіло згідно із даним винаходом є моновалентним у тому розумінні, що воно здатне зв'язуватися тільки з однією копією епітопа CD123 і тільки з однією копією епітопа CD3, але є біспецифічним у тому розумінні, що окреме диатіло здатне зв'язуватися одночасно з епітопом CD123 і з епітопом CD3. Окремі поліпептидні ланцюги диатіл ковалентно зв'язані один з одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга. Згідно з конкретними варіантами здійснення диатіла згідно із даним винаходом додатково містять домен Fc імуноглобуліну або альбумінзв'язуючий домен для збільшення періоду напівжиття *in vivo*.

Більш конкретно, згідно із даним винаходом також передбачено характеризуюче оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічне моновалентне диатіло, здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3, причому диатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, ковалентно зв'язані один з одним, причому:

А. перший поліпептидний ланцюг містить, у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 1, що містить:

(1) субдомен (1A), який містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:21); і

(2) субдомен (1B), який містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}) (SEQ ID NO:26);

причому субдомени 1A і 1B відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:29);

ii. домен 2, причому домен 2 являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34) або К-спіральний домен (SEQ ID NO:35), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:30); і

В. другий поліпептидний ланцюг містить, у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 1, що містить:

(1) субдомен (1A), який містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}) (SEQ ID NO:25); і

(2) субдомен (1B), який містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:22);

причому субдомени 1A і 1B відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:29);

ii. домен 2, причому домен 2 являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:35) або Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:30); і причому домен 2 першого і другого поліпептидних ланцюгів не являють собою обоє Е-спіральних домена або обоє К-спіральних домена;

5 і при цьому:

(а) зазначений домен VL зазначеного першого поліпептидного ланцюга і зазначений домен VH зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3; і

10 (b) зазначений домен VL зазначеного другого поліпептидного ланцюга і зазначений домен VH зазначеного першого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD123.

Згідно із даним винаходом також передбачено характеризуюче неоптимізованою послідовністю CD123 х CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3, причому діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, ковалентно зв'язані один з одним, причому:

15 А. перший поліпептидний ланцюг містить, у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 1, що містить:

(1) субдомен (1A), який містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:23); і

20 (2) субдомен (1B), який містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}) (SEQ ID NO:28);

причому субдомени 1A і 1B відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:29);

25 ii. домен 2, причому домен 2 являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34) або К-спіральний домен (SEQ ID NO:35), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:30); і

В. другий поліпептидний ланцюг містить, у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 1, що містить:

(1) субдомен (1A), який містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}) (SEQ ID NO:27); і

30 (2) субдомен (1B), який містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:24);

причому субдомени 1A і 1B відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:29);

35 ii. домен 2, причому домен 2 являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:35) або Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:30); і причому домен 2 першого і другого поліпептидних ланцюгів не являють собою обоє Е-спіральних домена або обоє К-спіральних домена;

і при цьому:

(а) зазначений домен VL зазначеного першого поліпептидного ланцюга і зазначений домен VH зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3; і

40 (b) зазначений домен VL зазначеного другого поліпептидного ланцюга і зазначений домен VH зазначеного першого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD123.

Крім того, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл, у якому перший або другий поліпептидний ланцюг додатково містить альбумінзв'язуючий домен (SEQ ID NO:36), з'єднаний на С-кінці з доменом 2 або на N-кінці з доменом 1 за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:31).

45 Крім того, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл, у якому перший або другий поліпептидний ланцюг додатково містить домен 3, що містить домен CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG (SEQ ID NO:37), причому домен 3 з'єднаний на N-кінці з доменом 1A за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:33).

50 Крім того, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл, у якому перший або другий поліпептидний ланцюг додатково містить домен 3, що містить домен CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG (SEQ ID NO:37), причому домен 3 з'єднаний на С-кінці з доменом 2 за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:32).

Крім того, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення будь-якого з описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл, у якому домен 2 першого поліпептидного ланцюга

являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:35), і домен 2 другого поліпептидного ланцюга являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34).

Крім того, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення будь-якого з описаних вище біспецифічних моновалентних діатілів, у якому домен 2 першого поліпептидного ланцюга являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34), і домен 2 другого поліпептидного ланцюга являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:35).

Крім того, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення біспецифічного моновалентного діатіла, здатного специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3, причому діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, ковалентно зв'язані один з одним, причому: зазначене біспецифічне діатіло містить наступне:

А. перший поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:1; і

В. другий поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:3;

причому зазначений перший і зазначений другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним дисульфідним зв'язком.

Діатіла згідно із даним винаходом проявляють несподівано посилені функціональні активності, як додатково описано нижче.

Діатіла згідно із даним винаходом переважно здатні перехресно реагувати з білками CD123 і CD3 як людини, і так примата, переважно білками CD123 і CD3 яванської макаки.

Діатіла згідно із даним винаходом переважно здатні піддавати деплеції *in vitro* клітинному аналізу плазмацитоїдні дендритні клітини (pDC) з культури первинних PBMC зі значенням IC50, що становить приблизно 1 нг/мл або менше, приблизно 0,8 нг/мл або менше, приблизно 0,6 нг/мл або менше, приблизно 0,4 нг/мл або менше, приблизно 0,2 нг/мл або менше, приблизно 0,1 нг/мл або менше, приблизно 0,05 нг/мл або менше, приблизно 0,04 нг/мл або менше, приблизно 0,03 нг/мл або менше, приблизно 0,02 нг/мл або менше або приблизно 0,01 нг/мл або менше. Значення IC50 переважно становить приблизно 0,01 нг/мл або менше. В описаному вище аналізі культура первинних PBMC може походити від яванської макаки, у цьому випадку зазначена деплеція являє собою деплецію плазмацитоїдних дендритних клітин яванської макаки (pDC). Необов'язково діатіла згідно із даним винаходом можуть бути здатні піддавати деплеції плазмацитоїдні дендритні клітини (pDC) з первинної культури PBMC, як описано вище, причому аналіз проводять згідно або відповідно до протоколу прикладу 14, як описано в даному документі, або шляхом модифікації такого аналізу, що буде зрозуміло фахівцям у даній області техніки, або іншими способами, відомими фахівцям у даній області техніки.

Діатіла згідно із даним винаходом переважно проявляють цитотоксичність в *in vitro* аналізі Kasumi-3 зі значенням EC50, що становить приблизно 0,05 нг/мл або менше. Значення EC50 переважно становить приблизно 0,04 нг/мл або менше, приблизно 0,03 нг/мл або менше, приблизно 0,02 нг/мл або менше або приблизно 0,01 нг/мл або менше. Необов'язково діатіла згідно із даним винаходом можуть проявляти цитотоксичність, як описано вище, причому аналіз проводять згідно або відповідно до протоколу прикладу 3, як описано в даному документі, або шляхом модифікації такого аналізу, що буде зрозуміло фахівцям у даній області техніки, або іншими способами, відомими фахівцям у даній області техніки.

Діатіла згідно із даним винаходом переважно проявляють цитотоксичність в *in vitro* аналізі Molm-13 зі значенням EC50, що становить приблизно 5 нг/мл або менше. Значення EC50 переважно становить приблизно 3 нг/мл або менше, приблизно 2 нг/мл або менше, приблизно 1 нг/мл або менше, приблизно 0,75 нг/мл або менше або приблизно 0,2 нг/мл або менше. Необов'язково діатіла згідно із даним винаходом можуть проявляти цитотоксичність, як описано вище, причому аналіз проводять згідно або відповідно до протоколу прикладу 3, як описано в даному документі, або шляхом модифікації такого аналізу, що буде зрозуміло фахівцям у даній області техніки, або іншими способами, відомими фахівцям у даній області техніки.

Діатіла згідно із даним винаходом переважно здатні інгібувати ріст пухлинного ксенотрансплантата MOLM-13 у миші. Діатіла згідно із даним винаходом переважно можуть бути здатні інгібувати ріст пухлинного ксенотрансплантата MOLM-13 у миші в концентрації, що становить щонайменше приблизно 20 мкг/кг, щонайменше приблизно 4 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,8 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,6 мкг/кг або щонайменше приблизно 0,4 мкг/кг. Переважні антитіла згідно із даним винаходом будуть інгібувати ріст пухлинного ксенотрансплантата MOLM-13 у миші щонайменше на 25 %, але можливо щонайменше приблизно на 40 % або більше, щонайменше приблизно на 50 % або більше, щонайменше приблизно на 60 % або більше, щонайменше приблизно на 70 % або більше, щонайменше

приблизно на 80 % або більше, щонайменше приблизно на 90 % або більше або навіть повністю інгібувати ріст пухлини MOLM-13 через деякий період часу або викликаючи регресію або зникнення пухлини. Зазначене інгібування спостерігається щонайменше для лінії мишей NSG. Необов'язково диатіла згідно із даним винаходом можуть бути здатні інгібувати ріст

5 пухлинного ксенотрансплантата MOLM-13 у миші описаним вище чином згідно або відповідно до протоколу прикладу 6, як описано в даному документі, або шляхом модифікації такого аналізу, що буде зрозуміло фахівцям у даній області техніки, або іншими способами, відомими фахівцям у даній області техніки.

Диатіла згідно із даним винаходом переважно здатні інгібувати ріст пухлинного ксенотрансплантата RS4-11 у миші. Диатіла згідно із даним винаходом переважно можуть бути здатні інгібувати ріст пухлинного ксенотрансплантата RS4-11 у миші в концентрації, що становить щонайменше приблизно 0,5 мг/кг, щонайменше приблизно 0,2 мг/кг, щонайменше приблизно 0,1 мг/кг, щонайменше приблизно 0,02 мг/кг або щонайменше приблизно 0,004 мг/кг. Переважні антитіла згідно із даним винаходом будуть інгібувати ріст пухлинного ксенотрансплантата RS4-11 у миші щонайменше приблизно на 25 %, але можливо щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 60 %, щонайменше приблизно на 70 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 90 % або навіть повністю інгібувати ріст пухлини RS4-11 через деякий період часу або викликаючи регресію або зникнення пухлини. Зазначене інгібування спостерігається щонайменше для лінії мишей NSG. Необов'язково диатіла згідно із даним винаходом можуть бути здатні інгібувати ріст пухлинного ксенотрансплантата RS4-11 у миші описаним вище чином згідно або відповідно до протоколу прикладу 6, як описано в даному документі, або шляхом модифікації такого аналізу, що буде зрозуміло фахівцям у даній області техніки, або іншими способами, відомими фахівцям у даній області техніки.

Диатіла згідно із даним винаходом переважно здатні піддавати деплеції лейкозні бластні клітини *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ. Диатіла згідно із даним винаходом переважно можуть бути здатні піддавати деплеції лейкозні бластні клітини *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ при концентраціях, що становлять щонайменше приблизно 0,01 нг/мл, щонайменше приблизно 0,02 нг/мл, щонайменше приблизно 0,04 нг/мл, щонайменше приблизно 0,06 нг/мл, щонайменше приблизно 0,08 нг/мл або щонайменше приблизно 0,1 нг/мл. Диатіла згідно із даним винаходом переважно можуть бути здатні піддавати деплеції лейкозні бластні клітини *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ менше ніж на 20 % від загальної популяції первинних лейкозних бластних клітин при концентраціях диатіла, що складають щонайменше приблизно 0,01 нг/мл, щонайменше приблизно 0,02 нг/мл, щонайменше приблизно 0,04 нг/мл, щонайменше приблизно 0,06 нг/мл, щонайменше приблизно 0,08 нг/мл або щонайменше приблизно 0,1 нг/мл, необов'язково після інкубації первинної культури з диатілом протягом приблизно 120 годин. Лейкозні бластні клітини переважно піддають деплеції *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ менше ніж на 20 % від загальної популяції первинних лейкозних бластних клітин при концентраціях диатіла, що становить приблизно 0,01 нг/мл або 0,1 нг/мл, після інкубації первинної культури з диатілом протягом приблизно 120 годин.

Диатіла згідно із даним винаходом переважно здатні індукувати експансію Т-клітинної популяції *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ. Така експансія переважно може становити приблизно 70 % або більше від максимальної Т-клітинної популяції, яка може бути піддана експансії в аналізі. Диатіла згідно із даним винаходом переважно можуть бути здатні індукувати експансію Т-клітинної популяції *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ приблизно на 70 % або більше від максимальної Т-клітинної популяції, яка може бути піддана експансії в аналізі при концентраціях диатіла, що складають щонайменше приблизно 0,01 нг/мл, щонайменше приблизно 0,02 нг/мл, щонайменше приблизно 0,04 нг/мл, щонайменше приблизно 0,06 нг/мл, щонайменше приблизно 0,08 нг/мл або щонайменше приблизно 0,1 нг/мл, необов'язково після інкубації первинної культури з диатілом протягом приблизно 120 годин. Т-клітинна популяція переважно збільшується *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ приблизно на 70 % або більше від максимальної Т-клітинної популяції, яка може бути піддана експансії в аналізі при концентраціях диатіла, що становить приблизно 0,01 нг/мл або приблизно 0,1 нг/мл після інкубації первинної культури з диатілом протягом приблизно 120 годин.

Диатіла згідно із даним винаходом переважно здатні індукувати активацію Т-клітинної популяції *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ. Така активація може відбуватися при концентраціях диатіла, що складають щонайменше приблизно 0,01 нг/мл, щонайменше приблизно 0,02 нг/мл, щонайменше приблизно 0,04 нг/мл, щонайменше

приблизно 0,06 нг/мл, щонайменше приблизно 0,08 нг/мл або щонайменше приблизно 0,1 нг/мл, необов'язково після інкубації первинної культури з диатілом протягом приблизно 72 годин. Таку активацію можна виміряти за експресією маркера Т-клітинної активації, такого як CD25. Активация Т-клітинна популяція *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ, вимірювана за експресією CD25, переважно відбувається при концентраціях диатіла, що становить приблизно 0,01 нг/мл або приблизно 0,1 нг/мл, після інкубації первинної культури з диатілом протягом приблизно 72 годин.

Диатіла згідно із даним винаходом переважно здатні піддавати деплеції лейкозні бластні клітини *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ менше ніж на 20 % від загальної популяції первинних лейкозних бластних клітин і в той же час індукувати експансію Т-клітинної популяції *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ приблизно на 70 % або більше від максимальної Т-клітинної популяції, яка може бути піддана експансії в аналізі, при концентраціях диатіла, що складають щонайменше приблизно 0,01 нг/мл, щонайменше приблизно 0,02 нг/мл, щонайменше приблизно 0,04 нг/мл, щонайменше приблизно 0,06 нг/мл, щонайменше приблизно 0,08 нг/мл або щонайменше приблизно 0,1 нг/мл, необов'язково після інкубації первинної культури з диатілом протягом приблизно 120 годин. Концентрації диатіла переважно становлять приблизно 0,01 нг/мл або приблизно 0,1 нг/мл, і первинну культуру інкубують з диатілом протягом приблизно 120 годин.

Диатіла згідно із даним винаходом можуть бути здатні піддавати деплеції лейкозні бластні клітини *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ і/або індукувати експансію Т-клітинної популяції *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ і/або індукувати активацію Т-клітинної популяції *in vitro* у первинній культурі клітин кісткового мозку ГМЛ описаним вище чином згідно або відповідно до протоколу прикладу 8, як описано в даному документі, або шляхом модифікації такого аналізу, що буде зрозуміло фахівцям у даній області техніки, або іншими способами, відомими фахівцям у даній області техніки.

Щоб уникнути невірної тлумачення, диатіла згідно із даним винаходом можуть проявляти одну, дві, три, більше трьох або всі з функціональних ознак, описаних у даному документі. Таким чином, диатіла згідно із даним винаходом можуть проявляти будь-яку комбінацію функціональних ознак, описаних у даному документі.

Диатіла згідно із даним винаходом є придатними для застосування в якості фармацевтичного засобу. Диатіла переважно є придатними для застосування в лікуванні захворювання або стану, пов'язаного з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123. Даний винахід також відноситься до застосування диатіла згідно із даним винаходом у виробництві фармацевтичної композиції, переважно для лікування захворювання або стану, пов'язаного з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123, як додатково визначене в даному документі.

Захворювання або стан, пов'язаний з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123, може являти собою злоякісну пухлину. Наприклад, злоякісна пухлина може бути обрана із групи, що складається з наступного: гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), хронічний мієлогенний лейкоз (ХМЛ), включаючи в себе бластний криз ХМЛ і онкоген Абельсона, пов'язаний із ХМЛ (транслокація Bcr-ABL), мієлодиспластичний синдром (МДС), гострий В-лімфобластний лейкоз (В-ГЛЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), включаючи в себе ХЛЛ із синдромом Ріхтера або трансформацією Ріхтера, волохатоклітинний лейкоз (ВКЛ), новоутворення із бластних плазмацитоїдних дендритних клітин (УБПДК), нехождкінські лімфоми (НХЛ), включаючи в себе мантийноклітинну лімфому (МКЛ) і дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому (МЛЛ), лімфома Ходжкіна, системний мастоцитоз і лімфома Беркіта.

Захворювання або стан, пов'язаний з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123, може являти собою запальний стан. Наприклад, запальний стан може бути обраний із групи, що складається з наступного: системна червона вовчанка (СЧВ), алергія, бронхіальна астма та ревматоїдний артрит.

Крім того, згідно із даним винаходом передбачена фармацевтична композиція, що містить будь-яке з описаних вище диатіл і фізіологічно прийнятний носій.

Крім того, згідно із даним винаходом передбачено застосування описаної вище фармацевтичної композиції в лікуванні захворювання або стану, пов'язаного з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123.

Зокрема, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення такого застосування, у якому захворювання або стан, пов'язаний з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123, являє собою злоякісну пухлину (особливо злоякісну пухлину, обрану із групи, що складається з наступного: гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), хронічний мієлогенний лейкоз (ХМЛ), включаючи в себе бластний криз ХМЛ і онкоген Абельсона, пов'язаний із ХМЛ

(транслокація Bcr-ABL), мієлодиспластичний синдром (МДС), гострий В-лімфобластний лейкоз (В-ГЛЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), включаючи в себе ХЛЛ із синдромом Ріхтера або трансформацією Ріхтера, волохатоклітинний лейкоз (ВКЛ), новоутворення із бластних плазмацитоїдних дендритних клітин (УБПДК), неходжкінські лімфоми (НХЛ), включаючи в себе мантийноклітинну лімфому (МКЛ) і дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому (МЛЛ), лімфома Ходжкіна, системний мастоцитоз і лімфома Беркіта).

Зокрема, згідно із даним винаходом передбачено варіант здійснення такого застосування, у якому захворювання або стан, пов'язаний з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123, являє собою запальний стан (особливо запальний стан, обраний із групи, що складається з наступного: системна червона вовчанка (СЧВ), алергія, бронхіальна астма та ревматоїдний артрит).

Такі терміни, як "приблизно" слід розуміти як середнє в межах 10 %, більш переважно в межах 5 % від зазначеного значення, якщо контекстом не передбачено інше.

Короткий опис графічних матеріалів

На фігурі 1 показано, що CD123, як відомо, експресується на лейкозних стовбурових клітинах.

На фігурі 2 проілюстровані структури першого і другого поліпептидних ланцюгів двохланцюгового CD123 х CD3 біспецифічного моновалентного діатіла згідно із даним винаходом.

На фігурах 3А і 3В проілюстровані структури двох версій першого, другого і третього поліпептидних ланцюгів трьохланцюгового CD123 х CD3 біспецифічного моновалентного Fc - діатіла згідно із даним винаходом (версія 1, фігура 3А; версія 2, фігура 3В).

На фігурі 4 (панелі А-Е) показана здатність різних CD123 х CD3 біспецифічних діатілів опосередковувати Т-клітинний переспрямований цитоліз клітин - мішеней, що проявляють мінливу кількість CD123. На фігурі представлені криві залежності від дози, які вказують на те, біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 х CD3 ("DART-A"), що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-A з ABD "w/ABD") виявило більшу цитотоксичність, ніж контрольне біспецифічне діатіло (контрольне DART) або, біспецифічне діатіло, що характеризується неоптимізованою послідовністю CD123 х CD3 ("DART-B") у численних типах клітин-мішеней: RS4-11 (панель А); TF-1 (панель В); Molm-13 (панель С); Kasumi-3 (панель D); і THP-1 (панель Е) у співвідношенні Е:Т (ефектор: мішень), що становить 10:1.

На фігурі 5 (панелі А-Д) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 х CD3 біспецифічного діатіла (DART-A), що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 х CD3 біспецифічного діатіла, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-A з ABD "w/ABD"), що і характеризується оптимізованою послідовністю CD123 х CD3 біспецифічного діатіла, що містить домен Fc імунглобуліну IgG (DART-A з Fc "w/Fc"), опосередковувати Т-клітинну активацію в процесі перенаправленого цитолізу клітин-мішеней. На фігурі представлені криві залежності від дози, що показують цитотоксичність, опосередковану DART-A, DART-A w/ABD і DART-A w/Fc у клітинах Kasumi-3 (панель А) і THP-1 (панель В) і очищених CD8 Т-клітинах при співвідношенні Е:Т (ефекторна клітина: клітина - мішень), що становить 10:1 (18 год. інкубація). На панелях С і D показані криві залежності від дози Т-клітинної активації з використанням маркера CD25 на CD8 Т-клітинах у присутності (панель D) і при відсутності (панель С) клітин - мішеней.

На фігурі 6 (панелі А-В) показані вмісти гранзиму В і перфорину в CD4 і CD8 Т-клітинах після обробки за допомогою, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 х CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) (панель А) або контрольного біспецифічного діатіла (контрольного DART) (панель В) у присутності клітин-мішеней Kasumi-3 і дрімаючих Т-клітин у співвідношенні Е:Т, що становить 10:1.

На фігурі 7 (панелі А-В) показана in vivo протипухлинна активність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 х CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) при рівнях дозування в нг/кг. Клітини MOLM-13 (проміжний рівень експресії CD123) змішували з Т-клітинами і імплантували підшкірно (Т:Е 1:1) мишам NSG. Внутрішньовенне лікування здійснювали один раз на день протягом 8 днів (QDx8), починаючи від дня імплантації. Різні концентрації DART-A порівнювали з контрольним біспецифічним діатілом (контрольним DART). На панелі А показані клітини Molm-13 окремо або з Т-клітинами, і ефект різних доз DART-A на об'єм пухлини, навіть у часові точки за межами 30 днів. На панелі В показаний ефект збільшуваних доз DART-A на об'єм пухлини, спостережуваний у мишей NSG, що одержали клітини MOLM-13 і Т-клітини (Т:Е 1:1) протягом періоду часу, що становить 0-18 днів.

На фігурі 8 показана *in vivo* протипухлинна активність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) на клітини RS4-11 (ОЛЛ із ознаками моноцитів). Клітини змішували з Т-клітинами і імплантували підшкірно (Т:Е 1:1) мишам NSG. Внутрішньовенне лікування здійснювали один раз на день протягом 4 днів (QDx4), починаючи від дня імплантації. Різні концентрації DART-A порівнювали з контрольним біспецифічним діатілом (контрольне DART).

На фігурі 9 (панелі А-В) показані CD123+ бластні клітини в мононуклеарах кісткового мозку (BM MNC) і мононуклеарах периферичної крові (PBMC) від пацієнта 1 з ГМЛ (панель А) у порівнянні із клітинною лінією ГМЛ Kasumi-3 (панель В).

На фігурі 10 (панелі А-С) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) опосередковувати скорочення бластних клітин при первинному ГМЛ через 120 год. (панель А), керувати експансією Т-клітинної популяції при первинному ГМЛ через 120 год. (панель В) і індукувати Т-клітинну активацію при ГМЛ через 48 год. і 72 год. (панель С).

На фігурі 11 (Панелі А-Н) показана ідентифікація популяції CD123+ бластних клітин у первинному зразку PBMC ОЛЛ. На панелях А і Е показане пряме і бічне світлорозсіювання популяції нормальних PBMC, що вводиться, (панель А) і PBMC ОЛЛ (панель Е). На панелях В і F показана ідентифікація популяції лімфоцитів в якості, головним чином, В-клітин (панель В) і лейкозних бластних клітин (панель F). На панелях С і G показана ідентифікація популяції лімфоцитів, які є CD123+. На панелях D і H показана ідентифікація CD19+ клітин і CD123+ клітин.

На фігурі 12 (панелі А-В) показана ідентифікація CD4 і CD8 популяцій Т-клітин у первинному зразку PBMC ОЛЛ. На панелі А показане пряме і бічне світлорозсіювання популяції PBMC ОЛЛ, що вводиться. На панелі В показані CD4 або CD8 популяції Т-клітин, які присутні в зразках. Кількості вказують, що CD4 Т-клітини представляють приблизно 0,5 % від загальної кількості клітин, і CD8 Т-клітини представляють приблизно 0,4 % від загальної кількості клітин, які присутні у зразку PBMC ОЛЛ.

На фігурі 13 (панелі А-Н) показана здатність, біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) опосередковувати деплецію бластних клітин при ОЛЛ за допомогою аутологічних CTL (цитотоксичні Т-лімфоцитів). На панелях А і Е показане пряме і бічне світлорозсіювання популяції нормальних PBMC, що вводиться, (панель А) і PBMC ОЛЛ (панель Е). PBMC залишали не обробленими (панелі В і F), обробляли за допомогою контрольного біспецифічного діатіла (контрольного DART) (панелі С і G) або обробляли за допомогою DART-A (панелі D і H) і інкубували протягом 7 днів, після чого офарблювали у відношенні CD34 і CD19.

На фігурі 14 (панелі А-Л) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) опосередковувати Т-клітинну експансію (панелі А, В, С, G, H і I) і активацію (панелі D, Е, F, J, K і L) у нормальних PBMC (панелі А-F) і PBMC ОЛЛ (панелі G-L). Клітини залишали не обробленими (панелі А, D, G і J) або обробляли за допомогою контрольного біспецифічного діатіла (контрольного DART) (панелі В, Е, H і K) або DART-A (панелі С, F, I і L) протягом 7 днів.

На фігурі 15 (панелі А-С) показана ідентифікація бластної популяції ГМЛ і Т-клітин у первинному зразку ГМЛ. На панелі А показане пряме і бічне світлорозсіювання популяції PBMC ГМЛ, що вводиться. На панелі В показана ідентифікація бластної популяції ГМЛ у зразку ГМЛ. На панелі С показана ідентифікація Т-клітинної популяції в зразку ГМЛ.

На фігурі 16 (панелі А-С) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) опосередковувати деплецію бластних клітин при ГМЛ за допомогою аутологічних CTL і Т-клітинної експансії. Первинні PBMC ГМЛ від пацієнта 2 інкубували з PBS, контрольним біспецифічним діатілом (контрольним DART) або DART-A протягом 144 год. Підраховували бластні клітини (панель А), CD4 Т-клітини (панель В) і CD8 Т-клітини (панель С).

На фігурі 17 (панелі А-D) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) опосередковувати Т-клітинну активацію при ГМЛ. Експресію CD25 (панель А) і Ki-67 (панель В) визначали для CD4 і CD8 Т-клітин від пацієнта 2 з ГМЛ після інкубації з контрольним біспецифічним діатілом (контрольним DART) або DART-A з аутологічними PBMC. Вміст перфорину (панель С) і гранзиму В (панель D) визначали для CD4 і CD8 Т-клітин від пацієнта 2 з ГМЛ після інкубації з контрольним DART або DART-A з аутологічними PBMC.

На фігурі 18 (панелі А-D) показано, що біспецифічне діатіло яке характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) здатне перехресно реагувати з білками

CD123 і CD3 як людини, так і примата. На панелях показані криві сенсограм BIAcore™ результатів аналізів, проведених для оцінки здатності DART-A зв'язуватися з білками CD3 (панелі A і B) і CD123 (панелі C і D) людини (панелі A і C) і нелюдиноподібного примата (панелі B і D). Представлені значення KD.

5 На фігурі 19 (панелі A-B) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) опосередковувати деплецію аутологічних моноцитів *in vitro* з PBMC людини і яванської макаки. На панелях представлені результати кривих залежності від дози опосередкованої DART-A цитотоксичності з первинними PBMC людини (панель A) або PBMC яванської макаки (панель B).

10 На фігурі 20 (панелі A-N) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) опосередковувати деплецію pDC у яванських макак без системної індукції цитокінів. На панелях A-D показані контрольні результати, отримані через 4 год. і 4 днів з інертним носієм і носієм. На панелях E-H показані контрольні результати, отримані через 4 год. і 4 днів з контрольним біспецифічним діатілом (контрольним DART). На панелях I-N показані результати, отримані через 4 год. і 4 днів у дозі DART-A, що становить 10 нг/кг/день, і через 4 днів у дозі DART-A, що становить 30 нг/кг/день.

15 На фігурі 21 (панелі A-D) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) опосередковувати залежну від дози деплецію pDC у яванських макак. Яванським макакам вводили дози DART-A, що становлять 0,1, 1, 10, 30 100, 300 або 1000 нг/кг. PBMC оцінювали в зазначений час і визначали загальну кількість В-клітин (панель A), моноцитів (панель B), NK-клітин (панель C) і pDC (панель D).

20 На фігурі 22 (панелі A-D) показана здатність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A) періодично модулювати Т-клітини у яванських макак. Яванським макакам вводили дози DART-A, що становлять 0,1, 1, 10, 30 100, 300 або 1000 нг/кг. PBMC оцінювали в зазначений час і визначали загальну кількість Т-клітин (панель A), CD4 Т-клітин (панель B), CD69 клітин (панель C) і CD8 Т-клітин (панель D).

На фігурі 23 показано аналіз SDS-PAGE очищеного білка DART-A при відновлюючих (ліворуч) і невідновлюючих (праворуч) умовах.

30 На фігурах 24A-24B показані фізико-хімічні характеристики очищеного DART-A. На фігурі 24A: профіль SEC білка DART-A на каліброваній колонці TSK G3000SWxL. На фігурі 24B: мас-спектр білка DART-A.

На фігурах 25A-25D показаний аналіз SPR зв'язування DART-A з імобілізованими CD123 і CD3 людини або яванської макаки. Пунктирними лініями представлена глобальна апроксимація до 1:1 моделі Ленгмюра експериментальних кривих зв'язування, отриманих при концентраціях DART-A, що становлять 0, 6,25, 12,5, 25, 50 або 100 нМ (безперервні лінії). Дані є репрезентативними для трьох незалежних експериментів.

35 На фігурах 26A-26E показано, що DART-A здатне одночасно зв'язуватися як з CD3, так і CD123. На фігурі 26A-26B представлені результати біфункціонального аналізу ELISA і продемонстроване одночасне залучення обох антигенів-мішеней DART-A. На планшети ELISA наносили CD123 людини (фігура 26A) або яванської макаки CD123 (фігура 26B). За титруванням концентрацій DART-A і контрольного DART впливало виявлення за допомогою CD3-біотин людини. На фігурах 26C-26E продемонстровано зв'язування клітинною поверхнею DART-A на CD123+Molm-13 клітині-мішені (фігура 26C), Т-клітинах людини (фігура 26D) і Т-клітинах яванської макаки (фігура 26E). Зв'язування виявляли за допомогою аналізу FACS з використанням моноклонального антитіла, специфічного у відношенні Е-спіральної і К-спіральної області молекули DART-A або контрольного DART.

45 На фігурах 27A-27H показана здатність DART-A опосередковувати переспрямований цитоліз клітини - мішені ефекторними клітинами людей або мавпи проти CD123+Kasumi-3 лейкозних клітинних ліній, показана здатність молекул зв'язуватися з підкласом нормальних циркулюючих у кровотоці лейкоцитів, включаючи в себе pDC і моноцити, і показана здатність молекул піддавати деплеції CD14-CD123^{high} клітини (pDC і базофіли), не вражаючи моноцити (CD14+ клітини). На фігурі 27A показані відносні сайти зв'язування з антитілом до CD123-PE U937 і лейкозні клітинні лінії Kasumi-3, визначені за допомогою аналізу QFACS. На фігурі 27B показана відносно низька відсоткова цитотоксичність, опосередкована DART-A або контрольним DART на клітинній лінії ГМЛ (клітинах U937), які, як показано на фігурі 27A, містять відносно мало сайтів зв'язування з CD123. На фігурі 27C показана відсоткова цитотоксичність, опосередкована DART-A або контрольним DART у присутності очищених Т-клітин людини (в якості ефекторних клітин) на клітинній лінії ГМЛ (клітинах Kasumi-3), які, як показано на фігурі 27A, містять значну кількість сайтів зв'язування з CD123. На фігурах 27B-27C співвідношення Е:Т становить 10:1. На

фігурі 27D показана вісоткова цитотоксичність, опосередкована DART-A або контрольним DART у присутності очищених PBMC яванської макаки (в якості ефекторних клітин) на клітинах Kasumi-3 (співвідношення E:T становить 15:1), і продемонстровано, що DART-A може зв'язуватися з Т-клітинами яванської макаки. На фігурі 27E показані відносні сайти зв'язування з антитілом до CD123-PE на клітинах Kasumi-3, моноцитах людини, плазмацитоїдних дендритних клітинах людини ("pDC"), моноцитах яванської макаки і плазмацитоїдних дендритних клітинах яванської макаки, що визначали за допомогою аналізу QFACS. На фігурі 27F показана здатність DART-A піддавати деплеції CD14⁺ CD123^{lo} клітки. На фігурі 27G показана здатність DART-A піддавати деплеції CD14⁺ CD123^{hi} клітини людини. На фігурі 27H показана здатність DART-A піддавати деплеції CD14⁺ CD123^{hi} клітини яванської макаки. Цитотоксичність визначали за вивільненням LDH, при цьому значення EC50 визначали за допомогою програмного забезпечення GraphPad PRISM®.

На фігурі 28 показано застосування двохкомпартментної моделі для оцінки фармакокінетичних параметрів DART-A. Дані показують концентрації DART-A у сироватці наприкінці інфузії (EOI) у яванських макак після одержання 96-годинної інфузії в дозі, що становить 100 нг/кг/день, 300 нг/кг/день, 600 нг/кг/день і 1000 нг/кг/день. Кожна точка представляє окрему тварину; горизонтальні лінії представляють середнє значення для групи дозування.

На фігурах 29A-29C показаний ефект інфузій DART-A на продукцію цитокіну, IL-6. Вмісти IL-6 у сироватці (середнє \pm SEM) у мавп, яким вводили інфузії DART-A, показані за групами лікування. Яванським макакам вводили інертний носій - контроль в 1 день, після чого вводили 4 щотижневі інфузії або інертного носія (група 1) (фігура 29A), або DART-A, що вводиться у вигляді 4-денних інфузій щотижня, починаючи з 8 дня, в 15, 22 і 29 день (групи 2-5) (фігура 29B) або у вигляді інфузії 7 днів на тиждень протягом 4 тижнів, починаючи на 8 день (група 6) (фігура 29C). Інтервали лікування зазначені сірими колонками.

На фігурах 30A-30F показано ефект інфузій DART-A на деплецію CD14-/CD123+ клітин (фігури 30A-30C) і CD303+ клітин (фігури 30D-30F). Показано середнє \pm SEM циркулюючих у кровотоці вмістів CD14-/CD123+ (фігури 30A-30C) або CD303+ (фігури 30D-30F) по днях дослідження та по групам. Яванським макакам вводили інертний носій - контроль в 1 день, після чого вводили 4 щотижневих інфузії або інертний носій (група 1) (фігури 30A і 30D), або DART-A, що вводиться у вигляді 4-денних інфузій щотижня, починаючи з 8 дня, в 15, 22 і 29 день (групи 2-5) (фігури 30A і 30E) або у вигляді інфузії 7 днів на тиждень протягом 4 тижнів, починаючи на 8 день (група 6) (фігури 30C і 30F). Інтервали лікування зазначені сірими колонками.

На фігурі 31A-31I показані спостережувані зміни в Т-клітинних популяціях (фігури 31A-31C), CD4+ клітинних популяціях (фігури 31D-31F) і CD8+ клітинних популяціях (фігури 31G-31I), що одержують DART-A, що вводиться у вигляді 4-денних інфузій, починаючи на 8 день, в 15, 22 і 29 день. Легенда: CD25+ (сірі квадрати); CD69+ (сірі трикутники); PD-1+ (білі трикутники); Tim-3+ (білі квадрати). Т-клітини підраховували за допомогою маркерів CD4 і CD8, а не канонічного CD3, для усунення можливого взаємовпливу з боку DART-A. Яванським макакам вводили інертний носій - контроль в 1 день, після чого вводили 4 щотижневі інфузії або інертний носій (група 1), або DART-A, що вводиться у вигляді 4-денних інфузій щотижня, починаючи з 8 дня, в 15, 22 і 29 день (група 5) або у вигляді інфузії 7 днів на тиждень протягом 4 тижнів, починаючи на 8 день (група 6). Інтервали лікування зазначені сірими колонками. Показано середнє \pm SEM від абсолютної кількості циркулюючих у кровотоці Т-клітин по днях дослідження і по групах (фігури 31A-31C). Показані відносні значення (середній відсоток \pm SEM) CD25+, CD69+, PD-1+ і Tim-3+ на CD4 (фігури 31D-31E) або CD8 Т-клітинах (фігури 31F-31H) по днях дослідження і по групах.

На фігурі 32A-32F показані спостережувані зміни в CD4+Т-клітинних популяціях (фігури 32A-32C) і CD8+Т-клітинних популяціях (фігури 32D-32F) під час і після безперервної 7-денної інфузії DART-A. Показано середнє \pm SEM у відсотках від CD25+, CD69+, PD-1+ і Tim-3+ на CD4 (фігури 32A-32C) або CD8 (фігури 32D-32F) Т-клітинах по днях дослідження і по групах 2, 3 і 4. Інтервали лікування зазначені сірими колонками. Легенда: CD25+ (сірі квадрати); CD69+ (сірі трикутники); PD-1+ (білі трикутники); Tim-3+ (білі квадрати).

На фігурі 33A-33F показані спостережувані зміни в CD4+Т-клітинних популяціях (фігури 33A-33C) і CD8+Т-клітинних популяціях (фігури 33D-33F) під час і після безперервної 7-денної інфузії DART-A. Показано середнє \pm SEM у відсотках від CD4+ наївних клітин (CD95-/CD28+), CMT (CD95+/CD28+) і EMT (CD95+/CD28-) Т-клітин в CD4+ популяції (фігури 33A-33C) або CD8 популяції (фігури 33D-33F) по днях дослідження і по групах 2, 3 і 4. Яванським макакам вводили інертний носій - контроль в 1 день, після чого вводили 4 щотижневих інфузії або інертний носій або DART-A, що вводиться у вигляді 4-денних інфузій щотижня, починаючи з 8 дня, в 15, 22 і 29

день (групи 2-4). Інтервали лікування зазначені сірими колонками. Легенда: наївні клітини (білі трикутники); CMT (чорні трикутники), EMT (сірі квадрати).

На фігурі 34 показана опосередкована DART-A цитотоксичність проти клітин Kasumi-3 з RBMC або від мавп, які не зазнали впливу, або мавп, що одержали лікування за допомогою численних інфузій DART-A.

На фігурах 35A-35F показано, що вплив DART-A підвищував відносну частоту центральних CD4 клітин пам'яті та ефекторних CD8+ клітин пам'яті за рахунок відповідної раніше не підданої впливам Т-клітинної популяції. Показано середнє \pm SEM у відсотках від CD4+ наївних клітин (CD95-/CD28+), CMT (CD95+/CD28+) і EMT (CD95+/CD28-) Т-клітин в CD4+ популяції (фігури 35A-35C) або в CD8+ популяції (фігури 35D-35F по днях дослідження і по групах. Яванським макакам вводили інертний носій - контроль в 1 день, після чого вводили 4 щотижневих інфузії або інертний носій (група 1), або DART-A, що вводиться у вигляді 4-денних інфузій щотижня, починаючи з 8 дня, в 15, 22 і 29 день (група 5) або у вигляді інфузії 7 днів на тиждень протягом 4 тижнів, починаючи на 8 день (група 6). Інтервали лікування зазначені сірими колонками. Легенда: наївні (білі трикутники); CMT (чорні трикутники), EMT (сірі квадрати).

На фігурах 36A-36F показано ефект DART-A на параметри еритроцитів у мавп, які одержали інфузії молекул. Показані вмісти циркулюючих еритроцитів (фігури 36A-36C) або ретикулоцитів (фігури 36D-36F) (середнє \pm SEM) у зразках, зібраних у зазначені часові точки від мавп, що одержали лікування за допомогою DART-A.

На фігурах 37A-37B показана частота зустрічальності (середній відсоток \pm SEM) CD123+ клітин (фігура 37A) або HSC (CD34+/CD38-/CD45-/CD90+ клітин) (фігура 37B) в Lin- клітинній популяції в зразках кісткового мозку, зібраних у зазначені часові точки від мавп, що одержали лікування за допомогою DART-A. Яванським макакам вводили інертний носій - контроль в 1 день, після чого вводили 4 щотижневих інфузії або інертний носій (група 1), або DART-A, що вводиться у вигляді 4-денних інфузій щотижня, починаючи з 8 дня, в 15, 22 і 29 день (групи 2-5) або у вигляді інфузії 7 днів на тиждень протягом 4 тижнів, починаючи на 8 день (група 6).

Докладне розкриття даного винаходу

Даний винахід відноситься до характерних оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл, які здатні одночасно зв'язуватися з CD123 і CD3, і до застосувань таких молекул у лікуванні гематологічних злоякісних пухлин. Незважаючи на те, що неоптимізовані CD123 x CD3 біспецифічні діатіла є повністю функціональними, аналогічно вдосконаленням, отриманим в експресії генів за допомогою оптимізації кодонів (див., наприклад, Grosjean, H. et al. (1982) "Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes" Gene 18(3):199-209), можливо додатково підсилити стабільність і/або функцію CD123 x CD3 біспецифічних діатіл шляхом модифікації або оптимізації їх послідовностей.

Переважні CD123 x CD3 біспецифічні діатіла згідно із даним винаходом складаються із щонайменше двох поліпептидних ланцюгів, які асоціюються один з одним з утворенням одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопа CD123, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопа CD3 (фігура 2). Окремі поліпептидні ланцюги діатіла ковалентно зв'язані один з одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга. Кожний поліпептидний ланцюг містить антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга, антигензв'язуючий домен варіабельного домена важкого ланцюга і домен гетеродимеризації. Проміжний лінкерний пептид (лінкер 1) відокремлює антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга від антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга. Антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга з утворенням першого функціонального антигензв'язуючого сайту, який є специфічним відносно першого антигену (тобто або CD123, або CD3). Аналогічно, антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга з утворенням другого функціонального антигензв'язуючого сайту, який є специфічним відносно другого антигену (тобто або CD123, або CD3, залежно від ідентичності першого антигену). Таким чином, вибір антигензв'язуючого домена варіабельного домена легкого ланцюга та антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга першого і другого поліпептидних ланцюгів скоординований так, щоб два поліпептидні ланцюги спільно містили антигензв'язуючі домени варіабельних доменів легкого та важкого ланцюга, здатні зв'язуватися з CD123 і CD3.

Утворення гетеродимерів першого і другого поліпептидних ланцюгів може керуватися доменами гетеродимеризації. Такі домени містять у собі GVEPKSC (SEQ ID NO:50) (або VEPKSC; SEQ ID NO:51) на одному поліпептидному ланцюзі і GFNRGEC (SEQ ID NO:52) (або FNRGEC; SEQ ID NO:53) на іншому поліпептидному ланцюзі (US2007/0004909). Альтернативно, такі домени можна сконструювати так, щоб вони містили спіралі протилежних зарядів. Домен гетеродимеризації одного з поліпептидних ланцюгів містить послідовність щонайменше із шести, щонайменше із семи або щонайменше з восьми позитивно заряджених амінокислот, і домен гетеродимеризації іншого поліпептидного ланцюга містить послідовність щонайменше із шести, щонайменше із семи або щонайменше з восьми негативно заряджених амінокислот. Наприклад, перший або другий домен гетеродимеризації переважно буде містити послідовність із восьми позитивно заряджених амінокислот, і інший з доменів гетеродимеризації переважно буде містити послідовність із восьми негативно заряджених амінокислот. Позитивно заряджена амінокислота може являти собою лізин, аргінін, гістидин і т. д. і/або негативно заряджена амінокислота може являти собою глутамінову кислоту, аспарагінову кислоту і т. д. Позитивно заряджена амінокислота переважно являє собою лізин і/або негативно заряджена амінокислота переважно являє собою глутамінову кислоту.

CD123 x CD3 біспецифічні діатіла згідно із даним винаходом сконструйовані так, щоб такі перші і другі поліпептидні ланцюги були ковалентно зв'язані один з одним за допомогою цистеїнових залишків уздовж їх довжини. Такі цистеїнові залишки можуть бути введені в проміжний лінкер, який відокремлює домени VL і VH поліпептидів. Альтернативно і більш переважно, другий пептид (лінкер 2) введений у кожен з поліпептидних ланцюгів, наприклад, на амінокінці поліпептидних ланцюгів або в положенні, яке поміщає лінкер 2 між доменом гетеродимеризації і антигензв'язуючим доменом варіабельного домена легкого ланцюга або варіабельного домена важкого ланцюга.

Згідно з конкретними варіантами здійснення характерні оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла згідно із даним винаходом додатково містять домен Fc імуноглобуліну або альбумінзв'язуючий домен для збільшення періоду напівжиття *in vivo*.

CD123 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла згідно із даним винаходом, які містять домен Fc імуноглобуліну (тобто CD123 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc - діатіла) складаються з першого поліпептидного ланцюга, другого поліпептидного ланцюга і третього поліпептидного ланцюга. Перший і другий поліпептидні ланцюги асоціюються один з одним з утворенням одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопа CD123, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопа CD3. Перший поліпептидний ланцюг і третій поліпептидний ланцюг асоціюються один з одним з утворенням домена Fc імуноглобуліну (фігура 3A і фігура 3B). Перший і другий поліпептидні ланцюги біспецифічного моновалентного Fc - діатіла ковалентно зв'язані один з одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга.

Перший і третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга. Кожний з першого і другого поліпептидних ланцюгів містить антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга, антигензв'язуючий домен варіабельного домена важкого ланцюга і домен гетеродимеризації. Проміжний лінкерний пептид (лінкер 1) відокремлює антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга від антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга. Антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга з утворенням першого функціонального антигензв'язуючого сайту, який є специфічним відносно першого антигену (тобто або CD123, або CD3). Аналогічно, антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга з утворенням другого функціонального антигензв'язуючого сайту, який є специфічним відносно другого антигену (тобто або CD3, або CD123, залежно від ідентичності першого антигену). Таким чином, вибір антигензв'язуючого домена варіабельного домена легкого ланцюга та антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга першого і другого поліпептидних ланцюгів скоординований так, щоб два поліпептидні ланцюги спільно містили антигензв'язуючі домени варіабельних доменів легкого та важкого ланцюга, здатні зв'язуватися з CD123 і CD3. Кожний з першого і третього поліпептидних ланцюгів містять деяку частину або весь домен CH2 і/або деяку частину або весь домен CH3 повного домена Fc імуноглобуліну і цистеїнмісткий пептид. Деяка частина або весь домен CH2 і/або деяка частина або весь домен CH3 асоціюються з утворенням домена Fc імуноглобуліну біспецифічних

моновалентних Fc - диатіл згідно із даним винаходом. Перший і третій поліпептидні ланцюги біспецифічних моновалентних Fc - диатіл згідно із даним винаходом ковалентно зв'язані один з одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах цистеїністого пептиду поліпептидних ланцюгів.

5 I. Біспецифічне диатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, "DART-A"

Згідно із даним винаходом передбачено біспецифічне диатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю, здатне одночасно і специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3 ("CD123 x CD3" біспецифічне диатіло або DART-A). Як обговорюється нижче, виявлено, що DART-A проявляє підвищену функціональну активність щодо інших, що характеризуються неоптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних диатіл подібної сполуки, і, у зв'язку із цим, називається "що характеризується оптимізованою послідовністю" CD123 x CD3 біспецифічне диатіло.

Біспецифічне диатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг. Перший поліпептидний ланцюг біспецифічного диатіла буде містити, у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, варіабельний домен легкого ланцюга (домен VL) моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), варіабельний домен важкого ланцюга (домен VH) моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}), і C-кінець. Переважна послідовність такого домена VL_{CD3} являє собою SEQ ID NO:21:

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

Антигензв'язуючий домен VL_{CD3} містить CDR1 SEQ ID NO:38: RSSTGAVTTSNYAN, CDR2 SEQ ID NO:39: GTNKRAP і CDR3 SEQ ID NO:40: ALWYSNLWV.

25 Переважна послідовність такого лінкера 1 являє собою SEQ ID NO:29: GGGSGGGG. Переважна послідовність такого домена VH_{CD123} являє собою SEQ ID NO:26:

EVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNGATFYNQKF
KGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAFWGQGTLTVTSS

30 Антигензв'язуючий домен VH_{CD123} містить CDR1 SEQ ID NO:47: DYMK, CDR2 SEQ ID NO:48: DIIPSNGATFYNQKFKG і CDR3 SEQ ID NO:49: SHLLRAS.

Другий поліпептидний ланцюг буде містити, у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}), проміжний лінкерний пептид (наприклад, лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}), і C-кінець. Переважна послідовність такого домена VL_{CD123} являє собою SEQ ID NO:25:

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK

Антигензв'язуючий домен VL_{CD123} містить CDR1 SEQ ID NO:44: KSSQSLNLSGNQKNYLT, CDR2 SEQ ID NO:45: WASTRES і CDR3 SEQ ID NO:46: QNDYSYPYT.

40 Переважна послідовність такого домена VH_{CD3} являє собою SEQ ID NO:22:

EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA
DSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAFWGQGTLTVTSS

Антигензв'язуючий домен VH_{CD3} містить CDR1 SEQ ID NO:41: TYAMN, CDR2 SEQ ID NO:42: RIRSKYNNYATYYADSVKD і CDR3 SEQ ID NO:43: HGNFGNSYVSWFAFW.

45 Біспецифічні диатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом сконструйовані так, щоб перший і другий поліпептиди були ковалентно зв'язані один з одним за допомогою цистеїнових залишків по їхній довжині. Такі цистеїнові залишки можуть бути введені в проміжний лінкер (наприклад, лінкер 1), який відокремлює домени VL і VH поліпептидів. Альтернативно і більш переважно, другий пептид (лінкер 2) введений у кожний поліпептидний ланцюг, наприклад, у положенні на N-кінці відносно домена VL або на C-кінці відносно домена VH такого поліпептидного ланцюга. Переважна послідовність такого лінкера 2 являє собою SEQ ID NO:30: GGCGGG.

Утворення гетеродимерів може керуватися за допомогою додаткової інженерії таких поліпептидних ланцюгів, щоб вони містили поліпептидні спіралі протилежних зарядів. Таким чином, згідно із переважним варіантом здійснення один з поліпептидних ланцюгів буде сконструйований так, щоб він містив "Е-спіральний" домен (SEQ ID NO:34: EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK), чиї залишки утворюють негативний заряд при pH 7, тоді як інший із двох поліпептидних ланцюгів буде сконструйований так, щоб містити "К-спіральний" домен (SEQ ID NO:35: KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE), чиї залишки

утворюють позитивний заряд при pH 7. Присутність таких заряджених доменів забезпечує асоціацію між першим і другим поліпептидами й, таким чином, сприяє гетеродимеризації.

Несуттєво, яка спіраль забезпечується першим або другим поліпептидними ланцюгами. Проте, переважно, біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом ("DART-A") містить перший поліпептидний ланцюг, який характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:1):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEL
KKPGASVKVSCKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPNSNGATFYNQKFKGRVTITVDKSTST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGGEVAALEKEVAALEKEVAA
LEKEVAALEK

Ланцюг 1 DART-A складається з наступного: SEQ ID NO:21 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:26 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:34. Кодуючий ланцюг 1 DART-A полінуклеотид являє собою SEQ ID NO:2:

caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgga
ccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgacgggggtacaaacaaaagggtccctgg
acccctgcacggttttctggaagtctgctggcggaagggcctgactattaccgggacagggcgaggacgaagccgattactattgt
gctctgtggtatagcaatctgtgggtgtcggggtggcacaactgactgtgctgggaggggtggatccggcgggcgaggcgaggtgca
gctgtgtcagtcgggggtgagctgaagaacccggagcttccgtgaagggtgtctgcaaagccagtggtacaccttcacagactactatat
gaagtgggtcaggcagggtccaggacagggactggaatggatcgcgcatatcattcctccaacggggccactttctacaatcagaagttta
aggcagggtgactattaccgtggacaaatcaacaagcactgcttataggagctgagctccctgcgctctgaagatacagccgtgtactattgtg
ctcggtcacacctgctgagagccagctggttcttattggggacagggcaccctggtgacagtgcttccggaggatgtggcggtggagaagt
ggccgactggagaaagaggtgctgcttggagaaggaggtcgctgcactgaaaaggaggtcgagccctggagaaa

Другий поліпептидний ланцюг DART-A характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:3):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIKGGGSGGGGEVQLVESG
GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR
DDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGKVAALKEK
VAALKEKVAALKEKVAALKE

Ланцюг 2 DART-A складається з наступного: SEQ ID NO:25 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:22 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:35. Кодуючий ланцюг 2 DART-A полінуклеотид являє собою SEQ ID NO:4:

gacttcgtgatgacacagctctcctgatagtctggccgtgagctctgggggagcgggtgactatgtcttgaagagctcccagtcactgtga
acagcggaaatcagaaaaactatctgacctggtaccagcagaagccaggccagccctaaactgctgatctattgggtccaccaggga
atctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcacagatttaccctgacaatttctagctcaggcggaggacgtggctgtga
ctattgtcagaatgattacagctatccctacacttccggcaggggaccagtggaattaaaggaggcggatccggcgcgaggcagag
gtgacagctggtggagctgggggaggtggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagccttgattcaccttcagcacatacgc
tatgaattgggtccggcagggtccagggaggggtggagtggtggaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccg
actctgtgaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggcc
gtgtattactgtgtgagacacgtaacttcggcaattcttactgtctgttgggttcttattggggacaggggacactggtgactgtgtctccggagga
tgtggcggtgaaaagtgccgactgaaggagaaagtgtgcttgaagagaagggtcgccgacttaaggaaaaggtcgagccctga
aagag

Як обговорюється нижче, виявлено, що, біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) характеризується здатністю одночасно зв'язувати CD123 і CD3 клітини як людини, так і мавпи. Виявлено, що забезпечення DART-A викликало Т-клітинну активацію, опосередковувало зменшення бластних клітин, керувало експансією Т-клітинної популяції, індукувало Т-клітинну активацію і викликало переспрямований цитоліз злویкісних клітин - мішеней.

II. Біспецифічне діатіло порівняння, що характеризується неоптимізованою послідовністю CD123 x CD3, "DART-B"

DART-B являє собою, біспецифічне діатіло, що характеризується неоптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що характеризується макроструктурою, подібною з такою в DART-A. Перший поліпептидний ланцюг DART-B буде містити, у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}), проміжний лінкер 2, Е-спіральний домен і C-кінець. Домен VL_{CD3} першого поліпептидного ланцюга DART-B характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:23):

DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGS
GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELK

Домен VH_{CD123} першого поліпептидного ланцюга DART-B характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:28):

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNQATFYNQKF
KGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSS

5 Таким чином, ланцюг 1 DART-B складається з наступного: SEQ ID NO:23 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:28 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:34. Послідовність першого поліпептидного ланцюга DART-B являє собою наступне (SEQ ID NO:5):

DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVYPYRFSGS
10 GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFAGATKLELKGSGSGGGQVQLVQSGAELKKPG
ASVKVSCASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNQATFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYME
LSSLRSEDAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKE
VAALEK

Кодуючий ланцюг 1 DART-B полінуклеотид являє собою SEQ ID NO:6:

gacattcagctgaccagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatgcagaccagttcaagtgaagt
15 tacatgaactggtagcagagaagtcaggcaccctcccccagaagatggattatgacacatccaaagtgctctggagtccttatcgcttca
gtggcagtggtgctgggacccatactctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattctgccaacagtgaggtagtaa
cccgctcacgttcggtgctgggaccaaagctggagctgaaaggaggcggtaccggcgaggaggccaggtgcagctggtgcagtcggggg
ctgagctgaagaaacccggagcttcgctgaagggtgcttgcagaccagtggtacacctcacagactactatatgaagtgggtcaggcagg
ctccaggacagggactggaatggatcggcgatatcattcctccaacggggccacttttacaatcagaagttaaaggcaggggtgactattac
20 cgtggacaaatcaacaagcagctgcttatggagctgagctccctgcgctctgaagatacagccgtgtactattgtctcggtcacacctgctga
gagccagctggttctattggggacagggcaccctggtgacagtgcttccggaggatgtggcggtggagaagtggtggcgccactggagaaa
gaggtgctgcttggagaaggaggtgcgtgcactgaaaaggaggtgcagccctggagaaa

Другий поліпептидний ланцюг DART-B буде містити, у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1) і домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}), проміжний лінкер 2, К-спіральний домен і C-кінець.

Домен VL_{CD123} другого поліпептидного ланцюга DART-B характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:27):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
30 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK

Домен VH_{CD3} другого поліпептидного ланцюга DART-B характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:24):

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQK
FKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS

35 Таким чином, ланцюг 2 DART-B складається з наступного: SEQ ID NO:27 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:24 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:35. Послідовність другого поліпептидного ланцюга DART-B являє собою наступне (SEQ ID NO:7):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
40 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGDIKLQQSGA
ELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKS
SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKV
AALKEKVAALKE

Кодуючий ланцюг 2 DART-B полінуклеотид являє собою SEQ ID NO:8:

Gactcgtgatgacacagctctcctgatagctggtgagctggtgggagcgggtgactatgcttgaagagctccagtcactgctga
45 acagcggaaatcagaaaaactatctgacctggtaccagcagaagccaggccagccctaaactgctgatctattgggtccaccaggga
atctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcagcagatttaccctgacaatttctagctgcaggccgaggacgtggtgta
ctattgcagaatgattacagctatccctacacttccggcaggggaccaaagctggaaattaaaggaggcggatccggcgaggaggcgata
tcaaactgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctgggacctcagtgaaatgctcctgaagactctggctacaccttactaggtaca
cgatgcactgggtgaaaacagaggcctggacagggctggaatggattggatacattaatcctagccgtggtataactaataacagaagttc
50 aaggacaaggccacattgactacagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagctatta
ctgtgcaagatattatgatgatcattactgccttgactactggggccaaaggcaccactctcacagctcctccggaggatgtggcggtggaaaag
tggccgactgaaggagaaagttgctgcttgaagagaaggtcgccgacctaaggaaaaggtcgagccctgaaagag

III. Модифіковані варіанти біспецифічного діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A)

55 А. Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-A з ABD "w/ABD")

Згідно із другим варіантом здійснення згідно із даним винаходом, біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) буде містити один або декілька альбумінзв'язуючих доменів ("ABD") (DART-A з ABD "w/ABD") на одній або обох поліпептидних ланцюгах діатіла.

Як розкрито в міжнародній патентній публікації № WO 2012/018687, для поліпшення *in vivo* фармакокінетичних властивостей діатілу, діатіла можна модифікувати так, щоб вони містили поліпептидну частину білка, що зв'язується із сироватковими білками, на одному або декількох кінцях діатіла. Така поліпептидна частина білка, що зв'язується із сироватковими білками, найбільш переважно буде вбудована на С-кінці молекули діатіла. Особливо переважна поліпептидна частина білка, що зв'язується із сироватковими білками, для цієї мети являє собою альбумінзв'язуючий домен (ABD) з білка G стрептокока. Альбумінзв'язуючий домен 3 (ABD3) білка G штаму *Streptococcus* G148 є особливо переважним.

Альбумінзв'язуючий домен 3 (ABD3) білка G штаму *Streptococcus* G148 складається з 46 амінокислотних залишків, що утворюють стабільну трьоохспіральну структуру і характеризується широкою альбумінзв'язуючою специфічністю (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Альбумін являє собою найпоширеніший білок у плазмі і характеризується періодом напіввиведення, що становить 19 днів у людей. Альбумін містить декілька низькомолекулярних сайтів зв'язування, які дозволяють йому нековалентно зв'язуватися з іншими білками і, тим самим, продовжувати їхні періоди напівжиття в сироватці.

Таким чином, перший поліпептидний ланцюг такого біспецифічного діатіла, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що містить альбумінзв'язуючий домен, містить третій лінкер (лінкер 3), який відокремлює Е-спіраль (або К-спіраль) такого поліпептидного ланцюга від альбумінзв'язуючого домена. Переважна послідовність такого лінкера 3 являє собою SEQ ID NO:31: GGGS. Переважний альбумінзв'язуючий домен (ABD) характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:36): LAEAKVLNRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP.

Таким чином, переважний перший ланцюг, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла, що містить альбумінзв'язуючий домен, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:9):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEL
KKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNQATFYNGKFKGRVTITVDKSTST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGGEVAALEKEVAALEKEVAA
LEKEVAALEKGGGSLAEAKVLNRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

Діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 діатіло, що містить альбумінзв'язуючий домен, складається з: SEQ ID NO:21 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:26 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:34 - SEQ ID NO:31 - SEQ ID NO:36. Полінуклеотид, що кодує таке діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що містить дериватив альбумінзв'язуючого домена, являє собою SEQ ID NO:10:

caggctgtgtgactcaggagcctcactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgga
ccacatctaactacgccaattgggtgacagcagaagccaggacagccaccaaggggcctgacgggggtacaaacaaaagggtccctgg
acccctgcacgggttttctggaagtctgtggtgacgggacggcgtctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgt
gctctgtggtatagcaatctgtggtgttcgggggtggcacaaaactgactgtgtgtgggggtggatccggcgccgaggcgaggtgca
gctgtgtgactccggggctgagctgaagaaacccggagcctccgtgaagggtgtctgtgcaaagccagtggctacacctcacagactactatat
gaagtgggtcaggcagggtccaggacagggactggaatggatcggcgatattccttccaacggggccactttctacaatcagaagtttaa
aggcagggtgactattaccgtggacaaatcaacaagcactgcttataggagctgagctccctcgctctgaagatacagccgtgtactattgtg
ctcggtcacacctgtgagagccagctggtttgctattggggacagggcaccctggtgacagtgcttccggaggatgtggcggtggagaagt
ggccgcactggagaaagaggtgtgcttggagaaggaggtcgctgcactgaaaaggaggtcgacgcctggagaaaggcgccgggtc
tctggccgaagcaaaagtgtggccaaccgcgaactggataaatggcgtgagcgattattataagaacctgattgacaacgcaaaatccg
cggaaggcgtgaaagcactgattgatgaaattctggccgcctgcct

Другий поліпептидний ланцюг такого діатіла, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що містить альбумінзв'язуючий домен, характеризується послідовністю, описаною вище (SEQ ID NO:3), і кодується полінуклеотидом, що характеризується послідовністю SEQ ID NO:4.

В. Біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що містять домен Fc IgG (DART-A з Fc "w/Fc")

Згідно із третім варіантом здійснення згідно із даним винаходом передбачено характеризуюче оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічне діатіло, що складається із трьох поліпептидних ланцюгів і, що містить домен Fc IgG (версія 1 і версія 2 DART-A з Fc "w/Fc") (фігура 3A-3B).

Для утворення такого домена Fc IgG перший і третій поліпептидний ланцюг діатіла містять, у напрямку від N-кінця до С-кінця, цистеїномісткий пептид, (найбільш переважно пептид 1, що характеризується амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:55): DKTHTCPPCP), деяку частину

або весь домен CH2 і/або деяку частину або весь домен CH3 повного домена Fc імуноглобуліну і С-кінець. Деяка частина або весь домен CH2 і/або деяка частина або весь домен CH3 асоціюються з утворенням домена Fc імуноглобуліну біспецифічних моновалентних утримуючих Fc домен діатіл згідно із даним винаходом. Перший і другий поліпептидні ланцюги біспецифічних моновалентних Fc - діатіл згідно із даним винаходом ковалентно зв'язані один з одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах цистеїністого пептиду поліпептидних ланцюгів.

Домени CH2 і/або CH3 першого і третього поліпептидів необов'язково повинні бути ідентичними і переважно модифіковані так, щоб сприяти утворенню комплексу між двома поліпептидами. Наприклад, амінокислотна заміна (переважно заміна на амінокислоту, що містить об'ємну бічну групу, що утворює "виступ", наприклад, триптофан) може бути введена в домен CH2 або CH3 так, щоб стеричний вплив запобігав взаємодії з аналогічно мутованим доменом і змушувало мутований домен утворювати пари з доменом, у якому була сконструйована комплементарна, або забезпечуюча розміщення мутація, тобто "западина" (наприклад, заміна на гліцин). Такі набори мутацій можна сконструювати в будь-якій парі поліпептидів, що містять молекулу біспецифічного моновалентного Fc - діатіла, і, крім того, сконструювати в будь-якій частині поліпептидних ланцюгів зазначеної пари. Способи білкової інженерії, щоб сприяти гетеродимеризації замість гомодимеризації, добре відомі в даній області техніки, зокрема, відносно інженерії імуноглобуліноподібних молекул, і передбачені в даному документі (див., наприклад, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization, " Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library, " J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis, " J. Immunol. Methods 296:95-101; кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання). Переважно, що "виступ" конструюють у доменах CH2-CH3 першого поліпептидного ланцюга, а "западину" конструюють у доменах CH2-CH3 третього поліпептидного ланцюга. Таким чином, "виступ" буде сприяти в запобіганні гомодимеризації першому поліпептидному ланцюгу за допомогою своїх доменів CH2 і/або CH3. Оскільки третій поліпептидний ланцюг переважно містить заміну, що забезпечує утворення "западини", вона буде гетеродимеризоватися з першим поліпептидним ланцюгом, а також гомодимеризоватися один з одним. Переважний виступ створюється шляхом модифікації домена Fc нативного домена Fc IgG так, щоб вона містила модифікацію T366W. Переважна западина створюється шляхом модифікації домена Fc нативного домена Fc IgG, щоб вона містила модифікацію T366S, L368A і Y407V. Для сприяння в очищенні гомодимера третьому поліпептидному ланцюгу від кінцевого біспецифічного моновалентного Fc - діатіла, що містить перший, другий і третій поліпептидні ланцюги, сайт зв'язування з білком А доменів CH2 і CH3 третього поліпептидного ланцюга переважно піддають мутації за допомогою амінокислотної заміни в положенні 435 (H435R). Таким чином, гомодимер третього поліпептидного ланцюга не буде зв'язуватися з білком А, тоді як біспецифічне моновалентне Fc - діатіло буде зберігати свою здатність зв'язувати білок А через сайт зв'язування з білком А на першому поліпептидному ланцюзі.

Переважна послідовність для доменів CH2 і CH3 домена Fc антитіла, що присутня в першому поліпептидному ланцюзі, являє собою (SEQ ID NO:56):

```
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Переважна послідовність для доменів CH2 і CH3 домена Fc антитіла, що присутня в третьому поліпептидному ланцюзі, являє собою (SEQ ID NO:11):

```
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNRYTQKSLSLSPGK
```

С. Конструкт версії 1 DART-A w/Fc

Щоб проілюструвати такі Fc - діатіла, згідно із даним винаходом передбачено конструкт версії 1 DART-A w/Fc. Перший поліпептид конструкта версії 1 DART-A w/Fc містить, у напрямку від N-кінця до С-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}), лінкер 2, Е-спіральний домен, лінкер 5, пептид 1, поліпептид, який містить домени CH2 і CH3 домена Fc, і С-кінець. Переважний лінкер 5

характеризується послідовністю (SEQ ID NO:32): GGG. Переважний поліпептид, який містить домени CH2 і CH3 домена Fc, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:37):

APEAAGGPSVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
5 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Таким чином, перший поліпептид такого конструкта версії 1 DART-A w/Fc складається з наступного: SEQ ID NO:25 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:22 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:34 - SEQ ID NO:32 - SEQ ID NO:55 - SEQ ID NO:37.

10 Переважна послідовність першого поліпептиду такого конструкта версії 1 DART-A w/Fc характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:13):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESG
GGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR
15 DDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGGEVALEKE
VALEKEVALEKEVALEKEGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 Переважний поліпептид, являє собою (SEQ ID NO:14):

gactctgtagtacacagctctcctgtagtctggcctgtagtctggggagcgggtgactatgtctgcaagagctccagctactgctga
acagcggaaatcagaaaaactatctgacctggtagcagcagaagccaggccagccccctaaactgctgtagtattgggtccaccaggga
atctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcagcagatttaccctgacaatttctgtagtctgagcggcaggagcgtggtgta
ctattgtcagaatgattacagctatccctacacttccggccaggggaccaagctggaattaaaggaggcggatccggcggcggaggcggag
25 gtgtagctggtgagctctggggagggtggtccagcctggagggtccctgtagactctcctgtgtagcctctggattcacctcagcacatacgc
tatgaattgggtccgagcgtccagggaaggggctggagtggttgaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccg
actctgtgaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggcc
gtgtattactgtgtgagacacggaactcggcaattcttacgtgtctgtgttctattggggacaggggacactggtgactgtgtctccggagga
tgtggcgtgtggagaagtggccgactggagaaagaggtgctgttggagaaggaggtcgctgcactgaaaaggaggtcgagccctgg
30 agaaaggcggcggggacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagcttctctctcccccaa
aaccgaaggacaccctcatgtagtctcccgacccctgaggtcacatgcgtgtgtgtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaa
ctggtacgtggagcggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagcagtagacaacagcagctaccgtgtgtgtagcgtcct
caccgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtcacaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccat
ctcaaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgt
35 ggtgctgtgtaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagcgggagaacaactacaagaccacgcctc
ccgtgctgtagctccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggagaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt
gatcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctcctcctgtctccgggtaaa

Другий ланцюг такого конструкта версії 1 DART-A w/Fc буде містити, у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}), лінкер 2, К-спіральний домен і C-кінець. Таким чином, другий поліпептид такого конструкта версії 1 DART-A w/Fc складається з наступного: SEQ ID NO:21 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:26 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:35. Такий поліпептид характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:15):

45 qavvtqpsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprglignkrapwtparfsgslggkaaltitgaqaedeadeaycal
wysnlwvfgggtklvtlvgggsggggevlvqsgaelkpgasvksckasgytftdyymkwvrqapggglewigdiipsngatfynqkfgk
vtitvdkststaymelsslrsestavyucarshllraswfaywgqgtltvssggcgggkvaalkekvaalkekvaalkekvaalke

Переважний поліпептид, що кодує такий поліпептид, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:16):

50 caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtcccaggcggaactgtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagctga
ccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaggggcctgtagcgggggtacaaaacaaagggtccctgg
accctgcagcgggtttctggaagtctgctggcggaaggccgctgtagtattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgt
gctctgtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaacaaactgactgtgctgggaggggggtggatccggcgggcggaggcgagggtgca
gctggtgcagtcgggggtgagctgaagaaacccggagctccgtgaagggtgtcttgaagccagtggtacaccttcacagactactatat
55 gaagtgggtcaggcagggtccaggacagggactggaatggatcgcgcatatccttccaacggggccacttctacaatcagaagtttaa
aggcagggtgactattaccgtggacaaatcaacaagcactgcttataggagctgagctccctcgctctgaagatacagccgtgtactattgtg
ctcgtcacacctgtgagagccagctggttcttattggggacagggcaccctggtgacagtgcttccggaggatgtggcggtggaaaagt
ggccgcactgaaggagaaagtgtgctttaaagagaagggtcgccgacttaaggaaaagggtcgagccctgaaagag

Третій поліпептидний ланцюг такої версії 1 DART-A w/Fc буде містити домени CH2 і CH3 домена Fc IgG. Переважний поліпептид складається з пептиду 1 (SEQ ID NO:55) і доменів CH2 і CH3 домена Fc (SEQ ID NO:11) і характеризується послідовністю SEQ ID NO:54:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
5 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLVSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

Переважний поліпептид, який кодує такий поліпептид, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:12):

10 gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtccttctctcccccaaaacccaaggac
accctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaa
agggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgagttgcgcagtc
15 aaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggact
ccgacggctccttctcctctgcagcaagctcaccgtggagacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccgtacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa

D. Конструкт версії 2 DART-A w/Fc

В якості другого прикладу такого діатіла DART-A w/Fc, згідно із даним винаходом
20 передбачено трьохланцюгове діатіло, "версія 2 діатіла DART-A w/Fc" (фігура 3B).

Перший поліпептид такого конструкта версії 2 DART-A w/Fc містить, у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, пептидний лінкер (пептид 1), поліпептид, який містить домени CH2 і CH3 домена Fc, з'єднаний (за допомогою лінкера 4) з доменом VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}), лінкер 2, К-спіральний домен і C-кінець.

25 Переважний поліпептид, який містить домени CH2 і CH3 домена Fc, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:37):

30 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

"Лінкер 4" переважно буде містити амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:57): APSSS. Переважний "лінкер 4" характеризується послідовністю (SEQ ID NO:33): APSSSPME. Таким чином, перший поліпептид такого конструкта версії 2DART-A w/Fc складається з наступного: SEQ ID NO:55 - SEQ ID NO:37 - SEQ ID NO:33 - SEQ ID NO:25 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:22 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:35. Поліпептид, що характеризується такою послідовністю, являє собою (SEQ ID NO:17):

40 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPSSSPMEDFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQ
SLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
45 QNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR
QAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNF
GNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Переважний поліпептид, що кодує такий поліпептид, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:18):

50 gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtccttctctcccccaaaacccaaggac
accctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaa
agggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctggtca
aaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggact
55 ccgacggctccttctcctctacagaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaaagcccttccagctccctatggaagacttctgtagacacagtc
tctgatagcttgccgtgagctggtgggagcgggtgactatgcttgaagagctccagctcactgtgaacagcggaaatcagaaaaacta
tctgacctgtaccagcagaagccaggccagccccctaaactgctgatctattgggtctccaccagggaatctggcgtgcccagacagattcag
cggcagcggcagcggcacagatttaccctgacaatttctagctgtagcggcggaggagcgtggctgtgtactattgtcagaatgattacagctatc
60 cctacacttccggccaggggaccaagctggaaattaaaggagcggatccggcgggaggcgagggtcagctggtgagctggtgggga

ggcttggtccagcctggaggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgctatgaattgggtccgccagggtcc
 agggaaggggtggtgagtggttggaaggatcaggtccaagtaacaattatgaacactactatgccgactctgtgaaggatagattcaccat
 ctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggcgtgtattactgtgtgagacacggta
 acttcggcaattctcactgtcttggttgcttattggggacaggggacactggtgactgtgtctccggaggatgtggcggtggaaaagtggccgc
 actgaaggagaaagtgtgctgctttgaaagagaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgagccctgaaagag

Другий поліпептидний ланцюг такого конструкта версії 2 DART-A w/Fc містить, у напрямку від N-кінця до C-кінця, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1) і домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}). Зазначена частина молекули з'єднана (за допомогою лінкера 2) з E-спіральною доменом. Таким чином, третій поліпептид такого конструкта версії 2 DART-A w/Fc складається з наступного: SEQ ID NO:21 - SEQ ID NO:29 - SEQ ID NO:26 - SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:34. Поліпептид, що характеризується такою послідовністю, являє собою (SEQ ID NO:1), і переважно кодується полінуклеотидом, що характеризується послідовністю SEQ ID NO:2.

Третій поліпептидний ланцюг буде містити домени CH2 і CH3 домена Fc IgG. Переважний поліпептид складається з пептиду 1 (SEQ ID NO:55) і доменів CH2 і CH3 домена Fc (SEQ ID NO:11) і характеризується послідовністю SEQ ID NO:54.

Для оцінки активності вищезгаданих CD123 x CD3 біспецифічних диатіл (DART-A, DART-A w/ABD, DART-A w/Fc, DART-B) одержали контрольне біспецифічне диатіло (контрольне DART). Контрольне DART здатне одночасно зв'язуватися з FITC і CD3. Його два поліпептидні ланцюги характеризуються наступними відповідними послідовностями:

Ланцюг 1 контрольного DART (SEQ ID NO:19):

DVVMQTQTPFSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIKVSNNRFSQV
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKGGGSGGGGGEVQLVESGGG
 LVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD
 SKNSLYLQMNSLKTEDAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGCGGGGEVAALKEKEVA
 ALEKEVAALKEKEVAALKE

Ланцюг 2 контрольного DART (SEQ ID NO:20):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR
 FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGGEVKLDETGGGL
 VQPGRPMKLSCLVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSGGCGGGGKVAALKEKVAALKEKVA
 ALKEKVAALKE

IV. Фармацевтичні композиції

Композиції згідно із даним винаходом містять у собі композиції нерозфасованого лікарського засобу, придатні у виробництві фармацевтичних композицій (наприклад, неочищених або нестерильних композицій) і фармацевтичних композицій (тобто композицій, які є придатними для введення суб'єктові або пацієнтові), які можна використовувати в одержанні стандартних лікарських форм. Такі композиції містять профілактично або терапевтично ефективну кількість, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних диатіл згідно із даним винаходом або комбінацію таких засобів і фармацевтично прийнятний носій. Композиції згідно із даним винаходом переважно містять профілактично або терапевтично ефективну кількість, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного диатіла згідно із даним винаходом і фармацевтично прийнятний носій.

Згідно із даним винаходом також передбачені фармацевтичні композиції, що містять біспецифічні диатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом і друге терапевтичне антитіло (наприклад, пухлинноспецифічне моноклональне антитіло), яке є специфічним відносно конкретного антигену злоякісної пухлини, і фармацевтично прийнятний носій.

Згідно з конкретним варіантом здійснення термін "фармацевтично прийнятний" означає схвалений регуляторним органом федерального уряду або уряду штату або перерахований у Фармакопеї США або іншій загальновизнаній Фармакопеї для застосування у тварин і більш конкретно у людей. Термін "носій" відноситься до розріджувача, ад'юванта (наприклад, ад'юванта Фрейнда (повного і неповного), допоміжна речовина або інертний носій, з яким водять терапевтичний засіб. Такі фармацевтичні носії можуть являти собою стерильні рідини, такі як вода і масла, включаючи в себе масла мінерального, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісове масло, соєве масло, мінеральне масло, кунжутне масло і подібне. Вода являє собою переважний носій, якщо фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно. Сольові розчини і водяні розчини декстрази і розчини гліцерину також можна використовувати в якості рідких носіїв, зокрема, для ін'єкційних розчинів. Підходящі

фармацевтичні допоміжні речовини містять у собі крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, борошно, крейду, силікагель, стеарат натрію, гліцерин моностеарат, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропілен, гліколь, воду, етанол і подібне. Композиція при необхідності також може містити незначні кількості змочувальних засобів або

5 емульгаторів, або рН буферних засобів. Зазначені композиції можуть приймати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, драже, капсул, порошоків, сполук уповільненого вивільнення і подібне.

Як правило, інгредієнти композицій згідно із даним винаходом поставляються або окремо, або змішаними разом у стандартній лікарській формі, наприклад, у вигляді сухого

10 ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично запайному контейнері, такому як ампула або саше із вказівкою кількості активного засобу. Якщо композиція призначена для введення за допомогою інфузії, вона може продаватися з інфузійним флаконом, що містить стерильну воду або сольовий розчин фармацевтичного ступеня чистоти. Якщо композиція призначена для введення за допомогою ін'єкції, ампула зі стерильною водою для ін'єкцій або

15 сольовим розчином може бути надана для того, щоб інгредієнти можна було змішати перед введенням.

Композиції згідно із даним винаходом можуть бути введені до складу у вигляді нейтральних або сольових форм. Фармацевтично прийнятні солі містять у собі без обмеження солі, утворені такими аніонами, як аніони, що відбуваються із соляної, ортофосфорної, оцтової, щавлевої,

20 винної кислот і т.д., і солі, утворені катіонами, такими як катіони, що відбуваються з натрію, калію, амонію, кальцію, гідроксидів заліза, ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т.д.

Згідно із даним винаходом також передбачено фармацевтичний пакет або набір, що містить один або декілька контейнерів, заповнених біспецифічними діатілами, що характеризуються

25 оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, згідно із даним винаходом окремо або таким фармацевтично прийнятним носієм. Крім того, один або декілька інших профілактичних або терапевтичних засобів, придатних для лікування захворювання, також можуть бути включені у фармацевтичний пакет або набір. Згідно із даним винаходом також передбачено фармацевтичний пакет або набір, що містить один або декілька контейнерів, заповнених одним

30 або декількома інгредієнтами фармацевтичних композицій згідно із даним винаходом. Необов'язково такий(і) контейнер(и) може супроводжувати повідомлення у формі, передбаченій державним органом, що регулюють виробництво, застосування або продаж фармацевтичних засобів або біологічних продуктів, причому зазначене повідомлення відбиває дозвіл відповідним органом виробництва, застосування або продажу для введення людям.

Згідно із даним винаходом передбачені набори, які можна використовувати в описаних вище

35 способах. Набір може містити біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом. Набір може додатково містити один або декілька інших профілактичних і/або терапевтичних засобів, придатних для лікування злоякісної пухлини, в одному або декількох контейнерах; і/або набір може додатково містити один або

40 декілька цитотоксичних антитіл, які зв'язуються з одним або декількома антигенами злоякісної пухлини, зв'язаними зі злоякісною пухлиною. Згідно з певними варіантами здійснення інший профілактичний або терапевтичний засіб являє собою хіміотерапевтичний засіб. Згідно з іншими варіантами здійснення профілактичний або терапевтичний засіб являє собою біологічний або гормональний терапевтичний засіб.

45 V. Способи введення

Композиції згідно із даним винаходом можуть бути передбачені для лікування, профілактики і зменшення інтенсивності одного або декількох симптомів, пов'язаних із захворюванням, порушенням або інфекцією, шляхом введення суб'єктові ефективної кількості білка злиття або

50 кон'югованої молекули згідно із даним винаходом або фармацевтичної композиції, що містить білок злиття або кон'юговану молекулу згідно із даним винаходом. Згідно із переважним аспектом такі композиції є по суті очищеними (тобто по суті не містять речовин, які обмежують її дію або роблять небажані побічні ефекти). Згідно з конкретним варіантом здійснення суб'єкт являє собою тварину, переважно ссавець, таку, що не має відношення до приматів, ссавець (наприклад, корова, кінь, кішка, собака, гризун і т. д.) або примат (наприклад, мавпа, така як, яванська макака, людей і т. д.). Згідно із переважним варіантом здійснення суб'єкт являє собою людину.

Відомі різні системи доставки і їх можна використовувати для введення композицій згідно із даним винаходом, наприклад, інкапсулювання в ліпосомах, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати антитіло або злитий білок, опосередкований

60 рецептором ендоцитоз (див., наприклад, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene

Transformation By A Soluble DNA Carrier System, " J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструкція з нуклеїнової кислоти у вигляді частини ретровірусного або іншого вектора і т. д.

Способи введення молекули згідно із даним винаходом містять у собі без обмеження парентеральне введення (наприклад, інтрадермальне, внутрішньом'язове, інтраперитонеальне, внутрішньовенне і підшкірне), епідуральне і мукозальне введення (наприклад, інтраназальний і пероральний шляхи). Згідно з конкретним варіантом здійснення, біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно або підшкірно. Композиції можна вводити будь-яким зручним шляхом, наприклад, за допомогою інфузії або болюсної ін'єкції, шляхом поглинання через епітеліальні або шкірно-слизуваті оболонки (наприклад, слизувату ротової порожнини, слизувату прямої кишки і кишківника і т. д.) і можна вводити разом з іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним або місцевим. Крім того, пульмонарне введення також можна використовувати, наприклад, за допомогою застосування інгалятора або небулайзера і сполуки з аерозольним засобом. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540 і 4880078 і міжнародні патентні публікації згідно PCT №№ WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 і WO 99/66903, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

Згідно із даним винаходом також передбачено, що біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом впаковані в герметично запааний контейнер, такий як ампула або саше із вказівкою кількості молекули. Відповідно одному варіанту здійснення, біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом поставляють у вигляді сухого стерилізованого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично запаяному контейнері і його можна розвести, наприклад, водою або сольовим розчином до відповідної концентрації для введення суб'єктові. Біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом переважно поставляють у вигляді сухого стерильного ліофілізованого порошку в герметично запаяному контейнері в стандартному дозуванні, що становить щонайменше 5 мкг, більш переважно щонайменше 10 мкг, щонайменше 15 мкг, щонайменше 25 мкг, щонайменше 50 мкг, щонайменше 100 мкг або щонайменше 200 мкг.

Ліофілізовані, біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом необхідно зберігати при температурі від 2 до 8 °C у їхньому оригінальному контейнері і молекули необхідно вводити не пізніше ніж через 12 годин, переважно не пізніше ніж через 6 годин, не пізніше ніж через 5 годин, не пізніше ніж через 3 години або не пізніше ніж через 1 годину після їхнього розведення. Згідно з альтернативним варіантом здійснення, біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом поставляють у рідкій формі в герметично запаяному контейнері із вказівкою кількості і концентрації молекули, злитого білка або кон'югованої молекули. Рідку форму, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл згідно із даним винаходом переважно поставляють у герметично запаяному контейнері, у якому молекули перебувають у концентрації, що становить щонайменше 1 мкг/мл, більш переважно щонайменше 2,5 мкг/мл, щонайменше 5 мкг/мл, щонайменше 10 мкг/мл, щонайменше 50 мкг/мл або щонайменше 100 мкг/мл.

Кількість композиції згідно із даним винаходом, яка буде ефективною у лікуванні, профілактиці або зменшенні інтенсивності одного або декількох пов'язаних з порушенням симптомів, можна визначити за допомогою стандартних клінічних технік. Точна доза, застосовувана в складі, також буде залежати від шляху введення і серйозності стану, і повинна визначатися відповідно до рішення лікаря і усіх відповідних обставин пацієнта. Ефективні дози можна екстраполювати із кривих залежності від дози з *in vitro* тестових систем або тестових систем - тваринних моделей.

Для передбачених даним винаходом біспецифічних діатіл, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що вводиться пацієнтові дозування переважно визначають на підставі маси тіла (кг) суб'єкта - реципієнта. Дозування, що вводиться, як правило, становить від щонайменше приблизно 0,3 нг/кг на день до приблизно 0,9 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 1 нг/кг на день до приблизно 3 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 3 нг/кг на день до приблизно 9 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 10 нг/кг на день до приблизно 30 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 30 нг/кг на день до приблизно 90 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 100 нг/кг на день до приблизно 300 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 200 нг/кг на день до приблизно 600 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 300 нг/кг на день до приблизно 900 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 400

нг/кг на день до приблизно 800 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 500 нг/кг на день до приблизно 1000 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 600 нг/кг на день до приблизно 1000 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 700 нг/кг на день до приблизно 1000 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 800 нг/кг на день до приблизно 1000 нг/кг на день, від щонайменше приблизно 900 нг/кг на день до приблизно 1000 нг/кг на день або щонайменше приблизно 1000 нг/кг на день.

Згідно з іншим варіантом здійснення пацієнтові вводять схему лікування, що передбачає одну або декілька доз такої профілактично або терапевтично ефективної кількості, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл, передбачених згідно із даним винаходом, причому схему лікування вводять протягом 2 днів, 3 днів, 4 днів, 5 днів, 6 днів або 7 днів. Згідно з певними варіантами здійснення схема лікування передбачає періодичне введення доз профілактично або терапевтично ефективної кількості, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл, передбачених згідно із даним винаходом (наприклад, введення дози в 1 день, 2 день, 3 день і 4 день даного тижня і відсутність введення доз профілактично або терапевтично ефективної кількості, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл, передбачених згідно із даним винаходом в 5 день, 6 день і 7 день цього ж тижня). Як правило, проводять 1, 2, 3, 4, 5 або більше курсів лікування. Кожний курс може проходити за однаковою схемою або за різними схемами.

Згідно з іншим варіантом здійснення доза, що вводиться, збільшується за першу чверть, першу половину або перші дві третини або три чверті схеми (схем) (наприклад, за першу, другу або третю схему лікування з 4 курсів), поки не буде досягнута денна профілактично або терапевтично ефективна кількість, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл.

У таблиці 1 представлено 5 прикладів різних схем дозувань, описаних вище, для типового курсу лікування.

Таблиця 1

Схема	День	Дозування діатіла (нг діатіла на кг маси тіла суб'єкта в день)				
1	1, 2, 3, 4	100	100	100	100	100
	5, 6, 7	немає	немає	немає	немає	немає
2	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	немає	немає	немає	немає	немає
3	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	немає	немає	немає	немає	немає
4	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	немає	немає	немає	немає	немає

Дозування і частоту введення, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл згідно із даним винаходом знизити або змінити шляхом посилення поглинання і проникнення, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл у тканині за допомогою таких модифікацій, як, наприклад, ліпідизація.

Дозування, що вводиться пацієнтові, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл згідно із даним винаходом можна розрахувати для застосування в якості монотерапії. Альтернативно, біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом використовують у комбінації іншими терапевтичними композиціями, і дозування, що вводиться пацієнтові є менше, ніж при використанні зазначених молекул в якості монотерапії.

Фармацевтичні композиції згідно із даним винаходом можна вводити місцево в необхідну в лікуванні область; цього можна досягти, наприклад, без обмеження за допомогою місцевої інфузії, ін'єкції або за допомогою імплантату, причому зазначений імплантат виготовлений з пористого, непористого або желатиноподібного матеріалу, включаючи в себе такі мембрани, як мембрани Sialastic, або волокна. При введенні молекули згідно із даним винаходом переважно необхідно приділити увагу застосуванню матеріалів, які не абсорбують молекулу.

Композиції згідно із даним винаходом можуть бути доставлені у везикулі, зокрема ліпосоми (див. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery, " Science 249:1527-1533); Treat et al., в Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327; див., головним чином, там же).

Композиції згідно із даним винаходом можуть бути доставлені в системі контрольованого або уповільненого вивільнення. Будь-яку техніку, відому фахівцеві в даній області техніки, можна використовувати для одержання сполук уповільненого вивільнення, що містять одне або декілька біспецифічних діатил, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом. Див., наприклад, патент США № 4526938; міжнародні патентні публікації згідно PCT №№ WO 91/05548; WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel, " Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions, " PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application, " Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery, " Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання. Відповідно одному варіанту здійснення насос можна використовувати в системі контрольованого вивільнення (Див. Langer, раніше; Sefton, (1987) "Implantable Pumps, " CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis, " Surgery 88:507-516; i Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery, " N. Engl. J. Med. 321:574-579). Згідно з іншим варіантом здійснення полімерні матеріали можна використовувати для досягнення контрольованого вивільнення молекул (див., наприклад, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate, " Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization, " Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits, " J. Neurosurg. 7(1):105-112); патенти США №№ 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; 5128326; міжнародні патентні публікації згідно PCT №№ WO 99/15154 i WO 99/20253). Приклади полімерів, використовуваних у сполуках уповільненого вивільнення, містять у собі без обмеження полімер 2-гідроксиетилметакрилату, полімер метилметакрилату, полімер акрилової кислоти, співполімер етилену та вінілацетату, полімер метакрилової кислоти, полігліколіди (PLG), поліангідриди, полімер N-вінілпіролідону, полімер вінілового спирту, поліакриламід, поліетиленгліколь, полілактиди (PLA), співполімер лактидів і гліколідів (PLGA) і поліортоєфіри. Систему контрольованого вивільнення можна розмістити поблизу до терапевтичної мішені (наприклад, легеням), таким чином, буде необхідна тільки частка системної дози (див., наприклад, Goodson, в Medical Applications of Controlled Release, раніше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Композиції, придатні в якості імплантатів контрольованого вивільнення, можна використовувати згідно Dunn із співавт. (див. патент США № 5945155). Зазначений конкретний спосіб заснований на терапевтичному ефекті in situ контрольованого вивільнення біоактивного матеріалу з полімерної системи. Імплантація, як правило, відбувається в будь-якому місці в організмі пацієнта, що має потребу в терапевтичному лікуванні. Можна використовувати неpolімерну систему уповільненої доставки, за допомогою якої неpolімерний імплантат в організмі суб'єкта використовується в якості системи доставки лікарського засобу. При імплантації в організм органічний розчинник імплантату буде розсіюватися, диспергуватися або вилугуватися з композиції в навколишню тканинну рідину, і неpolімерний матеріал буде поступово коагулювати або осаджуватися з утворенням твердої, мікропористої матриці (див. патент США № 5888533).

Системи контрольованого вивільнення обговорюються в огляді Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery, " Science 249:1527-1533). Будь-яку техніку, відому фахівцеві в даній області техніки, можна використовувати для одержання сполук уповільненого вивільнення, що містять один або декілька терапевтичних засобів згідно із даним винаходом. Див., наприклад, патент США №4526938; міжнародні патентні публікації №№ WO 91/05548 i WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel, " Radiotherapy & Oncology 39:179- 189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long- Circulating Emulsions, " PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372- 397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bfgf Antibody For Cardiovascular Application, " Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853- 854; i Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery, "

Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

Якщо композиція згідно із даним винаходом являє собою нуклеїнову кислоту, що кодує, біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом, нуклеїнову кислоту можна вводити *in vivo* для стимуляції експресії кодуємого нею, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла шляхом конструювання її у вигляді частини відповідного нуклеїново кислотного експресійного вектора і введення її так, щоб вона стала внутрішньоклітинною, наприклад, шляхом застосування ретровірусного вектора (див. патент США № 4980286), або шляхом прямої ін'єкції, або шляхом використання бомбардування мікрочастинками (наприклад, генної гармати; Biolistic, Dupont), або покриття ліпідами, або рецепторами клітинної поверхні, або засобами трансфекції, або шляхом введення її, з'єднаної з гомеобокс-подібним пептидом, який, як відомо, проникає в ядро (див., наприклад, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868) і т.д. Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена внутрішньоклітинно і вбудована в ДНК клітини - хазяїна для експресії шляхом гомологічної рекомбінації.

Лікування суб'єкта за допомогою терапевтично або профілактично ефективної кількості, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл згідно із даним винаходом може передбачати однократне лікування або переважно може містити в собі серію лікувань. Згідно із переважним прикладом суб'єкт одержує лікування за допомогою, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл згідно із даним винаходом один раз на тиждень приблизно 1-10 тижнів, переважно 2-8 тижнів, більш переважно приблизно 3-7 тижнів і навіть більш переважно протягом приблизно 4, 5 або 6 тижнів. Фармацевтичні композиції згідно із даним винаходом можна вводити один раз на день, два рази на день або три рази на день. Альтернативно, фармацевтичні композиції можна вводити один раз на тиждень, два рази на тиждень, один раз у два тижні, один раз на місяць, кожні шість тижнів, один раз у два місяці, двічі на рік або один раз на рік. Крім того, слід розуміти, що ефективне дозування молекул, використовуваних для лікування, може збільшуватися або зменшуватися протягом курсу конкретного лікування.

VI. Застосування композицій згідно із даним винаходом

Біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 згідно із даним винаходом характеризуються здатністю забезпечувати лікування будь-якого захворювання або стану, пов'язаного з експресією CD123 або, що характеризується експресією CD123. Таким чином, без обмежень такі молекули можна використовувати в діагностиці або лікуванні гострого мієлоїдного лейкозу (ГМЛ), хронічного мієлоїдного лейкозу (ХМЛ), включаючи в себе бластний криз ХМЛ і онкоген Абельсона, пов'язаний із ХМЛ (транслокацію Bcr-ABL), мієлодиспластичного синдрому (МДС), гострого В-лімфобластного лейкозу (В-ГЛЛ), хронічного лімфocитарного лейкозу (ХЛЛ), включаючи в себе ХЛЛ із синдромом Ріхтера або трансформацією Ріхтера, волохатоклітинного лейкозу (ВКЛ), новоутворення із бластних плазмацитоїдних дендритних клітин (УБПДК), нехождкінських лімфом (НХЛ), включаючи в себе мантийноклітинну лімфому (МКЛ) і дрібноклітинну лімфocитарну лімфому (МЛЛ), лімфоми Ходжкіна, системного мастоцитозу і лімфоми Беркіта (див. приклад 2); аутоімунної вовчанки (СЧВ), алергії, бронхіальної астми і ревматоїдного артриту. Крім того, біспецифічні діатіла згідно із даним винаходом можна використовувати у виробництві лікарських засобів для лікування описаних вище станів.

Представивши опис даного винаходу загалом, він стане більш зрозумілим з посиланням на наступні приклади, які представлені для ілюстрації і не передбачено, що вони обмежують даний винахід, якщо не зазначено інше.

Приклад 1

Конструкція CD123 x CD3 біспецифічних діатіл і контрольного білка

У таблиці 2 представлений перелік біспецифічних діатіл, які експресували і очищували. Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) і біспецифічне діатіло, що характеризується неоптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-B) здатні одночасно зв'язуватися з CD123 і CD3. Контрольне біспецифічне діатіло (контрольне DART) здатне одночасно зв'язуватися з FITC і CD3. Біспецифічні діатіла являють собою гетеродимери або гетеротримери з перерахованими амінокислотними послідовностями. Способи утворення біспецифічних діатіл представлені в міжнародних патентних публікаціях №№ WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 і WO 2012/162067.

Таблиця 2

Біспецифічні діатіла	Амінокислотні послідовності поліпептидного ланцюга	Нуклеїновокислотні кодуєчі послідовності
Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) (зв'язується з CD3 на епітопі 1)	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:4
Біспецифічне діатіло, що характеризується неоптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-B) (зв'язується з CD3 на епітопі 2)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:6 SEQ ID NO:8
Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-A w/ABD) (зв'язується з CD3 на епітопі 1), містить альбумінзв'язуючий домен (ABD) для збільшення періоду напівжиття in vivo	SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:10 SEQ ID NO:4
Версія 1, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла, що містить домен Fc IgG (версія 1 DART-A w/Fc) (зв'язується з CD3 на епітопі 1), містить домен Fc для збільшення періоду напівжиття in vivo	SEQ ID NO:54 SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:16
Версія 2, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла, що містить домен Fc IgG (версія 2 DART-A w/Fc) (зв'язується з CD3 на епітопі 1), містить домен Fc для збільшення періоду напівжиття in vivo	SEQ ID NO:54 SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:2
Контрольне біспецифічне діатіло (контрольне DART) (зв'язується з CD3 на епітопі 1) (зв'язується з нерелевантною мішенню - FITC)	SEQ ID NO:19 SEQ ID NO:20	

Приклад 2

Мічення антитілом клітин - мішеней для кількісного FACS (QFACS)

- У загальному 10^6 клітин - мішеней збирали з культури, ресуспендовували в 10 % сироватці АВ людини в буфері для FACS (PBS+1 % BSA+0,1 % NaAzide) і інкубували протягом 5 хв. для блокування рецепторів Fc. Мічення антитілом мікросфер з різними здатностями зв'язуватися з антитілом (Quantum™ Simply Cellular® (QSC), Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN) і клітини - мішені мітили за допомогою PE антитіла до CD123 (BD BioSciences) згідно з інструкціями виробника. Коротко, одну краплю кожної мікросфери QSC додавали в 5 мл поліпропіленову пробірку і мічене PE антитіло до CD123 додавали в концентрації 1 мкг/мл як до клітин - мішеней, так і мікросферам. Пробірки інкубували в темряві протягом 30 хвилин при 4 °C. Клітини і мікросфери промивали шляхом додавання 2 мл буфера для FACS і центрифугування при 2500 x G протягом 5 хвилин. Одну краплю популяції порожніх мікросфер додавали після промивання. Мікросфери аналізували спочатку на проточному цитометрі для встановлення специфічних для аналізу налаштувань приладу (напруги PMT і компенсація). З використанням таких самих налаштувань приладу реєстрували геометричне середнє значень флуоресценції мікросфер і клітин - мішеней. Стандартну криву сайтів зв'язування з антитілом на популяціях мікросфер одержували з геометричного середнього значень флуоресценції популяцій мікросфер. Сайти зв'язування з антитілом на клітинах - мішенях розраховували на підставі середнього

геометричного значень флуоресценції клітин - мішеней з використанням стандартної кривої, отриманої для мікросфер в електронній таблиці QuickCal (Bangs Laboratories).

Для визначення підходящих клітинних ліній - мішеней для оцінки CD123 x CD3 біспецифічних діатіл, рівні поверхневої експресії CD123 на лініях - мішенях Kasumi-3 (ГМЛ), Molm13 (ГМЛ), THP-1 (ГМЛ), TF-1 (еритролейкоз) і RS4-11 (ОЛЛ) оцінювали за допомогою кількісного аналізу FACS (QFACS). Абсолютні кількості сайтів зв'язування з антитілом CD123 на клітинній поверхні розраховували з використанням набору QFACS. Як показано в таблиці 3, абсолютна кількість сайтів зв'язування з антитілом CD123 на клітині становили порядок Kasumi-3 (високе) > Molm13 (середнє) > THP-1 (середнє) > TF-1 (помірно низьке) > RS4-11 (низьке). Три клітинні лінії з найвищими рівнями експресії являли собою клітинні лінії ГМЛ: Kasumi-3, MOLM13 і THP-1. Ті, що не мали відношення до ГМЛ клітинних ліній: TF-1 і RS4-11, характеризувалися помірно низькою/низькою експресією CD123, відповідно.

Таблиця 3

Клітинна лінія - мішеней	Поверхнева експресія CD123 (сайти зв'язування з антитілом)
Kasumi-3	118620
Molm13	27311
THP-1	58316
TF-1	14163
RS4-11	957
A498	Негативна
HT29	Негативна

Приклад 3

15 Аналіз цитотоксичності CTL (аналіз вивільнення LDH)

Прикріплені пухлинні клітини - мішені відкріплювали за допомогою 0,25 % розчину трипсину-EDTA і збирали шляхом центрифугування при 1000 об./хв. протягом 5 хв. Суспензію клітинних ліній - мішеней збирали з культури, відмивали за допомогою середовища для аналізу. Концентрацію і життєздатність клітин вимірювали за витисненням трипанового синього з використанням лічильника клітин Beckman Coulter Vi-Cell. Клітини - мішені розводили до 4×10^5 клітин/мл у середовищі для аналізу. 50 мкл розведеної клітинної суспензії додавали в 96-ямокний U-донний оброблений клітинною культурою планшет (№ за кат. BD Falcon 353077).

20 Встановлювали три набори контролів для вимірювання максимального вивільнення з мішені (MR), незалежної від антитіла Т-клітинної цитотоксичності (AICC) і спонтанного вивільнення із клітини - мішені (SR) у такий спосіб:

1) MR: 200 мкл середовища для аналізу без CD123 x CD3 біспецифічних діатіл і 50 мкл клітин - мішеней; детергент додавали наприкінці експерименту для визначення максимального вивільнення LDH.

30 2) AICC: 50 мкл середовища для аналізу без CD123 x CD3 біспецифічних діатіл, 50 мкл клітин - мішеней і 100 мкл Т-клітин.

3) SR: 150 мкл середовища без CD123 x CD3 біспецифічних діатіл і 50 мкл клітин - мішеней. CD123 x CD3 біспецифічні діатіла (DART-A, DART-A w/ABD і DART-B) і контролі спочатку розводили до концентрації, що становить 4 мкг/мл, і потім одержували серійні розведення до кінцевої концентрації, що становить 0,00004 нг/мл (тобто 40 фмг/мл). 50 мкл розведень додавали до планшета, що містить 50 мкл клітин - мішеней/лунка.

35 Очищені Т-клітини промивали один раз середовищем для аналізу і ресуспендовували в середовищі для аналізу із щільністю Т-клітин, що становить 2×10^6 клітин/мл. 2×10^5 Т-клітин в 100 мкл додавали до кожної лунки до кінцевого співвідношення ефектора до клітини - мішені (Е:Т), що становить 10:1. Планшети інкубували протягом приблизно 18 год. при 37 °C в 5 % CO₂.

40 Після інкубації 25 мкл 10х лізуючого розчину (Promega, № за кат. G182A) або 1 мг/мл дигітоніну додавали до контрольних лунок максимального вивільнення, перемішували за допомогою піпетки 3 рази і планшети інкубували протягом 10 хв. до повного лізису клітин - мішеней. Планшети центрифугували при 1200 об./хв. протягом 5 хвилин і 50 мкл супернатанту переносили з кожної лунки аналітичного планшета в плоскодонний планшет для ELISA і 50 мкл розчину субстрату LDH (Promega, № за кат. G1780) додавали до кожної лунки. Планшети інкубували протягом 10-20 хв при кімнатній температурі (RT) у темряві, потім додавали 50 мкл стоп - розчину. Оптичну щільність (O.D.) вимірювали при 490 нм у межах 1 год. на планшет-

ридері Victor2 Multilabel (Perkin Elmer, № за кат. 420-014). Цитотоксичність в % розраховували, як описано нижче, і криві відповіді на дозу одержували з використанням програмного забезпечення GraphPad PRISM5®.

Лізис конкретних клітин розраховували з даних O.D. з використанням наступної формули:

$$\text{Цитотоксичність (\%)} = 100 \times (\text{OD зразка} - \text{OD AICC}) / (\text{OD MR} - \text{OD SR})$$

Переспрямований цитоліз клітинних ліній - мішеней за допомогою різних рівнів поверхневого CD123

CD123 x CD3 біспецифічні діатіла виявили виражену здатність до перенаправленого цитолізу з концентраціями, які повинні досягати 50 % від максимальної активності (EC50s) у діапазоні суб-нг/мл, незалежно від специфічності зв'язування з епітопом CD3 (DART-A у порівнянні з DART-B) у клітинних лініях - мішенях з високим рівнем експресії CD123, Kasumi-3 (EC50=0,01 нг/мл) (фігура 4, панель D), середнім рівнем експресії CD123, Molm13 (EC50=0,18 нг/мл) і THP-1 (EC50=0,24 нг/мл) (фігура 4, панель C і E, відповідно) і помірно низьким або низьким рівнем експресії CD123, TF-1 (EC50=0,46 нг/мл) і RS4-11 (EC50=0,5 нг/мл) (фігура 4, панель B і A, відповідно). Аналогічно, опосередкований CD123 x CD3 біспецифічними молекулами переспрямований цитоліз також спостерігали із численними клітинними лініями - мішенями з Т-клітинами з різних донорів і відсутність активності у вигляді перенаправленого цитолізу спостерігали в клітинних лініях, які не експресують CD123. Результати узагальнено представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

Клітинна лінія - мішень	Поверхнева експресія CD123 (сайти зв'язування з антитілом)	EC50, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл (нг/мл) E:T=10:1	Макс. % цитолізу
Kasumi-3	118620	0,01	94
Molm13	27311	0,18	43
THP-1	58316	0,24	40
TF-1	14163	0,46	46
RS4-11	957	0,5	60
A498	Негативна	Немає активності	Немає активності
HT29	Негативна	Немає активності	Немає активності

Якщо буде потреба відтворити зазначений приклад, слід розуміти, що фахівець у даній області техніки зможе в межах доцільних і прийнятних границь змінити описаний вище протокол підходящим чином для відтворення описаних результатів. Таким чином, не мається на увазі, що проілюстрований протокол повинен дотримуватися точно визначеним чином.

Приклад 4

Т-клітинна активація під час перенаправленого цитолізу за допомогою біспецифічних діатіл (DART-A, DART-A w/ABD і DART-A w/Fc), що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3

Біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 виявили виражену здатність до перенаправленого цитолізу незалежно від присутності або відсутності технології збільшення періоду напівжиття (DART-A у порівнянні з DART-A w/ABD у порівнянні з DART-A w/Fc) у клітинних лініях - мішенях з високою експресією CD123, Kasumi-3, і середньою експресією CD123, THP-1 (фігура 5, панелі A і B, відповідно). Щоб одержати характеристики Т-клітинної активації протягом процесу опосередкованого, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатілом перенаправленого цитолізу, Т-клітини з аналізів перенаправленого цитолізу офарблювали відносно маркера Т-клітинної активації CD25 і аналізували за допомогою FACS. Як показано на фігурі 5, панелі D, CD25 зазнав позитивно регуляції в CD8 Т-клітинах залежним від дози чином, указуючи на те, що, біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 індукуювали Т-клітинну активацію в процесі перенаправленого цитолізу. Напроти, при відсутності клітин - мішеней не спостерігалася активація CD8 Т-клітин (фігура 5, панель C), що вказує на те, що біспецифічні діатіла, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 не активують Т-клітини при відсутності клітин - мішеней. Аналогічно, CD8 Т-

клітини не активувалися при інкубації із клітинами - мішенями і контрольним біспецифічним діатілом (контрольним DART) (фігура 5, панель D), указуючи на необхідність перехресної зшивки Т-клітини і клітини - мішені з біспецифічними діатілами, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3.

5 Приклад 5

Внутрішньоклітинне фарбування по відношенню до гранзиму В і перфорину

Для визначення внутрішньоклітинних вмістів гранзиму В і перфорину в Т-клітинах аналіз CTL налаштовували, як описано вище. Через приблизно 18 год. клітини з аналітичного планшета офарблювали антитілами до CD4 і до CD8 шляхом інкубації протягом 30 хвилин при 4 °С. Після поверхневого фарбування клітини інкубували в 100 мкл буфера для фіксації і пермеабілізації (BD BioSciences) протягом 20 хв. при 4 °С. Клітини промивали буфером для пермеабілізації/відмивання (BD BioSciences) і інкубували в 50 мкл суміші антитіл до гранзиму В і перфорину (отриманої в 1X буфері для пермеабілізації/відмивання) при 4 °С протягом 30 хвилин. Потім клітини промивали за допомогою 250 мкл буфера для пермеабілізації/відмивання і ресуспендували в буфері для пермеабілізації/відмивання для одержання даних FACS.

Позитивна регуляція гранзиму В і перфорину, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічним діатілом (DART-A) в Т-клітинах під час перенаправленого цитолізу

Для дослідження можливого механізму опосередкованою, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічним діатілом (DART-A), цитотоксичності Т-клітинами, внутрішньоклітинні вмісти гранзиму В і перфорину вимірювали в Т-клітинах після перенаправленого цитолізу. Залежну від дози позитивну регуляцію вмістів гранзиму В і перфорину як в CD8, так і CD4 Т-клітинах спостерігали після інкубації Т-клітин і клітин Kasumi-3 з DART-A (фігура 6, панель А). Цікаво, що позитивна регуляція була майже у два рази вища в CD8 Т-клітинах у порівнянні з CD4 Т-клітинами (фігура 6, панель А). Якщо аналіз проводили в присутності інгібіторів гранзиму В і перфорину, клітинний лізис не спостерігався. Позитивна регуляція гранзиму В або перфорину була відсутня в CD8 або CD4 Т-клітинах, якщо Т-клітини інкубували із клітинами - мішенями Kasumi-3 і контрольним біспецифічним діатілом (контрольним DART) (фігура 5, панель В). Наведені дані вказують на те, що опосередкований DART-A лізис клітин - мішеней може бути опосередкований через механізми за участю гранзиму В і перфорину.

Приклад 6

In vivo протипухлинна активність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A)

35 Виділення PBMC і Т-клітин із цільної крові людини

PBMC від здорових донорів - людей виділяли із цільної крові з використанням центрифугування в градієнті Фікола. Коротко, цільну кров розводили 1:1 стерильним PBS. 35 мл розведеної крові наносили на 15 мл Ficoll-Paque™ Plus в 50 мл пробірках і пробірки центрифугували при 1400 об./хв. протягом 20 хв. із розгальмовуванням. Лейкоцитарну плівку між двома фазами збирали в 50 мл пробірку з 45 мл PBS шляхом центрифугування пробірок при 600 x g (1620 об./хв.) протягом 5 хв. Супернатант видаляли і клітинний осад відмивали один раз за допомогою PBS і кількість життєздатних клітин визначали шляхом витиснення барвника трипанового синього. PBMC ресуспендували до кінцевої концентрації, що становить $2,5 \times 10^6$ клітин/мл у повному середовищі (RPMI 1640, 10 %FBS, 2 мМ глутаміну, 10 мМ HEPES, 100 мкМ/100мкМ/мл пеніциліну/стрептоміцину (P/S)).

45 Виділення Т-клітин. Не піддані впливу Т-клітини виділяли шляхом негативної селекції з PBMC із цільної крові людини з використанням набору для виділення Т-клітин людини Dynabeads Untouched (Life Technologies) згідно з інструкціями виробника. Після виділення Т-клітини культивували протягом ночі в середовищі RPMI з 10 % FBS, 1 % пеніциліну/стрептоміцину.

Модель пухлини

55 Т-клітини і пухлинні клітини людей (Molm13 або RS4-11) комбінували у співвідношенні 1:5 (1×10^6 і 5×10^6 , відповідно) і суспендували в 200 мкл стерильного сольового розчину і вводили за допомогою підшкірної ін'єкції (SC) в 0 день дослідження (SD0). Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) або контрольне біспецифічне діатіло (контрольне DART) вводили внутрішньовенно (IV) за допомогою ін'єкцій у хвостову вену по 100 мкл, як презентовано в таблиці 5 (MOLM13) і таблиці 6 (RS4-11).

Таблиця 5

Схема дослідження для моделі MOLM13

Група лікування	Доза (мг/кг)	Схема	Кількість тварин
Контроль - інертний носій (клітини MOLM-13 окремо імплантовані або + Т-клітини)	-	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,5	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,2	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,1	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,02	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,004	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,0008	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,00016	SD0, 1, 2, 3	8

Таблиця 6

Схема дослідження для моделі RS4-11

Група лікування	Доза (мг/кг)	Схема	Кількість тварин
Контроль - інертний носій (клітини RS4-11 окремо імплантовані)	-	SD0, 1, 2, 3	8
Контроль - інертний носій (RS4-11+Т-клітини імплантовані)	-	SD0, 1, 2, 3	8
Контрольне DART	0,2	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,5	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,2	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,1	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,02	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,004	SD0, 1, 2, 3	8

Збір даних і статистичний аналіз:

5 Маса тварин - Маса окремих тварин реєстрували два рази на тиждень до завершення дослідження, починаючи з моменту ін'єкції пухлинних клітин.

10 Стан агонії/смертність - Проводили спостереження за тваринами два рази на тиждень відносно загального стану агонії і щодня відносно смертності. Смертельні випадки тварин оцінювали як пов'язані з лікарським засобом або технічні на підставі факторів, включаючи в себе макроскопічні спостереження і втрату маси тіла; смертельні випадки у тварин реєстрували щодня.

довжина (мм) x ширина²

Об'єм пухлини - Об'єми окремих пухлин реєстрували двічі на тиждень, починаючи не пізніше одного тижня після імплантації пухлини і продовжуючи до завершення дослідження.

Об'єм пухлини (мм³)

$$\text{Tumor Volume (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Length (mm)} \times \text{width}^2}{2}$$

15 Тварини, що вмерли внаслідок технічної або пов'язаної з лікарським засобом смерті, виключали з розрахунків даних.

Інгібування росту пухлини - Значення інгібування росту пухлини (TGI) розраховували для кожної групи, що містить тварин, що одержали лікування, з використанням наступної формули:

20 Середній кінц. об'єм пухлини (який піддівали лікуванню)-середній початк. об'єм пухлини (який піддівали лікуванню)

Середній кінц. об'єм пухлини (контроль)-середній поч. об'єм пухлини (контроль)

$$1 - \frac{\text{Mean Final Tumor Volume (Treated)} - \text{Mean Initial Tumor Volume (Treated)}}{\text{Mean Final Tumor Volume (Control)} - \text{Mean Initial Tumor Volume (Control)}} \times 100$$

25 Тварин, у яких спостерігалася часткова або повна ремісія, або тварин, що вмерли внаслідок технічної або пов'язаної з лікарським засобом смерті, виключали з розрахунків TGI. Критерії

Національного інституту раку для активності сполуки становить $TGI > 58\%$ (Corbett et al. (2004) Anticancer Drug Development Guide; Totowa, NJ: Humana 99-123).

Часткова/повна відповідь пухлини - Окремих мишей, що характеризуються наявністю пухлин розміром менше ніж 1 мм^3 на 1 день, класифікували як таких, що характеризуються частковою ремісією (PR) і значення регресії пухлини в $\%$ ($\%TR$) визначали з використанням наступної формули:

$$1 - \frac{\text{Початковий об'єм пухлини (мм}^3\text{)}}{\text{Кінцевий об'єм пухлини (мм}^3\text{)}} \times 100\%$$

$$1 - \frac{\text{Final Tumor Volume (mm}^3\text{)}}{\text{Initial Tumor Volume (mm}^3\text{)}} \times 100\%$$

Окремих мишей, у яких були відсутні пальпуємі пухлини, класифікували як таких, що зазнали повної ремісії (CR).

Статистичні дані відносно об'єму пухлини - Статистичний аналіз проводили між контрольними групами, що одержали лікування і, порівнюючи об'єми пухлин. Для цих аналізів використовували двохфакторні аналізи дисперсії з наступним апостеріорним критерієм Бонферони. Усі аналізи проводили з використанням програмного забезпечення GraphPad PRISM® (версії 5.02). Дані у відношенні маси і пухлини від окремих тварин, що вмерли внаслідок технічної або пов'язаної з лікарським засобом смерті, виключали з аналізу. Проте, дані відносно пухлин тварин, які продемонстрували часткову або повну відповідь, включали в зазначені розрахунки.

Результати MOLM13

Клітинну лінію ГМЛ, MOLM13, попередньо змішували з активованими Т-клітинами і імплантували SC NOD/SCID гама (NSG) нокаутним мишам ($N=8/\text{група}$) у день SD0, як докладно описано нижче. Пухлини MOLM13 в отримавшій лікування за допомогою інертного носія групі (клітини MOLM13 окремо або разом з Т-клітинами) продемонстрували профіль щодо агресивного росту in vivo (фігура 7, панелі А і В). У день SD8 середній об'єм пухлин отримавших лікування за допомогою інертного носія групі становив $129,8 \pm 29,5 \text{ мм}^3$ і до дня SD15 пухлини досягли середнього об'єму, що становить $786,4 \pm 156,7 \text{ мм}^3$. До кінця експерименту в день SD18 пухлини досягли середнього об'єму, що становить $1398,8 \pm 236,9 \text{ мм}^3$.

Лікування за допомогою DART-A починали в той же день, як була імплантована суміш пухлинних клітин і Т-клітин [(SD0)] і продовжували далі із щоденними ін'єкціями протягом додаткових 7 днів для досягнення в загальному 8 щоденних ін'єкцій. Тварин лікували за допомогою DART-A при 9 рівнях дози (0,5, 0,2, 0,1, 0,02 і 0,004 мг/кг і 20, 4, 0,8 і 0,16 мг/кг). Результати показано на фігурі 7, панелі А (0,5, 0,2, 0,1, 0,02 і 0,004 мг/кг) і фігурі 7, панелі В (20, 4, 0,8 і 0,16 мг/кг). У день дослідження 11 ріст пухлин MOLM13 значно інгібувався при рівнях дози, що становлять 0,16, 0,5, 0,2, 0,1, 0,02 і 0,004 мг/кг ($p < 0,001$). Більше того, лікування мишей з пухлиною MOLM13 при рівнях доз, що становлять 20 і 4 мг/кг доза, призводило до 8/8 і 7/8 CR, відповідно. До кінця експерименту в день SD18 середній об'єм пухлин, оброблених за допомогою DART-A у дозі, що становить 0,8 - 20 мг/кг, перебував у діапазоні від $713,6,0 \pm 267,4$ до 0 мм^3 , причому всі пухлини були значно менші, ніж пухлини в отримавшій лікування за допомогою інертного носія контрольній групі. Значення TGI становили 100, 94 і 49 $\%$ для груп, що одержали дози 20, 4 і 0,8 мг/кг, відповідно. У порівнянні з отримавшою лікування за допомогою інертного носія групі з пухлинними клітинами MOLM13, групи, які одержали DART-A при рівні дози, що становить 20 і 4 мг/кг, досягли статистичного рівня значимості до дня SD15, тоді як група, що одержала лікування за допомогою 0,8 мг/кг, досягла статистичного рівня значимості до дня SD18.

Результати RS4-11

Клітинну лінію ОЛЛ, RS4-11, попередньо змішували з активованими Т-клітинами і імплантували SC NOD/SCID гама (NSG) нокаутним мишам ($N=8/\text{група}$) у день SD0, як докладно описано нижче. Пухлини RS4-11 в отримавшій лікування за допомогою інертного носія групі (клітини RS4-11 окремо або разом з Т-клітинами) продемонстрували профіль щодо агресивного росту in vivo (фігура 8).

Лікування за допомогою DART-A починали в той же день, як була імплантована суміш пухлинних клітин і Т-клітин [(SD0)] і продовжували далі із щоденними ін'єкціями протягом додаткових 3 днів для досягнення в загальному 4 щоденних ін'єкцій. Тварин лікували за допомогою DART-A при 5 рівнях доз (0,5, 0,2, 0,1, 0,02 і 0,004 мг/кг). Результати показані на фігурі 8.

Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) ефективно інгібувало ріст як MOLM13 ГМЛ, так і RS4-11ОЛЛ пухлин, імплантованих SC NOD/SCID мишам у контексті моделі Winn, якщо введення доз починали в день імплантації і продовжували протягом 3 або більше послідовних днів. На підставі критеріїв, встановлених Національним інститутом раку, DART-A при рівні дози, що становить 0,1 мг/кг і вище (TGI >58), вважається активним у моделі RS4-11, і доза DART-A, що складає 0,004 мг/кг і вище, була активною в моделі MOLM13. Більш низькі дози DART-A, пов'язані з інгібуванням росту пухлин у моделі MOLM13 у порівнянні з моделлю RS4-11, узгодяться з даними *in vitro*, що демонструють, що клітини MOLM13 характеризуються підвищеним рівнем експресії CD123, ніж клітини RS4-11, що корелює з підвищеною чутливістю до опосередкованої DART-A цитотоксичності *in vitro* у клітинах MOLM13.

Якщо буде потреба відтворити зазначений приклад, слід розуміти, що фахівець у даній області техніки зможе в межах доцільних і прийнятних границях змінити описаний вище протокол підходящим чином для відтворення описаних результатів. Таким чином, не мається на увазі, що проілюстрований протокол повинен дотримуватися точно визначеним чином.

Приклад 7

Поверхнева експресія CD123 на лейкозних бластних клітинах і стовбурових клітинах у первинному зразку тканини від пацієнта 1 з ГМЛ

Для визначення патерну експресії CD123 у первинних зразках від пацієнта 1 з, кріоконсервовані первинні зразки кісткового мозку і PBMC пацієнта з ГМЛ оцінювали відносно поверхневої експресії CD123 на лейкозних бластних клітинах.

Зразок кісткового мозку ГМЛ- клінічний звіт

Вік: 42

Стать: жіноча

Підтип ГМЛ: M2

Відсоткове співвідношення злоякісних клітин на підставі морфології: 67,5 %

Імунофенотипування кісткового мозку:

CD15=19 %, CD33=98,5 %, CD38=28,8 %, CD45=81,8 %, CD64=39,7 %, CD117=42,9 %, HLA-DR=17 %, CD2=1,8 %, CD5=0,53 %, CD7=0,2 %, CD10=0,41 %, CD19=1,1 %, CD20=1,4 %, CD22=0,71 % CD34=0,82 %

Експресія CD123 у лейкозних бластних клітинах у мононуклеарах кісткового мозку (BM MNC)

Загалом $0,5 \times 10^6$ мононуклеарів кісткового мозку (BM MNC) і мононуклеарів периферичної крові (PBMC) від пацієнта 1 з ГМЛ оцінювали відносно експресії CD123. Клітинну лінію Kasumi-3 включали в якості контролю. Лейкозні бластні клітини ідентифікували з використанням мієлоїдного маркера CD33. Як показано на фігурі 9, панелі А, 87 % клітин з кісткового мозку ГМЛ від пацієнта 1 експресували CD123 і CD33. Рівні експресії CD123 були дещо нижче, ніж в експресуючій CD123 на високому рівні клітинній лінії ГМЛ, Kasumi-3 (фігура 9, панель В).

Приклад 8

Аналіз аутологічного цитолізу CTL з використанням первинних зразків від пацієнта з ГМЛ

Кріоконсервований первинний зразок ГМЛ (мононуклеари кісткового мозку (BMNC) і мононуклеари периферичної крові (PBMC)) від пацієнта 1 з ГМЛ відтаювали в RPMI 1640 з 10 % FBS і залишали для відновлення протягом ночі при 37 °C в 5 % CO₂. Клітини промивали середовищем для аналізу (RPMI 1640+10 %FBS) і кількість життєздатних клітин визначали за витисненням трипанового синього. 150000 клітин/лунка в 150 мкл середовища для аналізу додавали до 96-ямкового U-донного планшету (BD BioSciences). Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) розводили до 0,1 і 0,01 нг/мл і 50 мкл кожного розведення додавали до кожної лунки (кінцевий об'єм = 200 мкл). Контрольне біспецифічне діатіло (контрольне DART) розводили до 0,1 нг/мл і 50 мкл кожного розведення додавали до кожної лунки (кінцевий об'єм = 200 мкл). Окремий аналітичний планшет налаштовували для кожної часової точки (48, 72, 120 і 144 години) і планшети інкубували при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO₂. У кожну часову точку клітини офарблювали за допомогою антитіл до CD4, CD8, CD25, CD45, CD33 і CD123. Мічені клітини аналізували в проточному цитометрі FACS Calibur, обладнаному програмним забезпеченням для збору даних CellQuest Pro, версії 5.2.1 (BD BioSciences). Аналіз даних проводили з використанням програмного забезпечення Flowjo v9.3.3 (Treestar, Inc). Т-клітинну експансію вимірювали шляхом гейтирування на популяціях CD4+ і CD8+ і активацію визначали шляхом вимірювання середнього значення інтенсивності флуоресценції CD25 (MFI) на гейтированих у відношенні CD4+ і CD8+ популяціях. Популяцію лейкозних бластних клітин ідентифікували за допомогою гейтирування CD45+CD33+.

Аутологічна деплеція пухлинних клітин, Т-клітинна експансія і активація за допомогою біспецифічного діатіла, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) у первинних зразках від пацієнта 1 з ГМЛ

Для визначення опосередкованою біспецифічним діатілом, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) активності у пацієнта 1 з ГМЛ, зразки від пацієнта інкубували з 0,1 нг/мл або 0,01 нг/мл DART-A і відсоткові відношення лейкозних бластних клітин і Т-клітин вимірювали в різні часові точки після лікування. Лейкозні бластні клітини ідентифікували шляхом CD45+/CD33+ гейтирування. Інкубація первинних зразків кісткового мозку при ГМЛ із DART-A приводила до деплеції популяції лейкозних клітин із часом (фігура 10, панель А), що супроводжувалося супутньою експансією залишкових Т-клітин (фігура 10, панель В) і індукцією маркерів Т-клітинної активації (фігура 10, панель С). В оброблених DART-A зразках Т-клітини зазнали експансії від приблизно 7 % до приблизно 80 % до 120 год. Т-клітинна активація, вимірювана по експресії CD25 на CD4 і CD8 клітинах, досягала піка через 72 год. і знижувалася до часової точки 120 год.

Якщо буде потреба відтворити зазначений приклад, слід розуміти, що фахівець у даній області техніки зможе в межах доцільних і прийнятних границях змінити описаний вище протокол підходящим чином для відтворення описаних результатів. Таким чином, не мається на увазі, що проілюстрований протокол повинен дотримуватися точно визначеним чином.

Приклад 9

Поверхнева експресія CD123 на лейкозних бластних клітинах і стовбурових клітинах у первинному зразку тканини від пацієнта з ОЛЛ

Для визначення патерну експресії CD123 у первинних зразках від пацієнта з ОЛЛ, кріоконсервованій первинний зразок PBMC від пацієнта з ОЛЛ оцінювали відносно поверхневої експресії CD123 на лейкозних бластних клітинах.

Експресія CD123 у лейкозних бластних клітинах у мононуклеарах периферичної крові (PBMC)

Загалом $0,5 \times 10^6$ мононуклеарів периферичної крові (PBMC) від здоровішого донора і пацієнта з ОЛЛ оцінювали відносно експресії CD123. Як показано на фігурі 11, панелях Е-Н переважну більшість клітин з кісткового мозку ОЛЛ експресували CD123. Навпаки, як передбачалося, у нормального донора В-клітини є негативними у відношенні CD123 і рDC і моноцити є позитивними у відношенні CD123 (фігура 11, панель D).

Т-клітинну популяцію ідентифікували в зразку пацієнта з ОЛЛ по фарбуванню клітин у відношенні CD4 і CD8. Як показано на фігурі 12, панелі В, тільки невелика фракція загальних PBMC у зразку пацієнта з ОЛЛ являла собою Т-клітини (приблизно 0,5 % являли собою CD4 Т-клітини і приблизно 0,4 % являли собою CD8 Т-клітини).

Приклад 10

Аналіз аутологічного цитолізу CTL з використанням первинних зразків від пацієнта з ОЛЛ

Кріоконсервованій первинний зразок ОЛЛ (мононуклеари периферичної крові (PBMC)) відтаювали в RPMI 1640 з 10 % FBS і залишали відновлюватися протягом ночі при 37 °C в 5 % CO₂. Клітини промивали середовищем для аналізу (RPMI 1640+10 %FBS) і кількість життєздатних клітин визначали по витисненню трипанового синього. 150000 клітин/лунка в 150 мкл середовища для аналізу додавали до 96-ямкового U-донного планшету (BD BioSciences). Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) розводили до 10, 1 нг/мл і 50 мкл кожного розведення додавали до кожної лунки (кінцевий об'єм = 200 мкл). Окремий аналітичний планшет встановлювали для кожної часової точки (48, 72, 120 і 144 години) і планшети інкубували при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO₂. У кожній часовій точці клітини офарблювали за допомогою антитіл до CD4, CD8, CD25, CD45, CD33 і CD123. Мічені клітини аналізували в проточному цитометрі FACS Calibur, обладнаному програмним забезпеченням для збору даних CellQuest Pro, версії 5.2.1 (BD BioSciences). Аналіз даних проводили з використанням програмного забезпечення Flowjo v9.3.3 (Treestar, Inc). Т-клітинну експансію вимірювали шляхом гейтирування на популяціях CD4+ і CD8+ і активацію визначали шляхом вимірювання MFI CD25 на гейтированих у відношенні CD4+ і CD8+ популяціях. Популяцію лейкозних бластних клітин ідентифікували за допомогою гейтирування CD45+CD33+.

Аутологічна деплеція пухлинних клітин, Т-клітинна експансія і активація за допомогою біспецифічного діатіла, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) у первинних зразках від пацієнтів з ОЛЛ

Для визначення опосередкованої біспецифічним діатілом, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) активності в первинних зразках від пацієнта з ОЛЛ зразки пацієнта інкубували з 1 нг/мл DART-A і відсоткові відносини лейкозних

бластних клітин і Т-клітин вимірювали в різні часові точки після лікування. Лейкозні бластні клітини ідентифікували по CD45⁺/CD33⁺ гейтируванню. Інкубація первинних зразків кісткового мозку при ОЛЛ із DART-A приводила до деплеції популяції лейкозних клітин із часом у порівнянні з необробленим контролем або контрольним DART (фігура 13, панель Н у порівнянні з панелями F і G). Якщо Т-клітини підраховували (фарбування у відношенні CD8 і CD4) і активацію (фарбування у відношенні CD25) аналізували, Т-клітини піддавали експансії і активувалися в зразку DART-A (фігура 14, панелі I і L, відповідно) у порівнянні з необробленими зразками або обробленими контрольним DART зразками (фігура 14, панелі Н, G, K і J, відповідно).

Приклад 11

Поверхнева експресія CD123 на лейкозних бластних клітинах і стовбурових клітинах у первинному зразку тканини від пацієнта 2 з ГМЛ

Для визначення патерну експресії CD123 у первинних зразках пацієнта 2 з ГМЛ кріоконсервовані первинні зразки кісткового мозку і PBMC пацієнта з ГМЛ оцінювали відносно поверхневої експресії CD123 на лейкозних бластних клітинах.

Експресія CD123 у лейкозних бластних клітинах у мононуклеарах кісткового мозку (BMNC)

Загалом $0,5 \times 10^6$ мононуклеарів кісткового мозку (BM MNC) і мононуклеарів периферичної крові (PBMC) від пацієнта 2 з ГМЛ оцінювали для ідентифікації лейкозних бластних клітин. Лейкозні бластні клітини ідентифікували з використанням мієлоїдних маркерів CD33 і CD45. Як показано на фігурі 15, панелі В, 94 % клітин з кісткового мозку з ГМЛ являли собою лейкозні бластні клітини. Т-клітинну популяцію ідентифікували по експресії CD3. Як показано на фігурі 15, панелі С, приблизно 15 % клітин зі зразка кісткового мозку ГМЛ і PBMC являли собою Т-клітини.

Приклад 12

Аналіз аутологічного цитолізу CTL з використанням первинних зразків від пацієнта 2 з ГМЛ

Кріоконсервований первинний зразок ГМЛ (мононуклеари кісткового мозку (BM MNC) і мононуклеари периферичної крові (PBMC)) від пацієнта 2 з ГМЛ відтаювали в RPMI 1640 з 10 % FBS і залишали відновлюватися протягом ночі при 37 °C в 5 % CO₂. Клітини промивали середовищем для аналізу (RPMI 1640+10 % FBS) і кількість життєздатних клітин визначали по витисненню трипанового синього. 150000 клітин/лунка в 150 мкл середовища для аналізу додавали до 96-ямкового U-донного планшету (BD BioSciences). Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) і контрольне біспецифічне діатіло (контрольне DART) розводили до 0,1 і 0,01 нг/мл і 50 мкл кожного розведення додавали до кожної лунки (кінцевий об'єм = 200 мкл). Окремий аналітичний планшет встановлювали для кожної часової точки (48, 72, 120 і 144 години) і планшети інкубували при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO₂. У кожній часовій точці клітини офарблювали за допомогою антитіл до CD4, CD8, CD25, CD45, CD33 і CD123. Мічені клітини аналізували в проточному цитометрі FACS Calibur, обладнаному програмним забезпеченням для збору даних CellQuest Pro, версії 5.2.1 (BD BioSciences). Аналіз даних проводили з використанням програмного забезпечення Flowjo v9.3.3 (Treestar, Inc). Т-клітинну експансію вимірювали шляхом гейтирування на популяціях CD4⁺ і CD8⁺ і активацію визначали шляхом вимірювання MFI CD25 на гейтированих у відношенні CD4⁺ і CD8⁺ популяціях. Популяцію лейкозних бластних клітин ідентифікували за допомогою гейтирування CD45+CD33⁺.

Аутологічна деплеція пухлинних клітин, Т-клітинна експансія і активація в первинних зразках від пацієнта 2 з ГМЛ

Для визначення опосередкованою біспецифічним діатілом, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) активності в первинних зразках від пацієнта 2 з ГМЛ зразки пацієнта інкубували з 0,1 або 0,01 нг/мл DART-A і відсоткові відносини лейкозних бластних клітин і Т-клітин вимірювали в різні часові точки після лікування. Інкубація первинних зразків кісткового мозку при ГМЛ із DART-A приводила до деплеції популяції лейкозних клітин із часом (фігура 16, панель А), що супроводжувалося супутньою експансією залишкових Т-клітин (як CD4, так і CD8) (фігура 16, панель В і фігура 16, панель С, відповідно). Для визначення того, чи були Т-клітини активовані, клітини офарблювали у відношенні CD25 або Ki-67, обох маркерів Т-клітинної активації. Як показано на фігурі 17, панелях А і В, інкубація первинних зразків кісткового мозку при ГМЛ із DART-A приводила до Т-клітинної активації. Зазначені дані представляли часову точку 144 год.

Внутрішньоклітинне фарбування по відношенню до гранзиму В і перфорину.

Для визначення внутрішньоклітинних вмістів гранзиму В і перфорину в Т-клітинах проводили аналіз CTL. Через приблизно 18 год. клітини з аналітичного планшета офарблювали антитілами до CD4 і до CD8 шляхом інкубації протягом 30 хвилин при 4 °C. Після поверхневого фарбування

клітини інкубували в 100 мкл буфера для фіксації і пермеабілізації протягом 20 хв. при 4 °С. Клітини промивали буфером для пермеабілізації і інкубували в 50 мкл суміші антитіл до гранзиму В і перфोरину, отриманої в 1X буфері для пермеабілізації/відмивання, при 4 °С протягом 30 хвилин. Потім клітини промивали за допомогою 250 мкл буфера для пермеабілізації/відмивання і ресуспендовували в буфері для пермеабілізації/відмивання для одержання даних FACS

Позитивна регуляція гранзиму В і перфोरину, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічним діатілом (DART-A) в Т-клітинах під час перенаправленого цитолізу

Для дослідження можливого механізму опосередкованою біспецифічним діатілом, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) цитотоксичності Т-клітинами, внутрішньоклітинні вмісти гранзиму В і перфोरину вимірювали в Т-клітинах після перенаправленого цитолізу. Якщо Т-клітини інкубували з контрольним біспецифічним діатілом (контрольним DART), позитивну регуляцію гранзиму В і перфोरину не спостерігали. Позитивну регуляцію вмістів гранзиму В і перфोरину як в CD8, так і CD4 Т-клітинах спостерігали під дією біспецифічного діатіла, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) (фігура 17, панелі С і D). Цікаво, що позитивна регуляція була майже у два рази вище в CD8 Т-клітинах у порівнянні з CD4 Т-клітинами (фігура 17, панель С і фігура 17, панель D). Наведені дані вказують на те, що опосередкований DART-A лізис клітин - мішеней опосередкований через шлях за участю гранзиму В і перфोरину.

Приклад 13

Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3, перехресно реагує з білками CD123 і CD3 нелюдиноподібного примата

Для кількісного визначення ступеню зв'язування між біспецифічним діатілом, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) і CD3 людини або яванської макаки, проводили аналізи BIACORE™. В аналізах BIACORE™ вимірюють константу швидкості дисоціації, kd. Афінність зв'язування (KD) між антитілом і його мішенню являє собою функцію кінетичних констант для асоціації (константа швидкості асоціації, ka) і дисоціації (константа швидкості дисоціації, kd) згідно з формулою: $KD = [kd]/[ka]$. В аналізі BIACORE™ використовується поверхневий плазмонний резонанс для вимірювання прямо зазначених кінетичних параметрів. Рекомбінантний CD3 людини або яванської макаки прямо іммобілізували на підкладку. Очищений CD123 людини або яванської макаки захоплювали і іммобілізували на підкладку. Вимірювали час тривалості дисоціації і проводили бівалентну апроксимацію даних. Константи зв'язування і афінності одержували з використанням 1:1 апроксимації зв'язування. Результати аналізів BIACORE™, у яких порівнювали зв'язування з білками CD123 і CD3 людини в порівнянні з білками CD123 і CD3 яванської макаки, показані на фігурі 18. Афінності зв'язування з білками CD123 яванської макаки (фігура 18D) і CD3 яванської макаки (фігура 18B) є порівнянними з афінностями зв'язування для білків CD123 людини (фігура 18C) і CD3 людини (фігура 18A).

Приклад 14

Аутологічна деплеція моноцитів in vitro з PBMC людини і яванської макаки

PBMC зі зразків цільної крові людини або яванської макаки додавали до U-донних планшетів із щільністю Т-клітин, що становить 200000 клітин/лунка в 150 мкл середовища для аналізу. Розведення, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатіл (DART-A або DART-A w/ABD) одержували в середовищі для аналізу. 50 мкл кожного розведення DART-A або DART-A w/ABD додавали до планшета, що містить PBMC у лунках у двох паралелях. Планшети інкубували протягом ~ 18-24 год. при 37 °С. Супернатанти використовували для визначення цитотоксичності, як описано вище. Як показано на фігурі 19 (панелі А і В), деплецію клітин rDC спостерігали як в PBMC людини (фігура 19, панель А), так і PBMC яванської макаки (фігура 19, панель В). Зазначені результати вказують на те, що циркулюючі в кровотоці rDC можна використовувати в якості фармакодинамічного маркера для доклінічних токсикологічних випробувань у яванських макак.

Якщо буде потреба відтворити зазначений приклад, слід розуміти, що фахівець у даній області техніки зможе в межах доцільних і прийнятних границях змінити описаний вище протокол підходящим чином для відтворення описаних результатів. Таким чином, не маєється на увазі, що проілюстрований протокол повинен дотримуватися точно визначеним чином.

Приклад 15

Деплеція плазмацитоїдних дендритних клітин у яванських макак, що одержали лікування за допомогою біспецифічного діатіла, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A)

В якості частини токсикологічного дослідження з пошуку діапазону доз яванським макакам вводили біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) у вигляді 4-денних інфузій у дозах, що становлять 0,1, 1, 10, 30 100, 300 або 1000 нг/кг. Контрольне DART вводили в дозі 100 нг/кг. Для ідентифікації рDC і популяцій моноцитів PBMC яванської макаки, клітини мітили за допомогою антитіла до CD14-FITC. Моноцити ідентифікували як CD14⁺ популяцію і рDC ідентифікували як CD14-CD123⁺ популяцію. Як показано на фігурі 20, панелях K і L, рDC зазнали деплеції не пізніше ніж через 4 дні після інфузії при дозі не вище 10 нг/кг DART-A. Не спостерігали деплецію рDC у мавп, що одержали лікування за допомогою контрольного біспецифічного діатіла (контрольного DART) або отримавшими лікування за допомогою інертного носія разом з наповнювачем мавп у часовій точці - 4 дні (фігура 20, панелі G, H, C і D, відповідно). Вміст цитокінів: інтерферону-гама, TNF-альфа, IL6, IL5, IL4 і IL2, визначали через 4 години після інфузії. Спостерігалось невелике підвищення або відсутність підвищення вмістів цитокінів у отримавших лікування за допомогою DART-A тварин у порівнянні з отримавшими лікування за допомогою контрольного DART або отримавшими лікування за допомогою інертного носія тваринами.

На фігурі 21 і фігурі 22 представлені результати аналізу FACS для В-клітин (CD20⁺) (фігура 21, панель A), моноцитів (CD14⁺) (фігура 21, панель B), НК-клітин (CD159⁺CD16⁺) (фігура 21, панель C), рDC (CD123^{HL}, CD14⁺) (фігура 21, панель D) і Т-клітин (загалом, CD4⁺ і CD8⁺) (фігура 22, панель A, фігура 22, панель B і фігура 22, панель D, відповідно).

Лікування мавп за допомогою контрольного DART не приводило до помітних ефектів на Т- або В-лімфоцити, НК-клітини, моноцити і рDC. Лікування мавп за допомогою DART-A у дозах, що становлять 10 нг/кг/день або вище, приводило до усунення рDC (фігура 21, панель D). Деплеція рDC була повною і тривалою, повертаючись до рівнів до лікування через декілька тижнів після завершення введення доз. Вміст циркулюючих у кровотоці Т-лімфоцитів знижувався при введенні DART-A, але повертався до рівнів до лікування до кінця кожного тижневого циклу, що вказує на зміни в міграції, а не на справжню деплецію. Як CD4, так і CD8 Т-лімфоцити характеризувалися однаковим патерном. Маркер активації Т-лімфоцитів, CD69 (фігура 22, панель C), був лише в невеликому ступені позитивним серед циркулюючих клітин і не змінювався слідом за введенням дози DART-A. Вміст В-лімфоцитів, моноцитів і НК-клітин коливалися протягом курсу введення доз DART-A з істотною мінливістю, спостережуваною серед мавп. Тенденція убик підвищених вмістів циркулюючих В-лімфоцитів і моноцитів спостерігали в обох мавп при найвищих дозах.

Отже, вищенаведені результати демонструють терапевтичну ефективність, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічного діатіла (DART-A). Біспецифічне діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A) можна використовувати в якості терапевтичного засобу для лікування численних захворювань і станів, включаючи в себе наступне: ГМЛ, АBL (ОЛЛ), ХЛЛ, МДС, рDCI, мантийноклітинна лімфома, волохатоклітинний лейкоз, ХЛЛ із трансформацією Ріхтера, бластний криз при ХМЛ, BLL (підклас є CD123+) (див. приклад 2); системна червона вовчанка (СЧВ), алергія (базофіли є CD123+), бронхіальна астма і т. д.

Приклад 16

Порівняльні властивості біспецифічного діатіла, що характеризується оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-A), і біспецифічного діатіла, що характеризується неоптимізованою послідовністю CD123 x CD3 (DART-B)

Несподівана перевага і властивості, що характеризуються оптимізованою послідовністю CD123 x CD3 біспецифічних діатілів

Як обговорювалося вище, DART-A і DART-B конструювали аналогічним чином, і перший поліпептид обох конструктів містять, у напрямку від N-кінця до С-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}), лінкер 2, Е-спіральний домен і С-кінець. Аналогічно, другий поліпептид обох конструктів містять, у напрямку від N-кінця до С-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}), лінкер 2, К-спіральний домен і С-кінець.

Як показано в прикладі 1, було виявлено, що обоє CD123 x CD3 біспецифічних діатіла здатні одночасно зв'язуватися з CD3 і CD123. Крім того, як розкрито в прикладі 3 і на фігурі 4, панелях C і D, два CD123 x CD3 біспецифічні діатіла виявили виражену здатність до перенаправленого цитолізу з концентраціями, які повинні досягати 50 % від максимальної активності (EC50) у діапазоні суб-нг/мл, незалежно від специфічності зв'язування з епітопом CD3 (DART-A у порівнянні з DART-B) у клітинних лініях - мішенях з високою експресією CD123. Таким чином, невеликі варіації в конкретних послідовностях CD123 x CD3 біспецифічних діатілів не повністю анулюють біологічну активність.

Проте, у всіх досліджених клітинних лініях було виявлено, що DART-A був більш активним і більш ефективним у переспрямованому цитолізі, ніж DART-B (див., наприклад, фігуру 4, панелі A, C і D). Таким чином, DART-A виявило несподівану перевагу в порівнянні з подібним DART-B.

Приклад 17

Фармакологія DART-A у нелюдиноподібного примата для лікування гематологічних злоякісних пухлин

Альфа-ланцюг рецептора інтерлейкіну 3 (IL-3), CD123, надлишково експресується на злоякісних клітинах у широкому діапазоні гематологічних злоякісних пухлин (Munoz, L. et al. (2001) "Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies, " *Haematologica* 86:1261-1269; Testa, U. et al. (2014) "CD123 Is A Membrane Biomarker And A Therapeutic Target In Hematologic Malignancies, " *Biomark. Res.* 2:4) і пов'язаний з несприятливим прогнозом (Vergez, F. et al. (2011) "High Levels Of CD34+CD38low/-CD123+Blasts Are Predictive Of An Adverse Outcome In Acute Myeloid Leukemia: A Groupe Ouest-Est Des Leucemies Aigues Et Maladies Du Sang (GOELAMS) Study, " *Haematologica* 96:1792-1798). Більше того, повідомлялося, що CD123 експресується лейкозними стовбуровими клітинами (LSC) (Jordan, C.T. et al. (2000) "The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells, " *Leukemia* 14:1777-1784; Jin, L. et al. (2009) "Monoclonal Antibody-Mediated Targeting Of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells, " *Cell Stem Cell* 5:31-42), що є перспективною ознакою, що дозволяє націлено впливати на основну причину таких захворювань. Відповідно до цього висновку, CD123 також бере участь в аутокринній петлі IL-3, що підтримує виникнення і розвиток лейкозу, як показано за допомогою здатності блокувального CD123 моноклонального антитіла знижувати приживлення лейкозних стовбурових клітин і поліпшувати виживаність у мишачій моделі гострого мієлоїдного лейкозу (ГМЛ) (Jin, L. et al. (2009) "Monoclonal Antibody-Mediated Targeting Of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells, " *Cell Stem Cell* 5:31-42). Проте, у дослідженні 1 фази у пацієнтів з високим ризиком ГМЛ моноклональне антитіло не виявило протилежозну активність (Roberts, A. W. et al. (2010) "A Phase I Study Of Anti-cd123 Monoclonal Antibody (mab) CSL360 Targeting Leukemia Stem Cells (LSC) In AML, " *J. Clin. Oncol.* 28(Suppl):e13012). Таким чином, необхідні альтернативні підходи відносно націленого впливу на CD123, включаючи в себе стратегії деплеції. Хоча CD123 експресується підкласом нормальних гемопоетичних клітин-попередників (HPC), гемопоетичні стовбурові клітини (HSC) експресують CD123 у невеликій кількості або не експресують взагалі (Jordan, C.T. et al. (2000) "The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells, " *Leukemia* 14:1777-1784; Jin, W. et al. (2009) "Regulation Of Th17 Cell Differentiation And EAE Induction By MAP3K NIK, " *Blood* 113:6603-6610), вказуючи на те, що стратегії на підставі деплеції клітин з CD123 забезпечують відновлення за допомогою нормального гемопоєза.

Націлювання власних Т-лімфоцитів пацієнта на лейкозні клітини - мішені являє собою перспективну імунотерапевтичну стратегію для лікування гематологічних злоякісних пухлин. Спробу застосувати терапевтичний потенціал зазначеного підходу здійснили з використанням блінатумомабу (BiTe на основі біспецифічного антитіла, що характеризується здатністю зв'язуватися з CD3 і В-клітинним антигеном CD19) у пацієнтів з В-клітинними лімфомами і пре-В-клітинним гострим лімфобласним лейкозом ((Klinger, M. et al. (2012) "Immunopharmacologic Response Of Patients With B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia To Continuous Infusion Of T Cell-Engaging CD19/CD3-Bispecific BiTE Antibody Blinatumomab, " *Blood* 119:6226-6233; Topp, M.S. et al. (2012) "Long-Term Follow-Up Of Hematologic Relapse-Free Survival In A Phase 2 Study Of Blinatumomab In Patients With MRD In B-Lineage ALL, " *Blood* 120:5185-5187; Topp, M.S. et al. (2011) "Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate And Prolonged Leukemia-Free Survival, " *J. Clin. Oncol.* 29:2493-2498).

Молекули CD123 x CD3 біспецифічного діатіла згідно із даним винаходом, такі як DART-A, містять альтернативну біспецифічну, засновану на антитілі модальність, яка забезпечує

поліпшену стабільність і більш надійні властивості для виконання на виробництві (Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion, " J. Mol. Biol. 399:436-449; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma, " Blood 117:4542-4551).

Щоб продемонструвати перевагу і ефективність молекул CD123 x CD3 біспецифічного діатіла згідно із даним винаходом, підтверджували біологічну активність описаних вище DART-A в *in vitro* і доклінічних моделях лейкозу, а також його фармакокінетику, фармакодинаміку і безпечну фармакологію на яванських макаках (*Macaca fascicularis*) оцінювали по відношенню або до описаного вище контрольного DART (біспецифічного у відношенні CD3 і флуоресцеїну), або "контрольного DART-2", яке є біспецифічним у відношенні CD123 і флуоресцеїну).

Амінокислотна послідовність першого поліпептидного ланцюга "контрольного DART-2" (CD123VL - лінкер - 4-4420VH - лінкер - E-спіраль; лінкери підкреслені) (SEQ ID NO:58):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVKLDETGG GLVQPGRPMK LSCVASGFTF
SDYWMNWVRQ SPEKGLEWVA QIRNKPYNIE TYSDSVKGR FTISRDDSKS
SVYLQMNNLR VEDMGIYYCT GSYYGMDYWG QGTSVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVALEKE VAALEKEVAA LEK

Амінокислотна послідовність другого поліпептидного ланцюга "контрольного DART-2" (4420VL – лінкер - CD123VH - лінкер - K-спіраль) (SEQ ID NO:59):

DVVMQTQPFPS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGKLE IKGGSQSGGG EVQLVQSGAE LKKGASVKV SCKASGYTFT
DYIMKWVRQA PGQGLEWIGD IIPSNQATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARSH LLRASWFAYW GQGTSLTVSS GCGGGKVAAL
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Біфункціональний аналіз ELISA

Планшет MaxiSorp ELISA (Nunc), на який протягом ночі наносили розчинний IL3 R-альфа людини або яванської макаки (0,5 мкг/мл) у бікарбонатному буфері, блокували за допомогою 0,5 % BSA; 0,1 % Tween-20 в PBS (PBST/BSA) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Наносили молекули DART-A, після чого слідувало послідовне додавання кон'югату CD3 ε-біотин людей і стрептавідин-HRP (Jackson ImmunoResearch). Активність HRP виявляли по перетворенню тетраметилбензидину (BioFX) в якості субстрату протягом 5 хв.; реакцію переривали за допомогою 40 мкл/лунка 1 % H₂SO₄ і поглинання зчитували при 450 нм.

Аналіз поверхневого плазмонного резонансу

Здатність DART-A зв'язуватися з білками CD3 або CD123 людини і яванської макаки аналізували з використанням біосенсора BIAcore 3000 (GE, Healthcare), як описано в Johnson, S. et al. (2010) ("Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion, " J. Mol. Biol. 399:436-449) і Moore, P.A. et al. (2011) ("Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma, " Blood 117:4542-4551). Коротко, карбоксильні групи на сенсорному чипі CM5 активували за допомогою ін'єкції 0,2M N-етил-N-(3-диетиламіно-пропіл) карбодііміду і 0,05M N-гідрокси-сукциніміду. Розчинний CD3 або CD123 (1 мкг/мл) вприскували на поверхню активованого CM5 в 10 мМ ацетату натрію, pH 5,0, при об'ємній швидкості потоку, що становить 5 мкл/хв., після чого додавали 1 М етаноламіну для деактивації. Експерименти по зв'язуванню проводили в 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA і 0,005 % поверхнево-активної речовини P20. Регенерацію іммобілізованих рецепторних поверхонь проводили шляхом імпульсної ін'єкції 10 мМ гліцину, pH 1,5. Значення KD визначали по глобальній апроксимації кривих зв'язування до 1:1 моделі зв'язування Ленгмюра (програмне забезпечення BIAevaluation v4.1).

Аналіз цитолізу

Клітинні лінії, використовувані для аналізів лізису клітин, одержували з Американської колекції типових культур (ATCC) (Manassas, VA). PBMC виділяли із крові здорових донорів з використанням набору Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare); Т-клітини очищували за допомогою набору для негативної селекції (Life Technologies). Щільність CD123 на клітинній поверхні визначали з використанням Quantum Simply Cellular гранул (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Аналізи цитотоксичності проводили, як описано Moore, P.A. et al. (2011) ("Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma, " Blood 117:4542-4551). Коротко, клітинні лінії - мішені (10⁵ клітин/мл) обробляли серійними

розведеннями таких білків, як DART-A або контрольне DART, у присутності Т-клітин у зазначених співвідношеннях ефекторних клітин до клітин - мішеней і інкубували при 37 °C протягом ночі. Лізис клітин визначали за вивільненням лактатдегідрогенази (LDH, Promega) у супернатанті культури. Для аналізу цитолізу за допомогою проточної цитометрії клітини - мішені мітили за допомогою CMTMR (Life Technologies) і цитоліз піддавали моніторингу з використанням проточного цитометра FACSCalibur. Дані аналізували з використанням програмного забезпечення PRISM® 5 (GraphPad) і представляли у вигляді цитотоксичності в %.

Фармакологія у відношенні яванської макаки

Експерименти на нелюдиноподібному приматові проводили в Charles River Laboratories (Reno, NV), згідно вимогам місцевого інституціонального комітету з утримання і використання тварин (IACUC). Спеціально виведеним, раніше не підданим експериментам яванським макакам (*Macaca fascicularis*) китайського походження (віковий діапазон 2,5-9 років, діапазон за масою 2,7-5 кг) вводили інертний носій або DART-A за допомогою внутрішньовенної інфузії через порт-систему в стегновій і яремній вені з використанням програмувальних інфузійних насосів з живленням від акумуляторної батареї (CADD-legacy®, SIMS Deltac, Inc., St. Paul, MN). Зразки периферичної крові або кісткового мозку збирали в пробірки які містили антикоагулянт в зазначені часові точки. Аналізи фенотипу клітинної поверхні проводили за допомогою аналізатора LSR Fortessa (BD BioSciences), обладнаного лазерами з довжинами хвиль, що становлять 488 нм, 640 нм і 405 нм, і за допомогою наступних антитіл: CD4-V450, CD8-V450, CD123-PE-Cy7, CD45-PerCP, CD4-APC-H7, CD8-FITC, CD25-PE-Cy7, CD69-PerCP, PD-1-PE, TIM3-APC, CD3-Pacific Blue, CD95-APC, CD28-BV421, CD16-FITC, CD3-Alexa488, CD38-PE, CD123-PE-Cy7, CD117-PerCP-Cy5,5, CD34-APC, CD90-BV421, CD45RA-APC-H7 і CD33-APC (BD BioSciences). Абсолютну кількість клітин визначали з використанням TruCOUNT (BD BioSciences). Вміст цитокінів IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α і IFN-γ у сироватці вимірювали з використанням набору цитометричних гранул з моноклональними антитілами до цитокіну Th1/Th2 нелюдиноподібного примата (BD Bioscience). Концентрацію DART-A у зразках сироватки мавпи вимірювали з використанням сендвіч-імуноаналізу з електролюмінесцентним виявленням (MesoScale Diagnostics, MSD, Rockville, MD). Коротко, на аналітичний планшет (MSD) наносили рекомбінантний IL-3 Ра людини (R&D System) і планшет блокували за допомогою 5 % BSA. Наносили калібровані стандарти або розведені досліджувані зразки, після чого додавали біотинильоване моноклональне антитіло, що проявляє специфічне зв'язування у відношенні описаних вище Е-спіральних (SEQ ID NO:34) і К-спіральних (SEQ ID NO:35) доменів молекули. Додавали мічений SULFO-TAG™ кон'югат стрептавідину (MSD) і утворення комплексів аналізували в пристрої формування зображень MSD SECTOR®. Концентрації DART-A визначали зі стандартних кривих, створених шляхом апроксимації даних інтенсивності світлового випромінювання в п'ятипараметричній логістичній моделі.

Визначення фізико-хімічних характеристик очищеного DART-A продемонструвало гомогенний гетеродимер з молекулярною масою, що становить 58,9 кДа (фігура 23; фігури 24A-24B), який є стабільним при 2-8 °C протягом аж до 12 місяців в PBS. Аналіз SPR продемонстрував майже ідентичні афінності зв'язування DART-A з відповідними розчинними антигенами CD3 і CD123 людини і яванської макаки (фігури 25A-25D і таблиця 7). Крім того, DART-A одночасно зв'язувався з обома антигенами у форматі ELISA, у якому використовували CD123 людини або мавпи для захоплення і CD3 людини для виявлення (фігури 26A-26B), і продемонструвало подібне зв'язування з Т-лімфоцитами людини і мавпи (фігури 26C-26E). Дані в таблиці 7 являють собою середні значення від 3 незалежних експериментів, кожний з яких проведений у двох паралелях.

Таблиця 7

Рівноважні константи дисоціації (K_D) для зв'язування DART-A з CD3 і CD123 людини і яванської макаки

Антигени	$k_a (\pm SD)$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$k_d (\pm SD)$ (s^{-1})	$K_D (\pm SD)$ (нМ)
CD3ε/δ людини	$5,7 (\pm 0,6) \times 10^5$	$5,0 (\pm 0,9) \times 10^{-3}$	$9,0 \pm 2,3$
CD3ε/δ яванської макаки	$5,5 (\pm 0,5) \times 10^5$	$5,0 (\pm 0,9) \times 10^{-3}$	$9,2 \pm 2,3$
CD123-His людини	$1,6 (\pm 0,4) \times 10^6$	$1,9 (\pm 0,4) \times 10^{-4}$	$0,13 \pm 0,01$
CD123-His яванської макаки	$1,5 (\pm 0,3) \times 10^6$	$4,0 (\pm 0,7) \times 10^{-4}$	$0,27 \pm 0,02$

DART-A опосередковує переспрямований цитоліз Т-лімфоцитами людини або яванської макаки

DART-A опосередковував переспрямований цитоліз клітин-мішеней ефекторними клітинами людини або мавпи проти CD123+ лейкозних клітинних ліній Kasumi-3 (фігура 27A-27D), який супроводжувався індукцією маркерів активації. Не спостерігали будь-якої активності проти CD 123-негативних мішеней (U937 клітини) або із застосуванням контрольного DART, що вказувало на те, що Т-клітинна активація строго залежить від залучення клітин-мішеней і що моновалентне залучення CD3 за допомогою DART-A було недостатнім для запуску Т-клітинної активації. Оскільки CD123 експресується на підкласі нормальних циркулюючих лейкоцитах, включаючи в себе pDC і моноцити (фігура 27E), ефект DART-A додатково досліджували в нормальних PBMC людини і мавпи.

Ефект східчастої зміни спостерігали серед PBMC людини із залежною від дози швидкої деплеції CD14-CD123^{high} клітин (pDC і базофілів), спостережуваної не пізніше ніж через 3 години після початку лікування, при цьому моноцити (CD14+ клітини) не зазнали впливу в цій часовій точці (фігури 27F-27G). Деплеція CD14-CD123^{high} клітин збільшувалася із часом при всіх концентраціях молекули DART-A, тоді як кількість моноцитів дещо знижувалася до 6 год. і зазнала деплеції через 18 годин і в концентраціях, вище ніж 1 нг/мл. Інкубація PBMC мавпи з DART-A приводила до порівнянної залежності від дози деплеції CD14-CD123^{high} клітин (фігура 27H), додатково підтверджуючи релевантність цього виду для фармакології DART-A (CD14+ клітини мавпи експресують CD123 у невеликому ступені або не експресують взагалі, і вони не зазнають деплеції).

Фармакокінетика DART-A у яванських макак

Яванську макаку вибирали в якості прийнятної фармакологічної моделі для аналізу DART-A на підставі еквівалентного розподілу обох цільових антигенів у цьому виді в порівнянні з людьми на підставі імуногістохімії з попередниками mAb, відповідно до опублікованої інформації (Munoz, L. et al. (2001) "Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies, " Haematologica 86:1261-1269; Korpelainen, E.I. et al. (1996) "IL-3 Receptor Expression, Regulation And Function In Cells Of The Vasculature, " Immunol. Cell Biol. 74:1-7).

Дослідження, проведене згідно із даним винаходом, містило в собі 6 груп лікування, що складаються із 8 яванських макак на групу (4 самця, 4 самки) (таблиця 8). Усі групи одержували інертний носій - контроль для першої інфузії; потім інертний носій або DART-A вводили внутрішньовенно протягом 4 щотижневих циклів. Тваринні групи 1 одержували інертний носій - контроль протягом усіх 4 наступних інфузій, тоді як групи 2-5 одержували дози DART-A, які щотижня збільшуються, протягом 4 днів на тиждень протягом усіх наступних інфузій. Тваринні групи 6 одержували лікування за допомогою 7-денних безперервних доз DART-A, які щотижня збільшуються, для всіх інфузій. Схеми 4 дня введення/3 дня без введення і 7 днів введення розробляли для того, щоб розрізнити тривалі і часові ефекти, пов'язані із введенням DART-A. Двоє самців і 2 самок на кожну групу вбивали наприкінці фази лікування (36 день), тоді як мавп, які залишилися, вбивали після 4-тижневого відновлення (65 день). Підгрупа мавп, у яких виробилися антитіла до лікарського засобу (ADA), спрямовані проти гуманізованої Fv як CD3, так і CD123, і дані після виникнення ADA виключали з аналізу РК. Усіх мавп піддавали впливу DART-A протягом періоду дослідження.

Таблиця 8

№ інфузії	Дні дослідження	Інертний носій	Інфузія DART-A				
			(4 дні введення/3 дні без введення) нг/кг/день [нг/кг/4 днів]				(7 днів введення) нг/кг/день [нг/кг/7 днів]
		Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5	Група 6
1	1	Інертний носій	Інертний носій	Інертний носій	Інертний носій	Інертний носій	Інертний носій
2	8	Інертний носій	100 [400]	100 [400]	100 [400]	100 [400]	100 [700]
3	15	Інертний носій	100 [400]	300 [1200]	300 [1200]	300 [1200]	300 [2100]
4	22	Інертний носій	100 [400]	300 [1200]	600 [2400]	600 [2400]	600 [4200]
5	29	Інертний носій	100 [400]	300 [1200]	600 [2400]	1000 [4000]	1000 [7000]
Відновлення	36-65						

Двохкомпартментну модель використовували для оцінки параметрів PK (таблиця 9 і фігура 28). $T_{1/2\alpha}$ був коротким (4-5 хв.), відбиваючи швидке зв'язування із циркулюючими мішенями; $T_{1/2\beta}$ також був швидким, як очікувалося для молекули такого розміру, яка зазнає виведення через нирки. Аналіз зразків сироватки, зібрані наприкінці кожної інфузії від мавп групи 6, показали залежне від дози збільшення C_{max} DART-A. У таблиці 9 інертний носій являв собою PBS, pH 6,0, що містить 0,1 мг/мл рекомбінантного альбуміну людини, 0,1 мг/мл PS-80 і 0,24 % бензиловий спирт використовували для всіх інфузій інертного носія протягом перших 4 днів кожного тижня інфузії з наступним введенням цієї ж сполуки без бензинового спирту протягом, залишившись 3 днів кожної щотижневої інфузії. DART-A вводили в ті ж часові точки, що і безперервну внутрішньовенну інфузію розчину PBS, pH 6,0, що містить 0,1 мг/мл рекомбінантного альбуміну людини, 0,1 мг/мл PS-80, і 0,24 % бензинового спирту в необхідній концентрації.

Таблиця 9

Двохкомпартментний аналіз параметрів PK DART-A у яванських макак

Показник	300 нг/кг/день (середнє \pm SD)	600 нг/кг/день (середнє \pm SD)
C_{max} (нг/мл)	77,4 \pm 9,4	113,8 \pm 33,5
AUC (ч*нг/мл)	7465 \pm 913	11188 \pm 3282
V_{ss} (л/кг)	1,078 \pm 0,511	2,098 \pm 1,846
$t_{1/2}$, альфа (год.)	0,07 \pm 0,018	0,067 \pm 0,023
$t_{1/2}$, бета (год.)	13,79 \pm 4,928	21,828 \pm 18,779
MRT (год.)	6,73 \pm 3,327	9,604 \pm 8,891

Вивільнення цитокіну у отримавших лікування за допомогою Dart-A-яванських макак
 Беручи до уваги властивості DART-A у відношенні Т-клітинної активації, передбачалося збільшення циркулюючих цитокінів, що супроводжує інфузію і, отже, використовували низьку початкову дозу в якості стратегії "десенсибілізації" на підставі попередніх даних, отриманих з подібними сполуками (див., наприклад, Toppr, M.S. et al. (2011) "Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate And Prolonged Leukemia-Free Survival, " J. Clin. Oncol. 29:2493-2498; Bargou, R. et al. (2008) "Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses Of A T Cell-Engaging Antibody, " Science 321:974-977). 3

досліджених цитокінів IL-6 продемонстрував самі істотні зміни при інфузії, нехай навіть і тимчасові по природі, мінімальної величини і з більшими величинами мінливості між тваринами та між групами (фігури 29A-29C). Невеликі, тимчасові зміни в IL-6 також спостерігали після інфузій інертного носія (усі інфузії в групі 1 і всі інфузії в 1 день), що вказує на чутливість зазначеного цитокіну до стресу на маніпуляції. Проте, залежні від DART-A збільшення (<80 пг/мл) IL-6 у сироватці спостерігали у деяких мавп після першої інфузії DART-A (100 нг/кг/день), які поверталися до вихідного значення до 72 год. Цікаво, що величина вивільнення IL-6 знижувалася з кожною наступною інфузією DART-A, навіть якщо рівень дози збільшувався аж до 1000 нг/кг/день. Також спостерігали мінімальні і тимчасові пов'язані з DART-A збільшення TNF- α у сироватці (<10 пг/мл); як і у випадку з IL-6, найвищу величину вивільнення TNF- α спостерігали після першої інфузії. Не спостерігали будь-яких пов'язаних з DART-A змін у рівнях IL-5, IL-4, IL-2 або IFN- γ під час усього дослідження з порівняння з контролями. Можна зробити висновок про те, що вивільнення цитокінів у відповідь на лікування мавп за допомогою DART-A було мінімальним, тимчасовим і являло собою ефект на першу дозу, контрольований за допомогою підвищення дози в межах одного суб'єкта.

Опосередкована DART-A деплеція циркулюючих CD14⁺/CD123⁺ лейкоцитів *in vivo*

Абсолютні вмісти циркулюючих CD14-/CD123+ клітин вимірювали під час дослідження в якості фармакодинамічного кінцевого результату. Поряд з тим, що кількість CD123⁺ клітин у контрольній групі 1 залишалася стабільним із часом, лікування за допомогою DART-A було пов'язане з великою деплецією циркулюючих CD14-/CD123+ клітин (94-100 % від початкового значення перед дослідженням), спостережуваної, починаючи з першої виміряної часової точки (72 години) після початку першої інфузії DART-A (100 нг/кг/день) у всіх тварин у всіх групах активного лікування (фігури 30A-30C). Деплеція була тривалою, оскільки вона тривала протягом 3-денної щотижневої перерви у введенні дози в групі 2-5, повертаючись до вихідних рівнів тільки під час пролонгованого періоду відновлення. Для усунення можливості маскування DART-A або модулювання CD123 (малоймовірний сценарій, що дає низькі рівні циркулюючого DART-A), кількість рDC підраховували за допомогою ортогонального маркера, CD303. Відповідно до даних відносно CD123, CD303+рDC аналогічно піддавали деплеції у мавп, які одержали лікування за допомогою DART-A (фігури 30D-30F).

Вміст циркулюючих Т-лімфоцитів, активація і аналіз підкласів

На відміну від стійкої деплеції циркулюючих CD123+ клітин, DART-A, що вводиться за схемою 4 дня введення/3 дня без введення (групи 2-5), було пов'язане із щотижневими коливаннями в вмістах циркулюючих Т-клітин, при цьому введення у вигляді безперервних 7-денних інфузій приводило до аналогічного зниження вмістів циркулюючих Т-клітин після першого введення, яке повільно відновлювалося без коливання навіть протягом періоду введення доз (фігури 31A-31C). Відмінність між двома стратегіями введення доз вказує на те, що ефект DART-A на Т-лімфоцити узгодиться з міграцією і/або скупченням клітин по краю ділянки запалення, а не з деплецією. Після припинення введення доз, вміст Т-клітин несподівано піднімався до рівнів, приблизно в 2 рази вище, ніж вихідні значення протягом тривалості періоду відновлення. Інфузія DART-A була пов'язана із залежною від впливу прогресуючою підвищеною частотою зустрічальності Т-клітин, експресуючих маркер пізньої активації, PD-1, особливо на CD4+ клітинах, при цьому група дозування 6 проявляла найвищі загальні вмісти (фігури 31D-31I і фігури 32A-32F і фігури 33A-33F). Tim-3, маркер, пов'язаний з виснаженням Т-клітин, не був виявлений на CD4+Т-клітинах і тільки з низькою частотою серед CD8+ клітин (5,5-9,7 %) і містився 20,5-35,5 % CD8+/PD-1+ подвійних-позитивних клітин. Не спостерігалася будь-яка узгоджувана зміна в маркері ранньої Т-клітинної активації, CD69, і тільки невеликі зміни в експресії CD25 серед циркулюючих клітин.

Щоб виключити виснаження після *in vivo* впливу, *ex vivo* цитотоксичний потенціал ефекторних клітин, виділених від яванських макак, які одержують численні інфузії DART-A, порівнювали із цим параметром у раніше не підданих експериментам мавп. Як показано на фігурі 34, PBMC, виділені від мавп, які одержали лікування за допомогою DART-A, продемонстрували цитотоксичність, порівнянну з такою у клітин, виділених від раніше не підданих експериментам мавп, вказуючи на те, що *in vivo* вплив DART-A не виявляв негативного впливу на здатність Т-клітин знищувати клітини - мішені.

Вплив DART-A збільшував відносну частоту зустрічальності центральних CD4 клітин пам'яті і ефекторних CD8+ клітин пам'яті за рахунок відповідної раніше не підданої впливам Т-клітинної популяції (фігури 35A-35F і фігури 32A-32F і фігури 33A-33F), вказуючи на те, що вплив DART-A стимулював експансію і/або мобілізацію зазначених клітин.

Ефекти на гемопоєз і попередники кісткового мозку

DART-A добре переносився мавпами у всіх досліджуваних дозах; проте, оборотні зниження параметрів еритроцитів спостерігали при найвищих дозах (фігури 36A-36C). Швидкий забір крові міг вносити в це свій потенційний внесок, оскільки тварини, що одержали лікування за допомогою інертного носія продемонстрували слабе зниження кількості еритроцитів. Ретикулоцитартну відповідь спостерігали у всіх тварин; при найвищому рівні впливу (група 6), проте, відповідь виявилася дещо менш вираженою для подібного зниження кількості еритроцитів (фігури 36D-36F). Морфологічний аналіз мазків кісткового мозку протягом дослідження був без особливостей. Проточна цитометрія, проте, виявила, що частота зустрічальності CD123+ клітин у межах негативних у відношенні незрілих клітинних ліній (Lin-) популяції кісткового мозку знижувалася у отримавших лікування за допомогою DART-A тварин наприкінці періоду введення доз, повертаючись до вихідних значень у кінці відбудовного періоду (фігури 37A-37B). HSC (визначені як Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90+ клетки (Pang, W.W. et al. (2011) "Human Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells Are Increased In Frequency And Myeloid-Biased With Age, " Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 108:20012-20017)) показали більшу мінливість між групами; мавпи, що одержали лікування за допомогою DART-A, групи 4-6 показали деяке видиме зниження в порівнянні з відповідними рівнями перед введенням доз, проте, ніякого зниження не спостерігалось у всіх групах, що одержали лікування, у порівнянні з отримавшими лікування за допомогою інертного носія тваринами. Ці дані вказують на те, що HSC були менш чутливими до націленого впливу за допомогою DART-A і узгодяться зі спостережуваною оборотністю негативних ефектів лікування DART-A на гемопоез.

Як продемонстровано вище, у відношенні інфузій протягом 4 тижнів за щотижневою схемою 4 дня введення/3 дня без введення або за схемою 7 днів введення щотижня з початкових доз, що становлять 100 нг/кг/день, які збільшуються поетапно щотижня до 300, 600 і 1000 нг/кг/день, введення DART-A яванським макакам переносилося добре. Деплецію циркулюючих CD123+ клітин, включаючи в себе rDC, спостерігали після початку першого введення і вона тривала протягом усього дослідження при всіх дозах і схемах. Також спостерігалось оборотне зниження попередника CD123+ кісткового мозку. Вивільнення цитокином, як істотна загроза безпеки при націлених на CD3 видах терапії, виявилася коректуємою і узгодиться з ефектом введення першої дози. Незначну оборотну анемію відзначали при найвищих дозах, але не відзначали ніяких інших (пов'язаних з метою впливу або не пов'язаних з метою впливу) несприятливих ефектів.

Яванська макака являє собою прийнятну тваринну модель для фармакологічної оцінки DART-A, беручи до уваги високий ступінь гомології між ортологами і здатність DART-A зв'язуватися з подібною афінністю з антигенами і опосередковувати переспрямований Т-клітинний цитоліз в обох видів. Крім того, обоє антигенів узгоджено експресуються в мавп і людей, включаючи в себе подібну експресію гемопоетичними попередниками і у цитоплазмі ендотеліа численних тканин. Невеликі виключення являють собою експресію в клітинах Лейдига в людей, а не мавп і низький вміст або відсутність CD123 у моноцитах мавп у порівнянні з людьми.

Першочергове завдання, пов'язане з терапевтичними стратегіями, у які залучена Т-клітинна активація, містить у собі вивільнення цитокинів і не пов'язані з метою впливу на цитотоксичні ефекти. Нещодавнє дослідження з CD3 x CD123 біспецифічних імунним конструктором злиття scFv з бівалентним розпізнаванням CD3 продемонструвало протилежкозну активність *in vitro*, але викликало неспецифічну активацію Т-клітин і секрецію IFN- γ (Kuo, S.R. et al. (2012) "Engineering A CD123xCD3 Bispecific scFv Immunofusion For The Treatment Of Leukemia And Elimination Of Leukemia Stem Cells, " Protein Eng. Des. Sel. 25:561-569). Моновалентна природа кожного із плечей зв'язування і у високому ступені гомогенна форма DART-A забезпечує те, що Т-клітинна активація залежить винятково від залучення клітин - мішеней: Т-клітинна активація не спостерігалася при відсутності клітин - мішеней або при використанні молекули контрольного DART, яка містила в собі тільки плече націленого впливу на CD3. Крім того, високі дози (аж до 100 мкг/кг/день) молекули контрольного DART не запускали вивільнення цитокинів у яванських макак.

Початкова доза молекули DART-A, що складає 100 нг/кг/день, добре переносилася, при цьому спостерігалось мінімальне вивільнення цитокинів. Проте, цитокинова буря дійсно починалася при високій початковій дозі (5 мкг/кг/день); проте, така доза могла бути досягнута безпечним чином за допомогою поетапних щотижневих підвищень дози, вказуючи на те, що опосередковане DART-A вивільнення цитокинів, імовірно, є, головним чином, ефектом першої дози. Деплеція CD123+ клітин - мішеней, тим самим усуваючи джерело лігування з CD3, може пояснювати ефект першої дози: майже повну деплецію CD123+ клітин спостерігали в дозах, що не перевищують 3-10 нг/кг/день, вказуючи на те, що у вивільненні цитокинів *in vivo*

прослідковується зміщений дозозалежний ефект у порівнянні із цитотоксичністю. Профілі залежності від дози для цитотоксичності і вивільнення цитокінів Т-клітинами людини також узгодяться із представленим спостереженням.

Т-клітинна десенсибілізація, у якій може відігравати роль опосередкована DART-A позитивна регуляція PD1, як виявляється, також вносить свій внесок в обмеження вивільнення цитокінів після першої інфузії DART-A. Нещодавні дослідження показують, що підвищена експресія PD-1 після індукованої антигеном затримки Т-клітин у ділянках запалення вносить свій внесок, за допомогою взаємодій з PD-L1, у термінацію стоп-сигналу, таким чином, вивільняючи і десенсибілізуючи клітини (Honda, T. et al. (2014) "Tuning Of Antigen Sensitivity By T Cell Receptor-Dependent Negative Feedback Controls T Cell Effector Function In Inflamed Tissues, " *Immunity* 40:235-247; Wei, F. et al. (2013) "Strength Of PD-1 Signaling Differentially Affects T-Cell Effector Functions, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 110:E2480-E2489). Протидія PD-1 потужності сигналу TCR не є інформативною: поряд з тим, що проліферація і продукція цитокінів виявляються найбільш чутливими до інгібуванню PD-1, вплив на цитотоксичність є мінімальним (Wei, F. et al. (2013) "Strength Of PD-1 Signaling Differentially Affects T-Cell Effector Functions, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 110:E2480-E2489). Закономірно, ex vivo цитотоксичний потенціал Т-клітин від мавп, на яких впливали багаторазовими інфузіями DART-A, був порівняний з таким в Т-клітин від раніше не підданих експериментам мавп, незважаючи на підвищені вмісти PD-1 у перших. Крім того, позитивна регуляція PD-1 не супроводжувалася експресією TIM3, відмітної ознаки виснаження Т-клітин, як показано для Т-клітин, які були піддані тривалій стимуляції антитілами CD3 або хронічних інфекцій (Gebel, H.M. et al. (1989) "T Cells From Patients Successfully Treated With OKT3 Do Not React With The T-Cell Receptor Antibody, " *Hum. Immunol.* 26:123-129; Wherry, E.J. (2011) "T Cell Exhaustion, " *Nat. Immunol.* 12:492-499).

Деплеція циркулюючих CD123+ клітин у отримавших лікування за допомогою DART-A мавп була швидкою і тривала протягом щотижневої перерви у введенні доз у схемі 4 дня введення/3 дня без введення, що узгодиться з усуненням клітин - мішеней. Навпаки, часові коливання в кількості циркулюючих Т-клітин, імовірно, були результатом міграції із/в тканині і лімфоїдні органи залежно від DART-A. Вплив DART-A стимулює експансію і/або мобілізацію підданих впливу антигену Т-лімфоцитів, клітин, які переважно перебувають у тканинах і швидше проявляють цитотоксичну ефекторну функцію (Mirenda, V. et al. (2007) "Physiologic And Aberrant Regulation Of Memory T-Cell Trafficking By The Costimulatory Molecule CD28, " *Blood* 109:2968-2977; Marelli-Berg, F.M. et al. (2010) "Memory T-Cell Trafficking: New Directions For Busy Commuters, " *Immunology* 130:158-165).

Деплеція CD123+ нормальних клітин може передбачати потенційні ризики. pDC і базофіли експресують високі вмісти CD123 у порівнянні зі зниженими вмістами в моноцитах і еозинофілах (Lopez, A.F. et al. (1989) "Reciprocal Inhibition Of Binding Between Interleukin 3 And Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor To Human Eosinophils, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:7022-7026; Munoz, L. et al. (2001) "Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies, " *Haematologica* 86:1261-1269; Masten, B.J. et al. (2006) "Characterization Of Myeloid And Plasmacytoid Dendritic Cells In Human Lung, " *J. Immunol.* 177:7784-7793; Korpelainen, E.I. et al. (1995) "Interferon-Gamma Upregulates Interleukin-3 (IL-3) Receptor Expression In Human Endothelial Cells And Synergizes With IL-3 In Stimulating Major Histocompatibility Complex Class II Expression And Cytokine Production, " *Blood* 86:176-182). Було показано, що pDC відіграє роль у контролі певних вірусів у моделях інфекцій на мишах або мавпах, хоча вони не виявлялися критично важливими для контролю імунної відповіді при грипі (Colonna, M. et al. (1997) "Specificity And Function Of Immunoglobulin Superfamily NK Cell Inhibitory And Stimulatory Receptors, " *Immunol. Rev.* 155:127-133; Smit, J.J. et al. (2006) "Plasmacytoid Dendritic Cells Inhibit Pulmonary Immunopathology And Promote Clearance Of Respiratory Syncytial Virus, " *J. Exp. Med.* 203:1153-1159). Моделі пухлин pDC можуть стимулювати ріст пухлин і метастазування, тоді як деплеція pDC призводила до інгібування пухлини (Sawant, A. et al. (2012) "Depletion Of Plasmacytoid Dendritic Cells Inhibits Tumor Growth And Prevents Bone Metastasis Of Breast Cancer Cells, " *J. Immunol.* 189:4258-4265). Тимчасовий, незначний, залежний від дози набряк обличчя спостерігався в деяких мавп, що одержали лікування за допомогою DART-A; проте, у цих мавп не спостерігали підвищених вмістів гистаміну або у випадку, коли базофіли людини лізували шляхом опосередкованого DART-A Т-клітинний лізис. Деплеція моноцитів може передбачати потенційні ризики інфекції; наслідок pDC, деплеція базофілів або еозинофілів у людей, таким чином, повинна зазнати моніторингу.

Комітовані гемопоетичні попередники, які експресують CD123, такі як загальний мієлоїдний попередник (CMP) (Jordan, C.T. et al. (2000) "The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells, " *Leukemia* 14:1777-1784; Rieger,

M.A. et al. (2012) "Hematopoiesis, " Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4:a008250), можуть бути піддані націленому впливу з боку DART-A, що є можливим поясненням незначної анемії, спостережуваної після введення DART-A у найвищій дозі. Імовірно, еритропоетична ретикулоцитарна відповідь діє при всіх рівнях дози DART-A; проте, відносно адекватних знижень параметрів еритроцитів, тварини, що зазнавали впливу найвищих доз DART-A (група 6, 7-денна інфузія), показали знижену ретикулоцитарну відповідь, вказуючи на можливу цитотоксичну активність на попередників (наприклад, CMP). Ефект був оборотним після припинення лікування за допомогою DART-A, що узгодиться з репопуляцією зі збережених HSC з низьким вмістом або відсутністю CD123.

Альтернативні підходи для деплеції CD123+ клітин містять у собі специфічне у відношенні CD123 моноклональне антитіло другого покоління з посиленою областю Fc (Jin, L. et al. (2009) "Monoclonal Antibody-Mediated Targeting Of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells, " Cell Stem Cell 5:31-42; Roberts, A. W. et al. (2010) "A Phase I Study Of Anti-cd123 Monoclonal Antibody (mab) CSL360 Targeting Leukemia Stem Cells (LSC) In AML, " J. Clin. Oncol. 28(Suppl):e13012), пов'язаний з IL-3 дифтерійний токсин (Frankel, A. et al. (2008) "Phase I Clinical Study Of Diphtheria Toxin-Interleukin 3 Fusion Protein In Patients With Acute Myeloid Leukemia And Myelodysplasia, " Leuk. Lymphoma 49:543-553), індуковані цитокінами (CIK) клітини-кілери, експресуючі специфічні до CD123 химерні антигенні рецептори (CAR) (Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-specific Chimeric Antigen Receptor, " Br. J. Haematol. 161:389-401) і CD123 CAR Т-клітини (Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells, " Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia, " Blood 122:3138-3148). CAR Т-клітини виявили виражений цитоліз лейкозних бластних клітин *in vitro* і протилейкозну активність у ксеногенній моделі дисемінованого ГМЛ (Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia, " Blood 122:3138-3148). У нещодавньому дослідженні повідомлялося про абляцію нормального гемопоєзу в NSG мишей з пересадженими CD34+ клітинами людини після переносу CD123 CAR Т-клітин (Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells, " Blood 123(15): 2343-2354), хоча інші автори не спостерігали подібних ефектів *in vitro* або *in vivo* (Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-specific Chimeric Antigen Receptor, " Br. J. Haematol. 161:389-401; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells *in vivo*, " Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62). В обговорюваних вище експериментах спостерігали деплецію CD123+ популяцій попередників кісткового мозку, але вона була оборотною під час періоду відновлення; крім того, деплеція цієї невеликої популяції не призводила до змін у насиченості клітинами кісткового мозку або в співвідношенні еритроїдних клітин до мієлоїдних (Е:М) при всіх досліджених рівнях доз DART-A. Ці відмінності підкреслюють потенційні переваги DART-A у порівнянні із клітинними видами терапії, оскільки це забезпечує титруєму систему, яка заснована на аутологічних Т-клітинах на відміну від "надефективних" *ex vivo* трансдукованих клітин, які важче контролювати. CD123 надлишково експресується в деяких гематологічних злоякісних пухлинах, включаючи в себе ГМЛ, волохатоклітинний лейкоз, новоутворення із бластних плазмацитоїдних дендритних клітин (УБПДК), пре-В-клітинний гострий лімфобластний лейкоз (В-ГЛЛ) і хронічний лімфоцитарний лейкоз, хворобу Ходжкіна з наявністю клітин Рид-Штернберга, а також при мієлодиспластичному синдромі і системному мастоцитозі (Kharfan-Dabaja, M.A. et al. (2013) "Diagnostic And Therapeutic Advances In Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: A Focus On Hematopoietic Cell Transplantation, " Biol. Blood Marrow Transplant. 19:1006-1012; Florian, S. et al. (2006) "Detection Of Molecular Targets On The Surface Of CD34+/CD38- Stem Cells In Various Myeloid Malignancies, " Leuk. Lymphoma 47:207-222; Munoz, L. et al. (2001) "Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies, " Haematologica 86:1261-1269; Fromm, J.R. (2011) "Flow Cytometric Analysis Of CD123 Is Useful For Immunophenotyping Classical Hodgkin Lymphoma, " Cytometry B Clin. Cytom. 80:91-99). Прогнозована фармакодинамічна активність і контрольований профіль безпеки, спостережуваний у нелюдиноподібних приматів додатково підтверджує клінічну застосовність і ефективність DART-A в якості імунотерапії для зазначених порушень.

На закінчення необхідно відзначити, що DART-A являє собою молекулу на основі антитіла, яка залучає суб'єдиницю CD3ε TCR для перенапрямку Т-лімфоцитів проти клітин, експресуючих CD123, антиген, що зазнає позитивної регуляції при деяких гематологічних злоякісних пухлинах. DART-A зв'язується обома антигенами як людини, так і яванської макаки з подібними афінностями і перенаправляє Т-клітини обох видів на знищення CD123+ клітин. Мавпи, яким вводили інфузії 4 або 7 днів на тиждень із дозами, які щотижня підвищуються, DART-A, продемонстрували деплецію циркулюючих CD123+ клітин через 72 год. після початку лікування, яка тривала протягом 4 тижнів лікування, незалежно від схем введення доз. Зниження циркулюючих Т-клітин також відбувалося, але відновлювалося до вихідного значення до наступної інфузії у мавп, що одержують лікування за схемою, яка передбачає 4 дня введення дози, що узгодиться з опосередкованою DART-A мобілізацією. Введення DART-A збільшувало циркулюючі PD1+, але не TIM-3+, Т-клітини; крім того, ex vivo аналіз Т-клітин від мавп, що одержали лікування виявив незмінений переспрямований лізис клітин - мішеней, вказуючи на відсутність виснаження. Токсичність була обмежена мінімальним часовим вивільненням цитокінів після першої інфузії DART-A, але не після наступних уведень, навіть якщо доза підвищувалася, і мінімальним зниженням кількості еритроцитів із супутнім зниженням CD123+ попередників кісткового мозку. Клінічне випробування DART-A при гематологічних злоякісних пухлинах є обґрунтованим.

Усі згадані в даному описі винаходу публікації і патенти включені в даний документ тією самою мірою, як якби було передбачено, що кожна окрема публікація або патентна заявка спеціально і індивідуально включена за допомогою посилання у всій своїй повноті. Поряд з тим, що даний винахід був описаний з використанням конкретних його варіантів здійснення, слід розуміти, що можливі додаткові модифікації, і передбачено, що дана заявка охоплює будь-які зміни, застосування або адаптації даного винаходу, притримуючись в цілому принципів даного винаходу і включаючи в себе такі відхилення від даного розкриття, які узгоджуються з відомою або загальноприйнятою практикою в даній області техніки, до якої належить даний винахід, і які можуть бути застосовані до основних ознак, викладених вище в даному документі.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> МАКРОДЖЕНІКС, ІНК.
Бонвіні, Езіо
Джонсон, Леслі
Хуан, Лін
Мур, Пол
Чічілі, Гурунадх
Алдерсон, Ральф
- <120> БІСПЕЦИФІЧНІ МОНОВАЛЕНТНІ ДІАТИЛА, ЯКІ ЗДАТНІ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З
CD123 І CD3, ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ
- <130> 1301.0109PCT
- <150> US 61/869,510
<151> 2013-08-23
- <150> US 61/907,749
<151> 2013-11-22
- <150> EP 13198784
<151> 2013-12-29
- <150> US 61/990,475
<151> 2014-05-08
- <160> 59
- <170> PatentIn версія 3.5
- <210> 1
<211> 272
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність
- <220>
<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-A
- <400> 1

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125
 Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr
 165 170 175
 Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp
 210 215 220
 Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 245 250 255
 Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

260 265 270

<210> 2
 <211> 816
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-A

<400> 2
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtagaa aaaaaaggc tccctggacc 180
 cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360
 cagctggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc 420
 aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga 480
 cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt ccttccaacg gggccacttt ctacaatcag 540
 aagtttaag gcagggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag 600
 ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg 660
 agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga 720
 tgtggcgggtg gagaagtggc cgcactggag aaagagggtg ctgctttgga gaaggaggtc 780
 gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg gaaaaa 816

<210> 3
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Другий Поліпептидний Ланцюг DART-A

<400> 3

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 130 135 140
 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
 145 150 155 160
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
 165 170 175
 Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
 180 185 190
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 195 200 205
 Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
 210 215 220

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
275 280

<210> 4

<211> 840

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Другий Поліпептидний Ланцюг DART-A

<400> 4

gacttcgtga tgacacagtc tcctgatagt ctggccgtga gtctggggga gcggtgact	60
atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa atcagaaaaa ctatctgacc	120
tggtaccagc agaagccagg ccagccccct aaactgctga tctattgggc ttccaccagg	180
gaatctggcg tgcccagacag attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca	240
atttctagtc tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat	300
ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc cggcggcgga	360
ggcgaggtgc agctgggtgga gtctggggga ggcttgggtcc agcctggagg gtccctgaga	420
ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agcacatacg ctatgaattg ggtccgccag	480
gctccagggg aggggctgga gtgggttgga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca	540
acctactatg ccgactctgt gaaggataga ttaccatct caagagatga ttcaaagaac	600
tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggccgtgta ttactgtgtg	660
agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tcttggtttg cttattgggg acaggggaca	720
ctggtgactg tgtcttccgg aggatgtggc ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa	780
gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag	840

<210> 5
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-B

<400> 5

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 130 135 140

Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 145 150 155 160

Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln

	165		170		175
Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr					
	180		185		190
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr					
	195		200		205
Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp					
	210		215		220
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly					
	225		230		240
Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val					
	245		250		255
Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys					
	260		265		

<210> 6
 <211> 804
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-B

<400> 6	
gacattcagc tgacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gagccagttc aagtgttaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc	120
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaagtgg cttctggagt cccttatcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcatat tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa	240
gatgctgccca cttattactg ccaacagtgg agtagtaacc cgctcacgtt cgggtgctggg	300
accaagctgg agctgaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggtgca gctggtgcag	360
tccggggctg agctgaagaa acccggagct tccgtgaagg tgtcttgcaa agccagtggc	420
tacaccttca cagactacta tatgaagtgg gtcaggcagg ctccaggaca gggactggaa	480
tggatcggcg atatcattcc ttccaacggg gccactttct acaatcagaa gtttaaaggc	540

```

agggtgacta ttaccgtgga caaatcaaca agcactgctt atatggagct gagctccctg      600
cgctctgaag atacagccgt gtactattgt gctcggtcac acctgctgag agccagctgg      660
tttgcttatt ggggacaggg caccctgggtg acagtgtctt ccggaggatg tggcggtgga      720
gaagtggccg cactggagaa agaggttgct gctttggaga aggaggtcgc tgcacttgaa      780
aaggaggtcg cagccctgga gaaa                                             804

```

```

<210> 7
<211> 274
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Другий Поліпептидний Ланцюг DART-B

<400> 7

```

```

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1             5             10             15

```

```

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
                20             25             30

```

```

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35             40             45

```

```

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
        50             55             60

```

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65             70             75             80

```

```

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
        85             90             95

```

```

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        100            105            110

```

```

Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser
        115            120            125

```

Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
130 135 140

Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
145 150 155 160

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
165 170 175

Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
180 185 190

Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
195 200 205

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
210 215 220

Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260 265 270

Lys Glu

<210> 8

<211> 822

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Другий Поліпептидний Ланцюг DART-B

<400> 8

gacttcgtga tgacacagtc tcctgatagt ctggccgtga gtctggggga gcgggtgact 60

atgtcttgca agagctccca gtcactgtcg aacagcggaa atcagaaaaa ctatctgacc 120

```

tggtaccagc agaagccagg ccagccccct aaactgctga tctattgggc ttccaccagg      180
gaatctggcg tgcccagacag attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca      240
atttctagtc tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat      300
ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc cggcggcgga      360
ggcgatatca aactgcagca gtcaggggct gaactggcaa gacctggggc ctcagtgaag      420
atgtcctgca agacttctgg ctacaccttt actaggtaga cgatgcactg ggtaaaacag      480
aggcctggac agggctctgga atggattgga tacattaatc ctagccgtgg ttatactaata      540
tacaatcaga agttcaagga caaggccaca ttgactacag acaaatcctc cagcacagcc      600
tacatgcaac tgagcagcct gacatctgag gactctgcag tctattactg tgcaagatat      660
tatgatgatc attactgcct tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctcc      720
ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc ttgaaagag      780
aaggtcgccg cacttaagga aaaggctgca gccctgaaag ag                          822

```

<210> 9

<211> 322

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> CD123 x CD3 Поліпептидний Ланцюг Діатіла Що Має Альбумін Зв'язуючий Сайт

<400> 9

```

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1           5           10          15

```

```

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20          25          30

```

```

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35          40          45

```

```

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50          55          60

```

```

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

```

65					70						75				80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
				85					90					95	
Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly
			100					105					110		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu
		115					120					125			
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
	130					135					140				
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	Lys	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
145					150					155					160
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Ile	Pro	Ser	Asn	Gly	Ala	Thr
				165				170						175	
Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys
			180					185					190		
Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp
		195					200					205			
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	His	Leu	Leu	Arg	Ala	Ser	Trp
	210					215					220				
Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
225					230					235					240
Cys	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu
				245					250					255	
Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys
			260					265					270		
Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu
		275					280					285			

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala
290 295 300

Lys Ser Ala Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala
305 310 315 320

Leu Pro

<210> 10
<211> 966
<212> ДНК
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Полінуклеотид Кодуючий CD123 x CD3 Поліпептидний Ланцюг Діатіла
Що Має Альбумін Зв'язуючий Сайт

<400> 10
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360
cagctggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc 420
aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga 480
cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt ccttccaacg gggccacttt ctacaatcag 540
aagtttaaaag gcagggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag 600
ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg 660
agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga 720
tgtggcgggtg gagaagtggc cgcactggag aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc 780
gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg gagaaaggcg gcgggtctct ggccgaagca 840
aaagtgctgg ccaaccgca actggataaa tatggcgtga gcgattatta taagaacctg 900

attgacaacg caaaatccgc ggaaggcgtg aaagcactga ttgatgaaat tctggccgcc 960
ctgcct 966

<210> 11
<211> 217
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> CH2-CH3 Домени Модифікованого Людського Антитіла Fc Області

<400> 11

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145		150		155		160
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
				165		170
						175
Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
			180			185
						190
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
		195				200
						205
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
		210				215

<210> 12
 <211> 681
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Пептид 1 і CH2 і CH3
 Домени IgG Fc області

<400> 12	
gacaaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc	60
ttcctcttcc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcggtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	420
aaccaggtca gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	540
gacggctcct tcttcctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc	660
ctctccctgt ctccgggtaa a	681

```

<210> 13
<211> 510
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-A w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 13

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1          5          10          15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20          25          30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35          40          45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50          55          60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85          90          95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100         105         110

Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
115         120         125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130         135         140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
145         150         155         160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
165         170         175

```

Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr			
			180					185					190					
Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser			
		195					200					205						
Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn			
	210					215					220							
Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr			
225					230					235					240			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala			
				245				250						255				
Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu			
			260					265					270					
Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr			
		275					280					285						
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe			
	290					295					300							
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro			
305					310					315					320			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val			
				325					330					335				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr			
			340				345						350					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val			
		355					360					365						
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys			
	370					375					380							

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
385 390 395 400

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
405 410 415

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
420 425 430

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
435 440 445

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
450 455 460

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
465 470 475 480

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
485 490 495

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510

<210> 14

<211> 1530

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-A w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 14

gacttcgtga tgacacagtc tcctgatagt ctggccgtga gtctggggga gcggtgact	60
atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa atcagaaaaa ctatctgacc	120
tggtaccagc agaagccagg ccagccccct aaactgctga tctattgggc ttccaccagg	180
gaatctggcg tgcccagacag attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca	240
atttctagtc tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat	300

```

ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc cggcggcgga      360
ggcgaggtgc agctgggtgga gtctggggga ggcttggtcc agcctggagg gtccctgaga      420
ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agcacatacg ctatgaattg ggtccgccag      480
gctccaggga aggggctgga gtgggttggga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca      540
acctactatg ccgactctgt gaaggataga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac      600
tactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggcctgta ttactgtgtg      660
agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tcttggtttg cttattgggg acaggggaca      720
ctggtgactg tgtcttcggg aggatgtggc ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag      780
gttgctgctt tggagaagga ggtcgtgca cttgaaaagg aggtcgcagc cctggagaaa      840
ggcggcgggg acaaaaactca cacatgcca cgtgcccag cacctgaagc cgcgggggga      900
ccgtcagtct tcctcttccc ccaaaaaccc aaggacacc tcattgatct cgggacccct      960
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg     1020
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac     1080
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag     1140
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1200
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag     1260
atgaccaaga accaggtcag cctgtgggtg ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1320
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     1380
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1440
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1500
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa                                     1530

```

<210> 15

<211> 272

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Другий Поліпептидний Ланцюг DART-A w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 15

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr
165 170 175

Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp

210	215	220	
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly			
225	230	235	240
Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu			
	245	250	255
Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu			
	260	265	270
<210> 16			
<211> 816			
<212> ДНК			
<213> Штучна Послідовність			
<220>			
<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Другий Поліпептидний Ланцюг DART-A w/Fc Версія 1 Конструкт			
<400> 16			
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgggaac tgtgaccctg			60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag			120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggggtacaa aaaaaagggc tccctggacc			180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca			240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc			300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat cggcggcgg aggcgaggtg			360
cagctggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc			420
aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga			480
cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt ccttccaacg gggccacttt ctacaatcag			540
aagtttaaaag gcagggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag			600
ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg			660
agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga			720
tgtggcggtg gaaaagtggc cgcactgaag gagaaagttg ctgctttgaa agagaaggtc			780
gccgcactta aggaaaaggt cgcagccctg aaagag			816


```

<210> 17
<211> 515
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-A w/Fc Версія 2 Конструкт

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1          5          10          15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
          20          25          30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
          35          40          45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50          55          60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65          70          75          80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
          85          90          95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
          100          105          110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
          115          120          125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
          130          135          140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145          150          155          160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
          165          170          175

```


Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Asp Phe Val Met Thr
225 230 235 240

Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met
245 250 255

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn
260 265 270

Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
275 280 285

Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
290 295 300

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
305 310 315 320

Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro
325 330 335

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
340 345 350

Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
355 360 365

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
370 375 380

Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
385 390 395 400

Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
405 410 415

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
420 425 430

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
435 440 445

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
450 455 460

Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
465 470 475 480

Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
485 490 495

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
500 505 510

Leu Lys Glu
515

<210> 18

<211> 1545

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-A w/Fc Версія 2 Конструкт

<400> 18

gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

```

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag      420
aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc      540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg      600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      660
ctctccctgt ctccgggtaa agccccctcc agctcccccta tggaagactt cgtgatgaca      720
cagtctcctg atagtctggc cgtgagtctg ggggagcggg tgactatgtc ttgcaagagc      780
tcccagtcac tgctgaacag cggaaatcag aaaaactatc tgacctggta ccagcagaag      840
ccaggccagc cccctaaact gctgatctat tgggcttcca ccagggaatc tggcgtgccc      900
gacagattca gcggcagcgg cagcggcaca gattttaccc tgacaatttc tagtctgcag      960
gccgaggacg tggctgtgta ctattgtcag aatgattaca gctatcccta cactttcggc     1020
caggggacca agctggaaat taaaggaggc ggatccggcg gcggaggcga ggtgcagctg     1080
gtggagtctg ggggaggcct ggtccagcct ggagggtccc tgagactctc ctgtgcagcc     1140
tctggattca cttcagcac atacgctatg aattgggtcc gccaggctcc agggaagggg     1200
ctggagtggg ttggaaggat caggtccaag tacaacaatt atgcaaccta ctatgccgac     1260
tctgtgaagg atagattcac catctcaaga gatgattcaa agaactcact gtatctgcaa     1320
atgaacagcc tgaanaaccga ggacacggcc gtgtattact gtgtgagaca cggtaaacttc     1380
ggcaattctt acgtgtcttg gtttgcttat tggggacagg ggacactggt gactgtgtct     1440
tccggaggat gtggcgggtg aaaagtggcc gcactgaagg agaaagttgc tgctttgaaa     1500
gagaaggtcg ccgcacttaa ggaaaaggtc gcagccctga aagag                        1545

```

```

<210> 19
<211> 279
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>

```

<223> Перший Поліпептидний Ланцюг Контрольного DART

<400> 19

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
165 170 175

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

```

                195                200                205

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
 210                215                220

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225                230                235                240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu
                245                250                255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
                260                265                270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 275

<210> 20
<211> 270
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Другий Поліпептидний Ланцюг Контрольного DART

<400> 20

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1                5                10                15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
                20                25                30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35                40                45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50                55                60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65                70                75                80

```

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr
165 170 175

Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val
195 200 205

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 21
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Легкий Ланцюг CD3-Зв'язуючого Домена DART-A

<400> 21

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 22

<211> 125

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Важкий Ланцюг CD3-Зв'язуючого Домена DART-A

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 23
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Легкий Ланцюг CD3-Зв'язуючого Домена DART-B

<400> 23

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85

90

95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 24

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Важкий Ланцюг CD3-Зв'язуючого Домена DART-B

<400> 24

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Легкий Ланцюг CD123-Зв'язуючого Домена DART-A

<400> 25

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Важкий Ланцюг CD123-Зв'язуючого Домена DART-A

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

```

                20                25                30
Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35                40                45
Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
      50                55                60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65                70                75                80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100                105                110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115                120

```

```

<210> 27
<211> 113
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

```

```

<220>
<223> Легкий Ланцюг CD123-Зв'язуючого Домена DART-B

```

```

<400> 27

```

```

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1                5                10                15

```

```

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
      20                25                30

```

```

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35                40                45

```

```

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50                55                60

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 28
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Важкий Ланцюг CD123-Зв'язуючого Домена DART-B

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Лінкер 1 Поліпептид

<400> 29

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Лінкер 2 Поліпептид

<400> 30

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Лінкер 3 Поліпептид

<400> 31

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 32

<400> 32
000

<210> 33

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Лінкер 4 Поліпептид

<400> 33

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
 1 5

<210> 34
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> E-спіральний Домен

<400> 34

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 20 25

<210> 35
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> K-спіральний Домен

<400> 35

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 20 25

<210> 36
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Переважний Альбумін-Зв'язуючий Домен

<400> 36

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 37

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> CH2-CH3 Домени Людської Fc Області

<400> 37

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(14)
<223> CDR1 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Анти-CD3 Антитіла

<400> 38

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 39
<211> 7

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDR2 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Анти-CD3 Антитіла

<400> 39

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDR3 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Анти-CD3 Антитіла

<400> 40

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDR1 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Анти-CD3 Антитіла

<400> 41

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> CDR2 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Анти-CD3 Антитіла
 <400> 42

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 43
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> CDR3 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Анти-CD3 Антитіла
 <400> 43

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> CDR1 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Анти-CD123 Антитіла
 <400> 44

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR2 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Анти-CD123 Антитіла

<400> 45

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Анти-CD123 Антитіла

<400> 46

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> CDR1 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Анти-CD123 Антитіла

<400> 47

Asp Tyr Tyr Met Lys
 1 5

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> CDR2 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Анти-CD123 Антитіла

<400> 48

Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR3 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Анти-CD123 Антитіла

<400> 49

Ser His Leu Leu Arg Ala Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Гетеродимеризація Домена

<400> 50

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 51

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Гетеродимеризація Домена

<400> 51

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Гетеродимеризація Домена

<400> 52

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Гетеродимеризація Домена

<400> 53

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 54
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Третій Поліпептидний Ланцюг DART-A w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 54

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met			
			20					25					30					
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			
		35					40					45						
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val			
	50					55					60							
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr			
65					70					75					80			
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly			
				85					90					95				
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile			
			100					105					110					
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val			
		115					120					125						
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser			
	130					135					140							
Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu			
145					150					155					160			
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro			
				165					170					175				
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val			
			180					185					190					
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met			
		195					200					205						
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser			
	210					215					220							

Pro Gly Lys
225

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Пептид 1

<400> 55

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 56
<211> 217
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Переважні CH2 і CH3 Домени Fc Області

<400> 56

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Лінкер 4 Поліпептид

<400> 57

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 58
<211> 273
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Амінокислотна Послідовність Першого Поліпептидного Ланцюга "Контрольне

DART-2"

<400> 58

Asp	Phe	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		
Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			
Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50					55					60				
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn
				85					90					95	
Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
			100					105					110		
Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Asp	Glu	Thr
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Pro	Met	Lys	Leu	Ser	Cys	Val
	130					135					140				
Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln
145					150					155					160
Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Gln	Ile	Arg	Asn	Lys	Pro
				165					170					175	
Tyr	Asn	Tyr	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr
			180					185					190		
Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn

195		200		205
Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr				
210		215		220
Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly				
225		230		240
Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala				
	245		250	255
Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu				
	260		265	270

Lys

<210> 59
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна Послідовність Другого Поліпептидного Ланцюга "Контрольне DART-2"

<400> 59

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly
165 170 175

Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260 265 270

Lys Glu

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Діатіло, що характеризується оптимізованою послідовністю, здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3, причому діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, ковалентно зв'язані один з одним, причому:
А) перший поліпептидний ланцюг містить, у напрямку від N-кінця до С-кінця:
і) домен 1, що містить

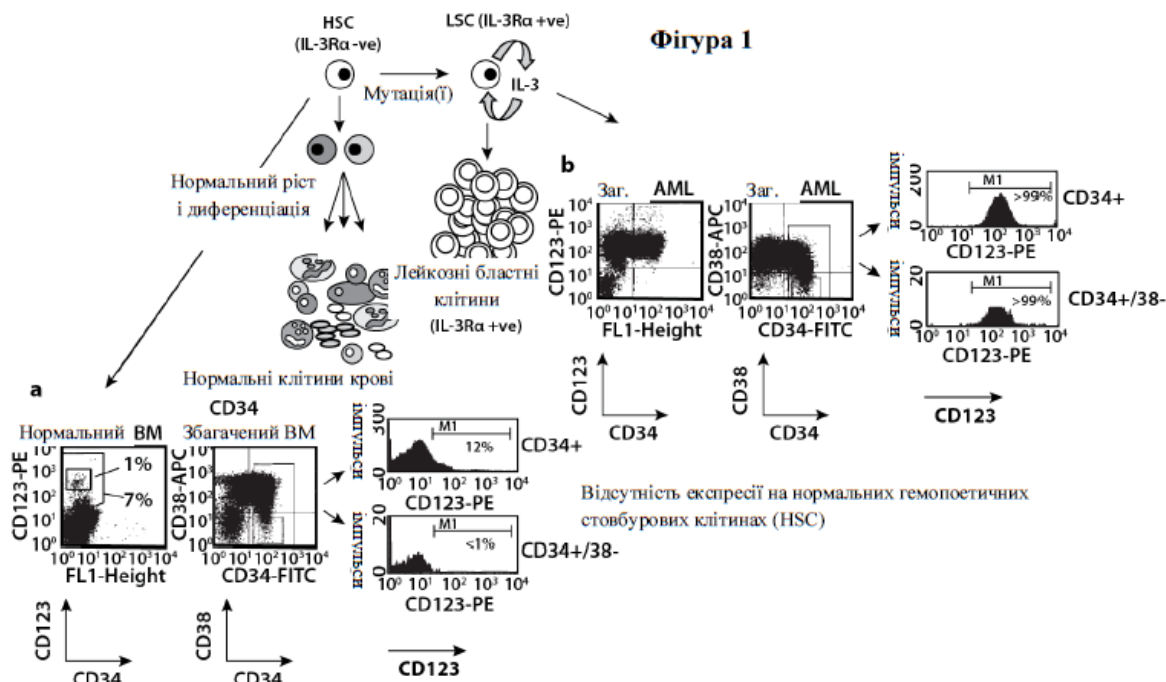
- (1) субдомен (1A), який містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:21); і
- (2) субдомен (1B), який містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VH_{CD123}) (SEQ ID NO:26),
- 5 причому зазначені субдомени 1A і 1B відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:29);
- ii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34) або К-спіральний домен (SEQ ID NO:35), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:30); і
- 10 В) другий поліпептидний ланцюг містить, у напрямку від N-кінця до С-кінця:
- i) домен 1, що містить
- (1) субдомен (1A), який містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD123 (VL_{CD123}) (SEQ ID NO:25); і
- (2) субдомен (1B), який містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:22),
- 15 причому зазначені субдомени 1A і 1B відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:29);
- ii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:35) або Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:30); і причому зазначений домен 2 зазначеної першої і зазначеної другої поліпептидних ланцюгів не являють собою обидва Е-спіральних домени або обидва К-спіральних домени;
- 20 і при цьому:
- (а) зазначений домен VL зазначеного першого поліпептидного ланцюга і зазначений домен VH зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3; і
- 25 (b) зазначений домен VL зазначеного другого поліпептидного ланцюга і зазначений домен VH зазначеного першого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD123.
- 30 2. Діатіло за п. 1, у якому зазначений перший поліпептидний ланцюг додатково містить альбумінзв'язуючий домен (SEQ ID NO:36), з'єднаний із зазначеним доменом 2 за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:31).
3. Діатіло за п. 1, у якому зазначений другий поліпептидний ланцюг додатково містить домен 3, що містить домен CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну (SEQ ID NO:37), причому зазначений домен 3 з'єднаний із зазначеним доменом 1 за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:33).
- 35 4. Діатіло за п. 1, у якому зазначений перший поліпептидний ланцюг додатково містить домен 3, що містить домен CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну (SEQ ID NO:37), причому зазначений домен 3 з'єднаний із зазначеним доменом 1 за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:33).
5. Діатіло за п. 1, у якому зазначений другий поліпептидний ланцюг додатково містить домен 3, що містить домен CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну (SEQ ID NO:37), причому зазначений домен 3 з'єднаний із зазначеним доменом 2 за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:32).
- 40 6. Діатіло за п. 1, у якому зазначений перший поліпептидний ланцюг додатково містить домен 3, що містить домен CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну (SEQ ID NO:37), причому зазначений домен 3 з'єднаний із зазначеним доменом 2 за допомогою пептидного лінкера (SEQ ID NO:32).
- 45 7. Діатіло за будь-яким із пп. 3-6, причому зазначене діатіло додатково містить третій поліпептидний ланцюг, що містить домен CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну (SEQ ID NO:11).
8. Діатіло за будь-яким із пп. 3-7, причому зазначене діатіло додатково містить цистеїнвмісний пептид (SEQ ID NO:55) N-кінця до зазначеного домена CH2 і CH3 зазначеного домена Fc імуноглобуліну.
- 50 9. Діатіло за будь-яким із пп. 1-8, у якому зазначений домен 2 зазначеного першого поліпептидного ланцюга являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:35), і зазначений домен 2 зазначеного другого поліпептидного ланцюга являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34).
10. Діатіло за будь-яким із пп. 1-8, у якому зазначений домен 2 зазначеного першого поліпептидного ланцюга являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:34), і зазначений домен 2 зазначеного другого поліпептидного ланцюга являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:35).
- 55 11. Діатіло за будь-яким з попередніх пунктів, причому діатіло здатне перехресно реагувати з білками CD123 і CD3 як людини, так і примата.
12. Біспецифічне діатіло, здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3, причому діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, ковалентно зв'язані один з одним, причому зазначене біспецифічне діатіло містить наступне:
- 60

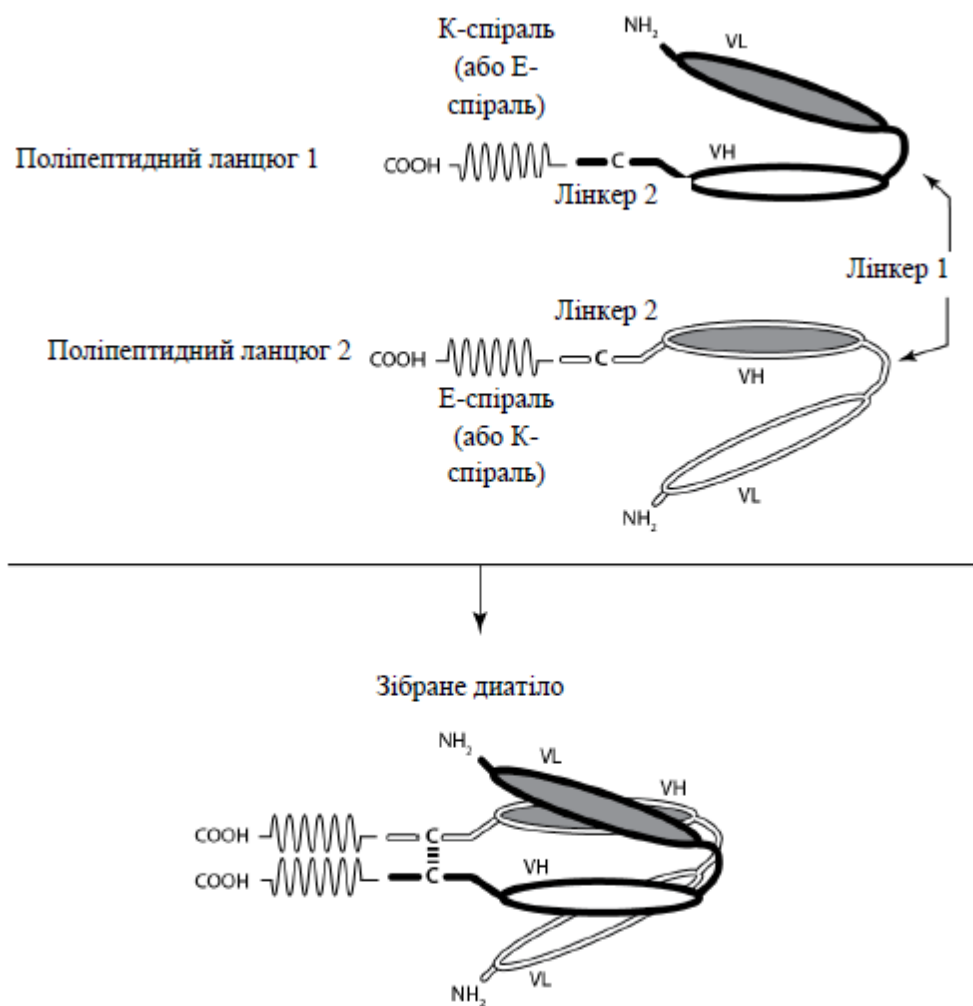
- А) перший поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:1; і
 В) другий поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:3;
- 5 причому зазначений перший і зазначений другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним дисульфідним зв'язком.
13. Біспецифічне діатіло, здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3, причому діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, ковалентно зв'язані один з одним, і додатково містить третій поліпептидний ланцюг, причому
- 10 зазначене біспецифічне діатіло містить наступне:
 А) перший поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:13; і
 В) другий поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:15;
- 15 С) третій поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:54;
 причому зазначений перший і зазначений другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним дисульфідним зв'язком.
14. Біспецифічне діатіло, здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD123 і з епітопом CD3, причому діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, ковалентно зв'язані один з одним, і додатково містить третій поліпептидний ланцюг, причому
- 20 зазначене біспецифічне діатіло містить наступне:
 А) перший поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:17; і
 В) другий поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:1;
- 25 С) третій поліпептидний ланцюг, який характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:54;
 причому зазначений перший і зазначений другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані
- 30 один з одним дисульфідним зв'язком.
15. Діатіло за будь-яким з попередніх пунктів для застосування як фармацевтичного засобу.
16. Діатіло за будь-яким із пп. 1-14 для застосування в лікуванні захворювання або стану, пов'язаного з експресією CD123 або таке, що характеризується експресією CD123.
17. Діатіло за п. 16, причому зазначене захворювання або стан, пов'язаний з експресією CD123
- 35 або такий, що характеризується експресією CD123, являє собою злоякісну пухлину.
18. Діатіло за п. 17, причому зазначена злоякісна пухлина вибрана із групи, що складається з наступного: гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), хронічний мієлогенний лейкоз (ХМЛ), включаючи бластний криз ХМЛ і онкоген Абельсона, пов'язаний із ХМЛ (транслокація Bcr-ABL), мієлодиспластичний синдром (МДС), гострий В-лімфобластний лейкоз (В-ГЛЛ), хронічний
- 40 лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), включаючи ХЛЛ із синдромом Ріхтера або трансформацією Ріхтера, волохатоклітинний лейкоз (ВКЛ), новоутворення із бластних плазмацитоїдних дендритних клітин (УБПДК), неходжкінські лімфоми (НХЛ), включаючи мантийноклітинну лімфому (МКЛ) і дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому (МЛЛ), лімфому Ходжкіна, системний мастоцитоз і лімфому Беркіта.
19. Діатіло за п. 16, причому зазначене захворювання або стан, пов'язаний з експресією CD123 або такий, що характеризується експресією CD123, являє собою запальний стан.
20. Діатіло за п. 19, причому зазначений запальний стан вибраний із групи, що складається з наступного: системний червоний вовчак (СЧВ), алергія і бронхіальна астма, ревматоїдний артрит.
- 50 21. Фармацевтична композиція, що містить діатіло за будь-яким із пп. 1-14 і фізіологічно прийнятний носій.
22. Застосування фармацевтичної композиції за п. 21 у лікуванні захворювання або стану, пов'язаного з експресією CD123 або такого, що характеризується експресією CD123.
23. Застосування за п. 22, при якому зазначене захворювання або стан, пов'язаний з експресією
- 55 CD123 або такий, що характеризується експресією CD123, являє собою злоякісну пухлину.
24. Застосування за п. 23, при якому зазначена злоякісна пухлина вибрана із групи, що складається з наступного: гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), хронічний мієлогенний лейкоз (ХМЛ), включаючи бластний криз ХМЛ і онкоген Абельсона, пов'язаний із ХМЛ (транслокація Bcr-ABL), мієлодиспластичний синдром (МДС), гострий В-лімфобластний лейкоз (В-ГЛЛ),
- 60 хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), включаючи ХЛЛ із синдромом Ріхтера або

трансформацію Ріхтера, волохатоклітинний лейкоз (ВКЛ), новоутворення із бластних плазмацитоїдних дендритних клітин (УБПДК), нехождкінські лімфоми (НХЛ), включаючи мантіїноклітинну лімфому (МКЛ) і дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому (МЛЛ), лімфому Ходжкіна, системний мастоцитоз і лімфому Беркіта.

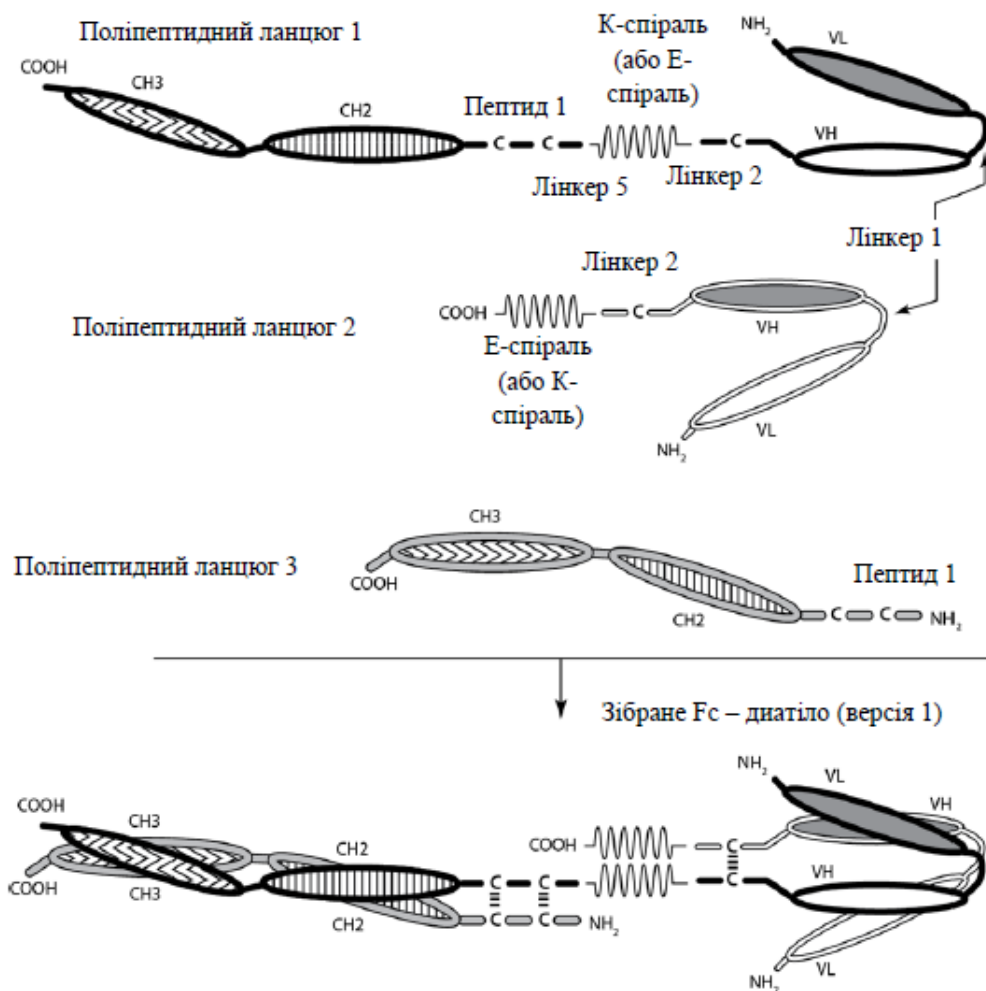
5 25. Застосування за п. 22, при якому зазначене захворювання або стан, пов'язаний з експресією CD123 або такий, що характеризується експресією CD123, являє собою запальний стан.

26. Застосування за п. 25, при якому зазначений запальний стан вибраний із групи, що складається із системного червоного вовчака (СЧВ), алергії і бронхіальної астми.

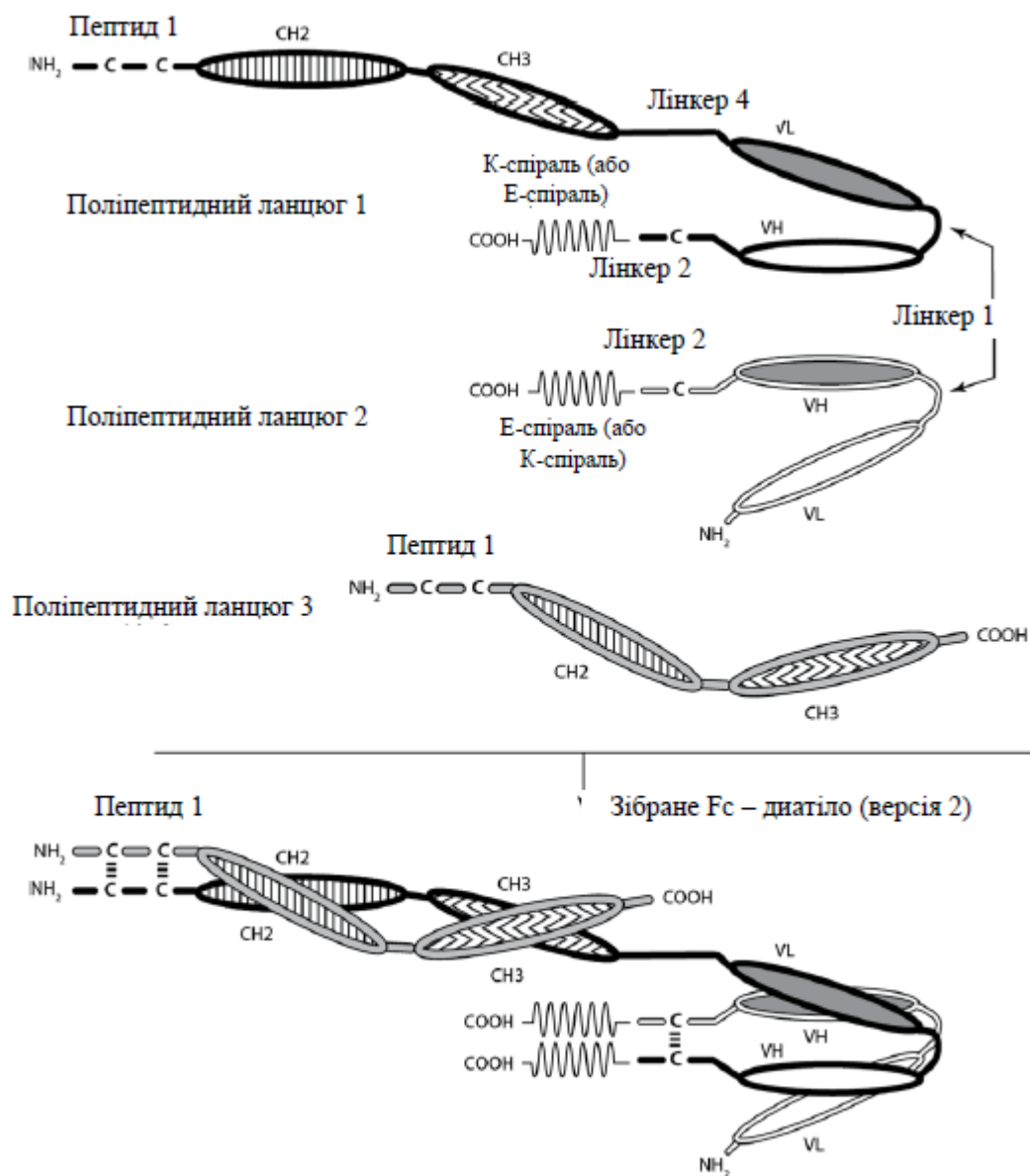




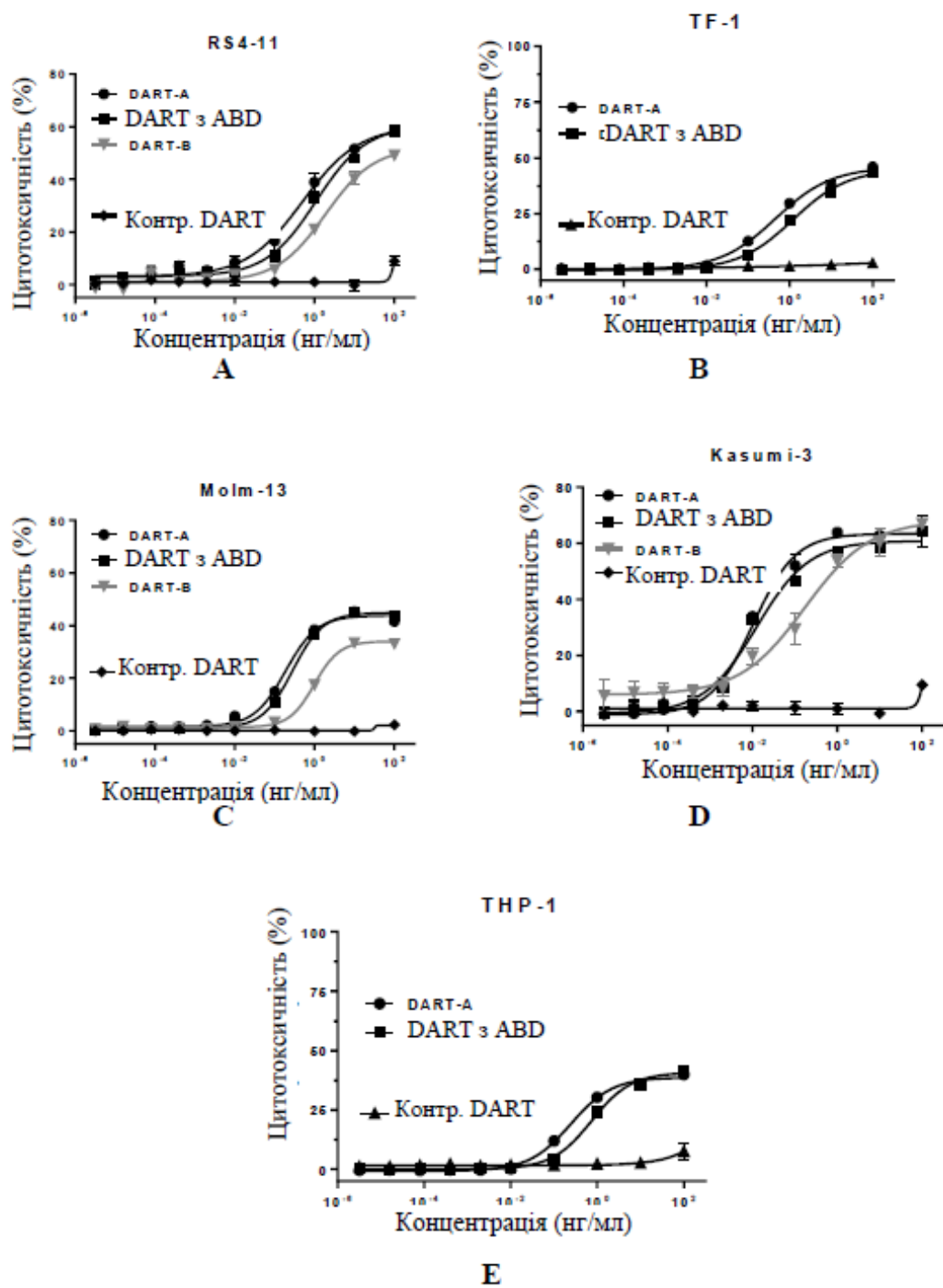
Фігура 2



Фігура 3А

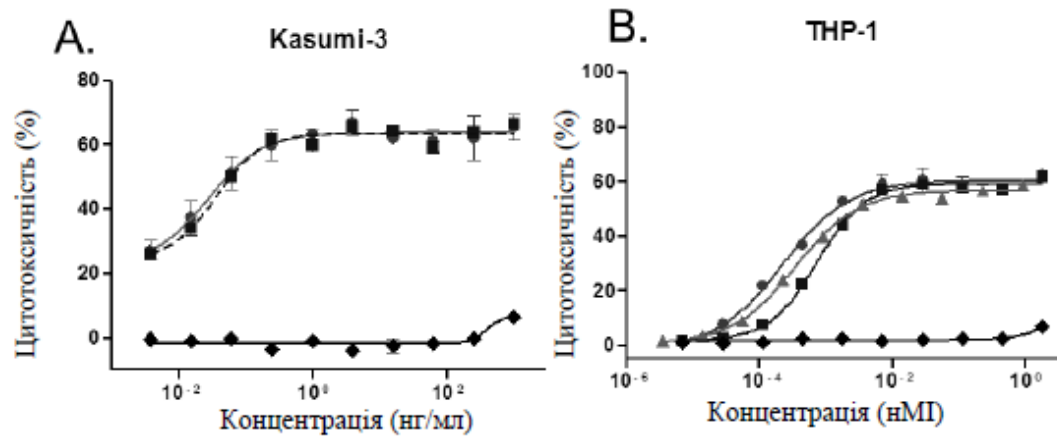


Фігура 3В

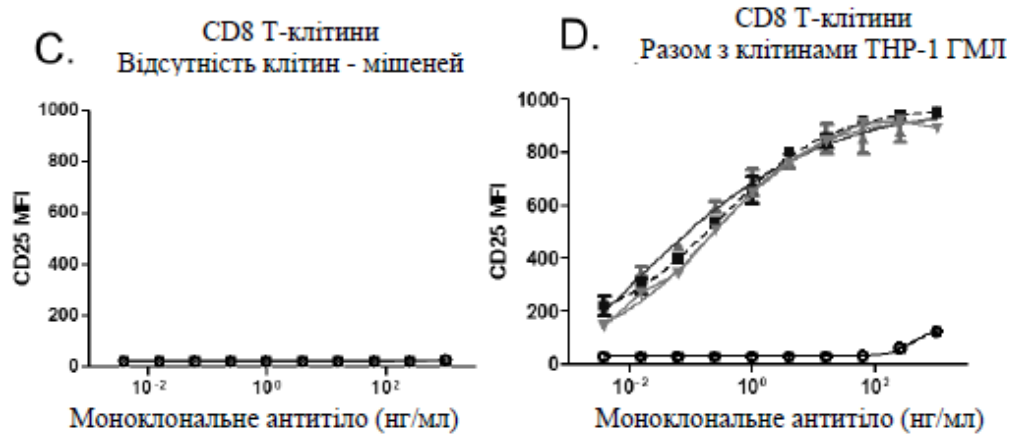


Фігура 4

Виразена активність CTL у відношенні клітин ГМЛ

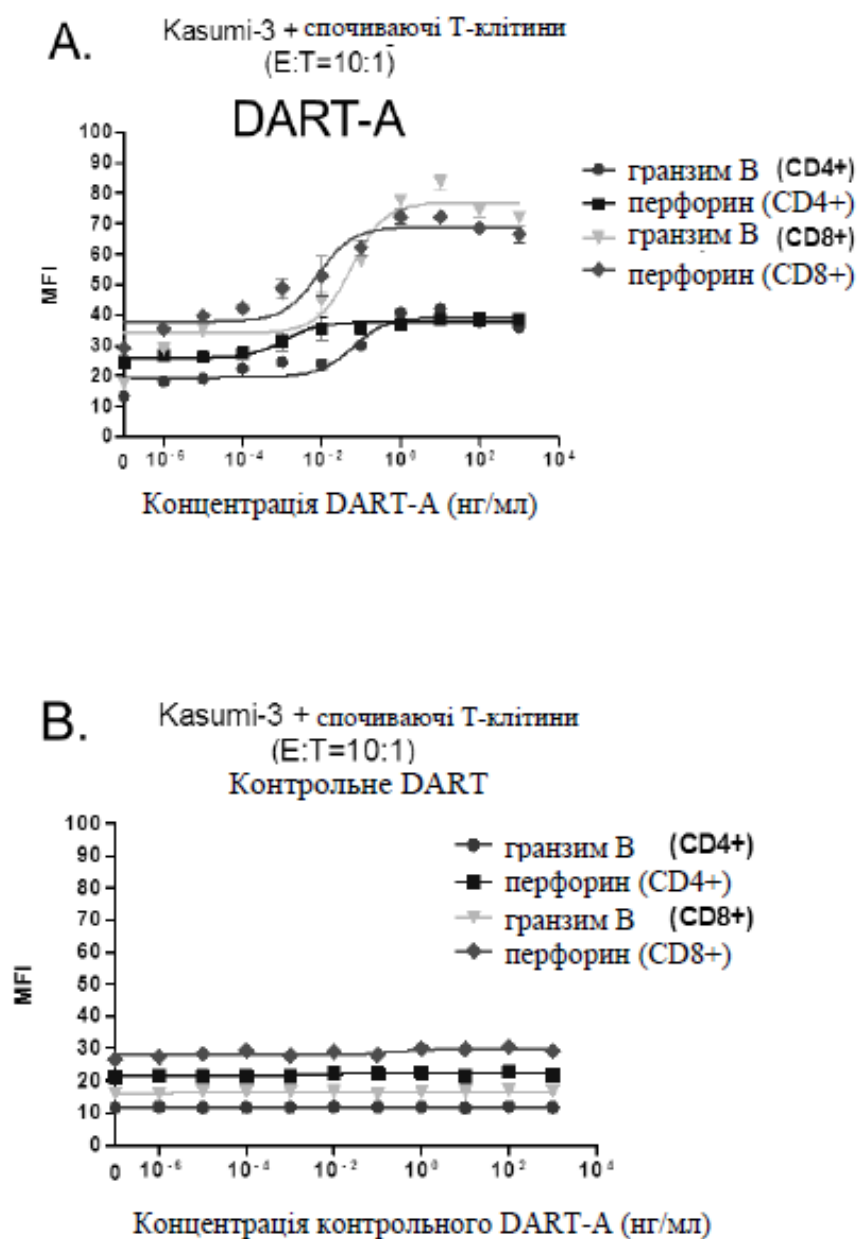


Відсутність T-клітинної активації при відсутності сумісного залучення



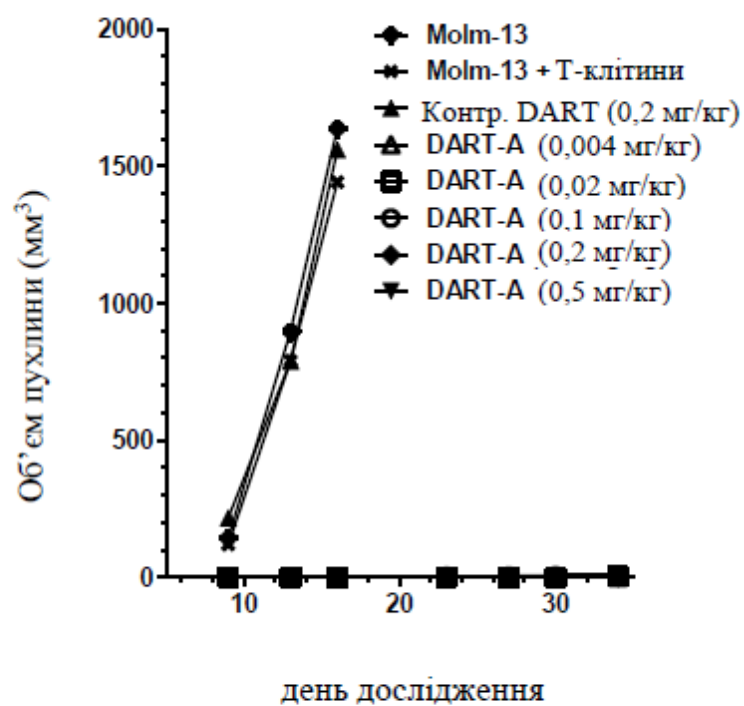
- DART-A
- DART-A w/ABD
- ▲— DART-A w/Fc
- ◆— Контр. DART

Фігура 5

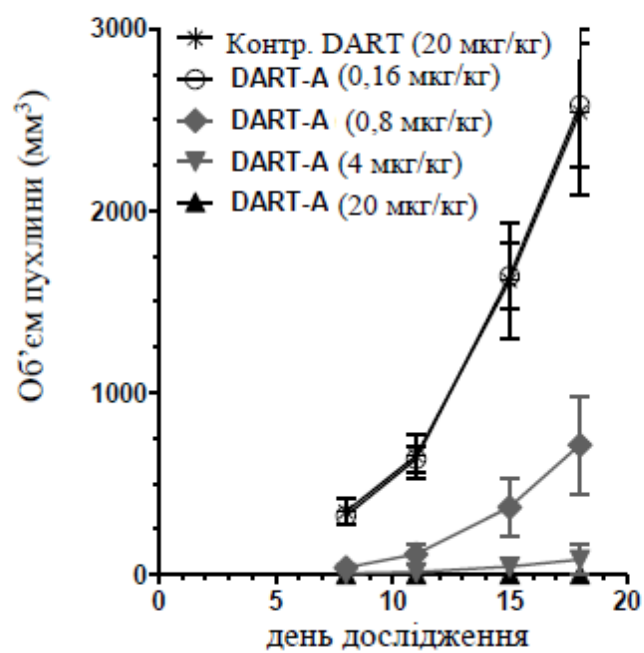


Фігура 6

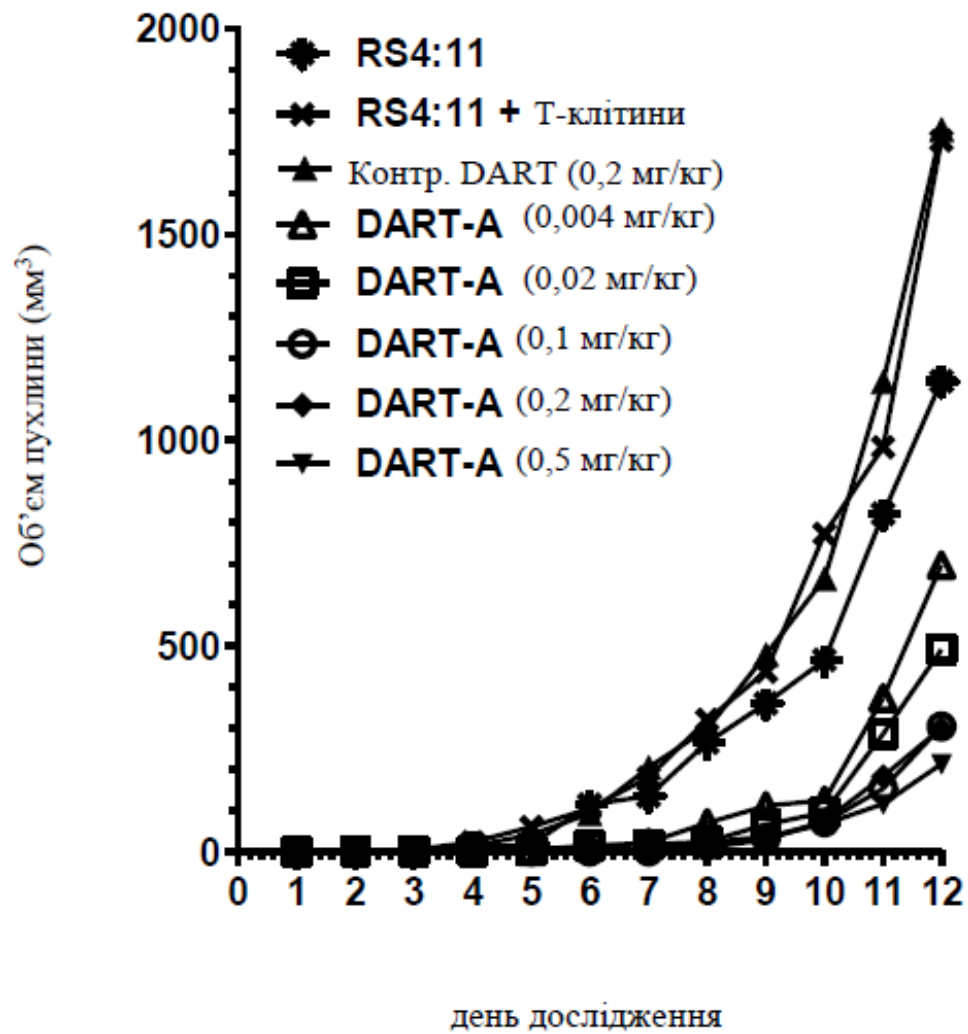
A.



B.

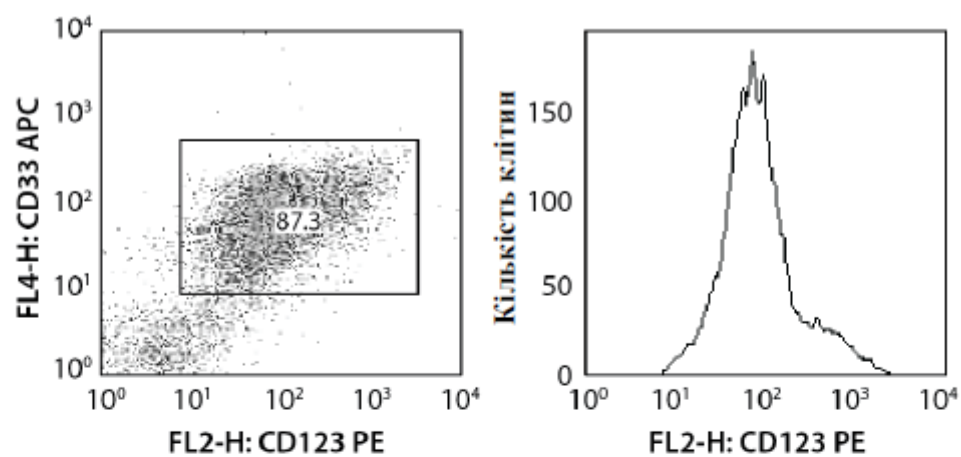


Фігура 7

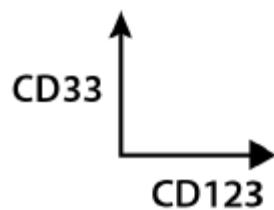
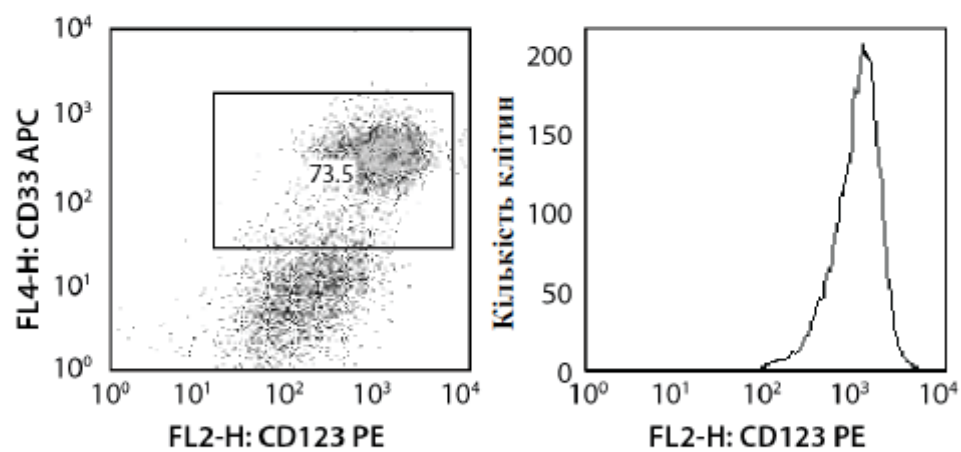


Фігура 8

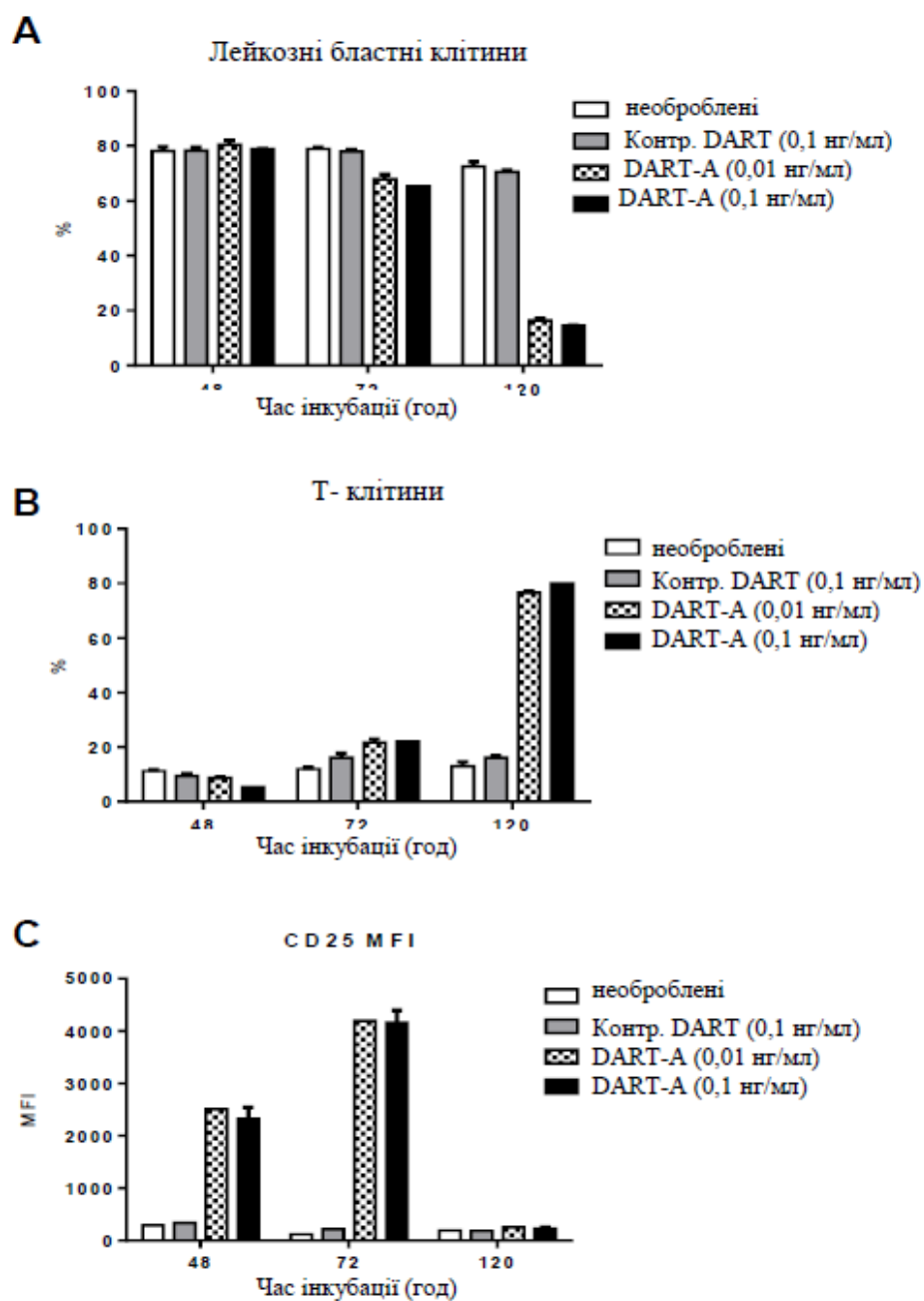
A AML BM MNC



B Kasumi-3

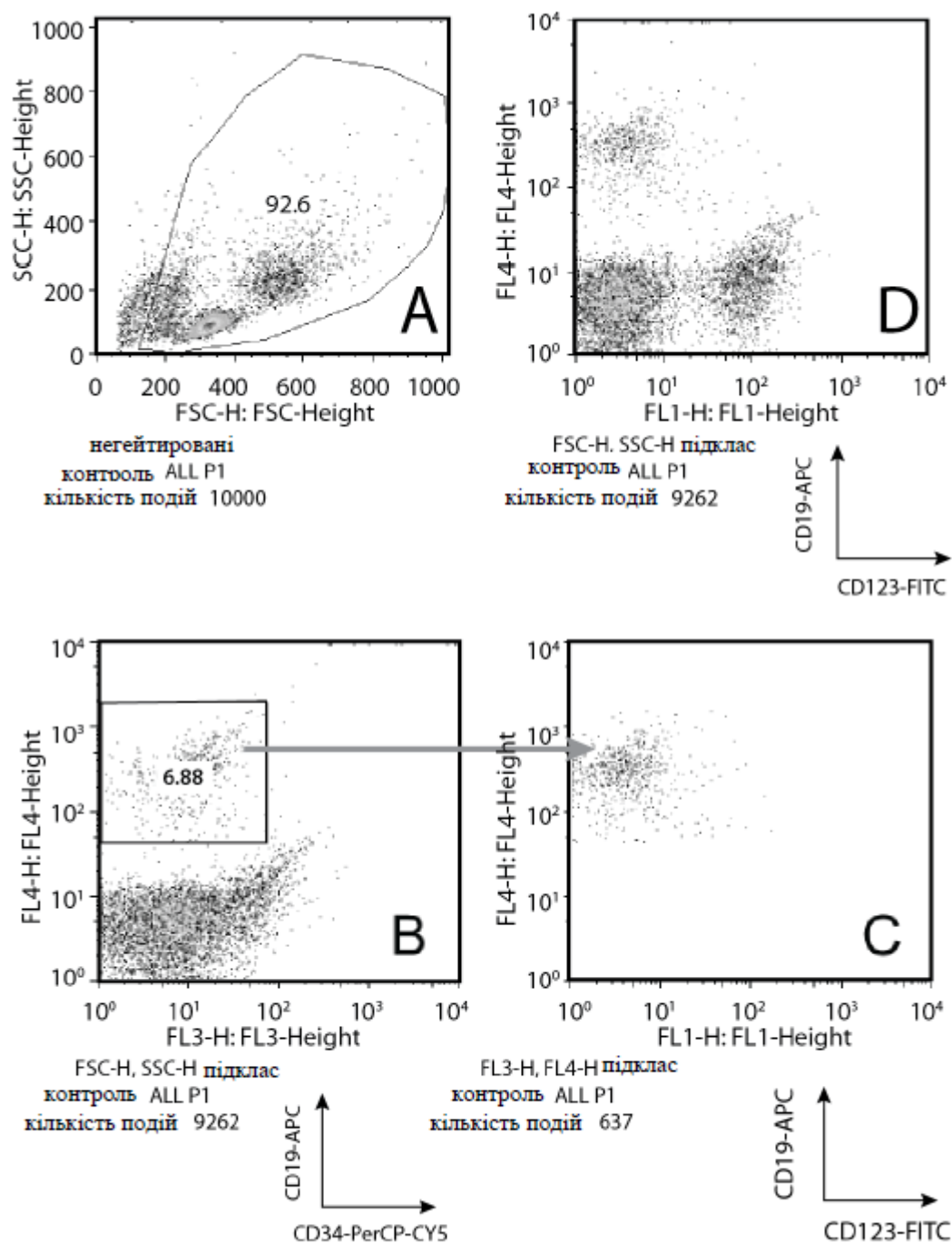


Фігура 9



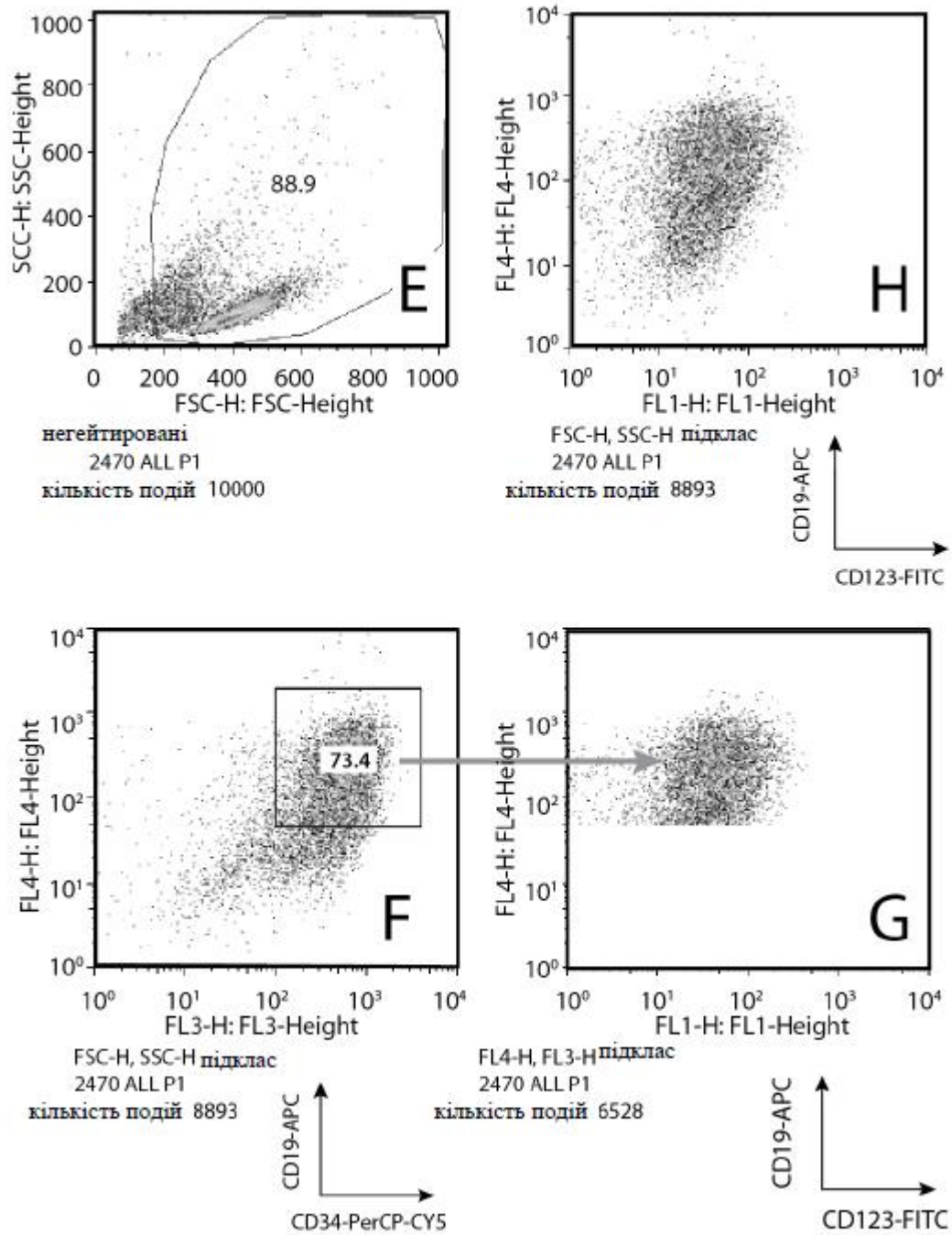
Фігура 10

Нормальні PBMC

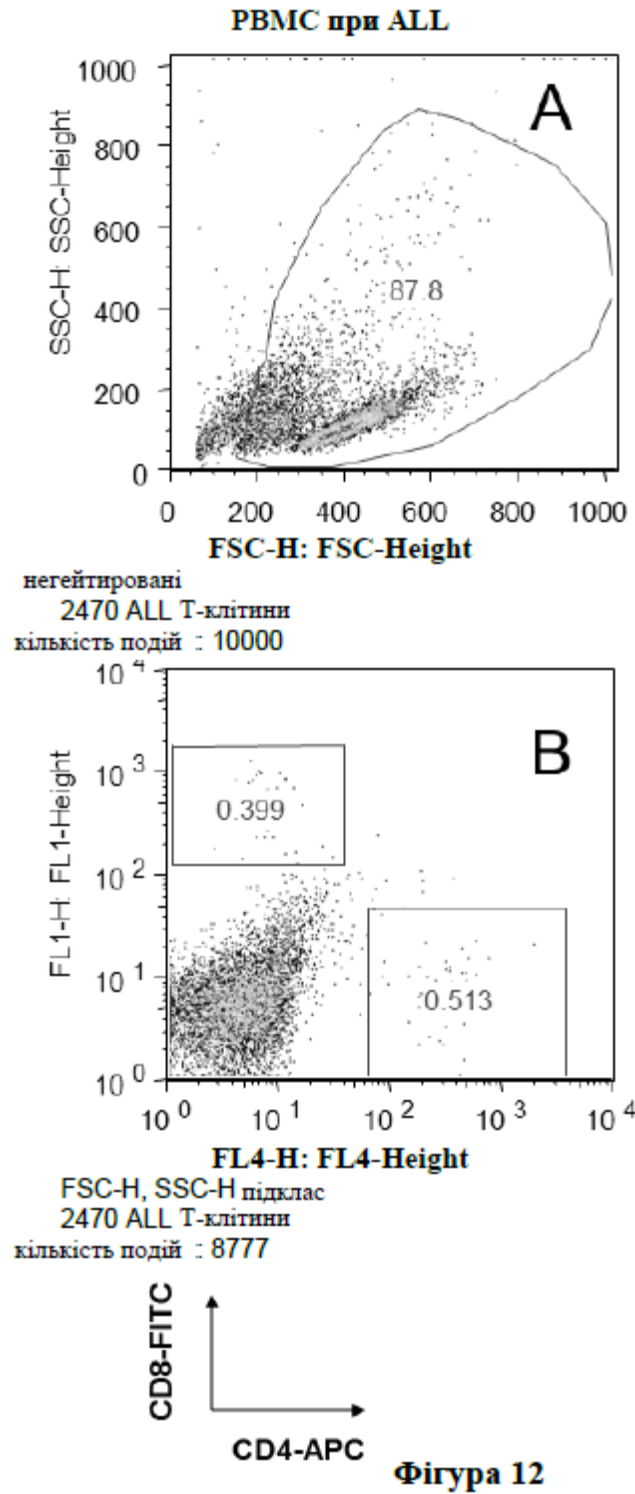


Фігура 11

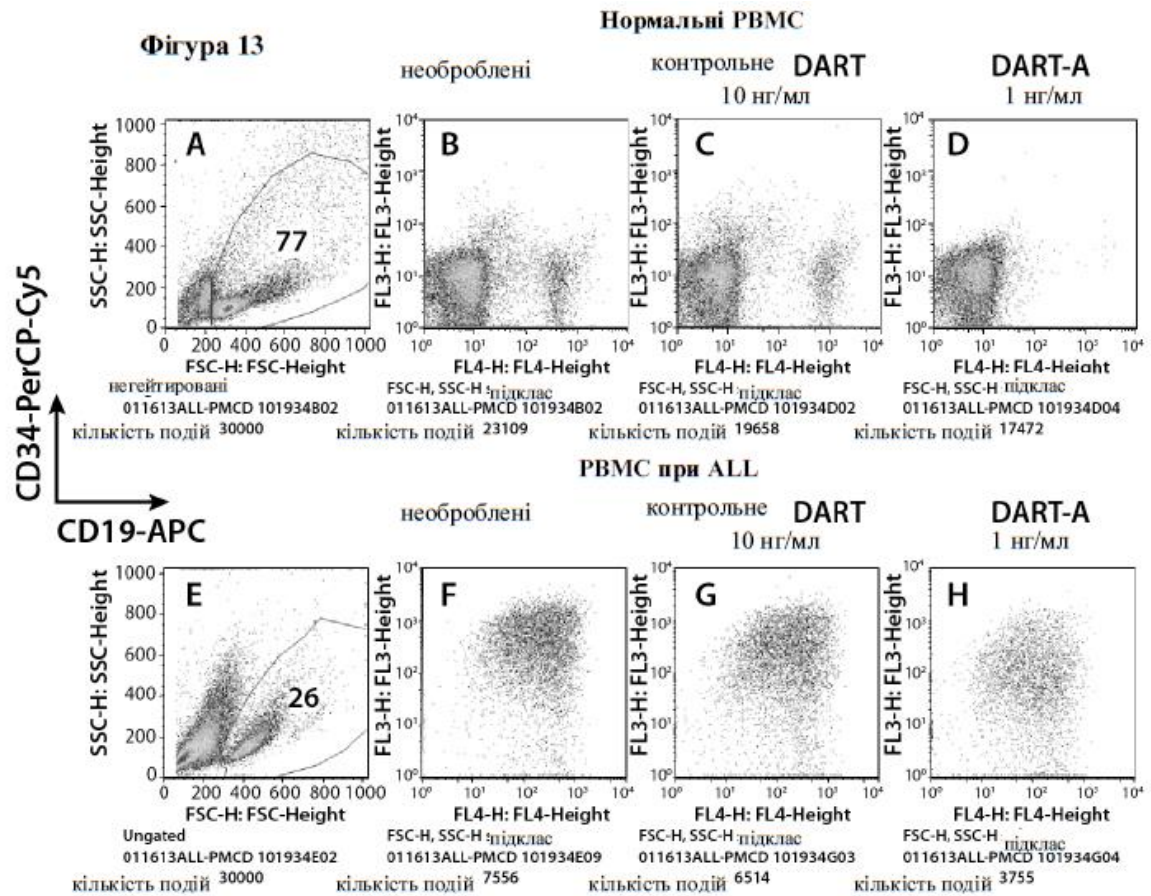
ALL PBMC

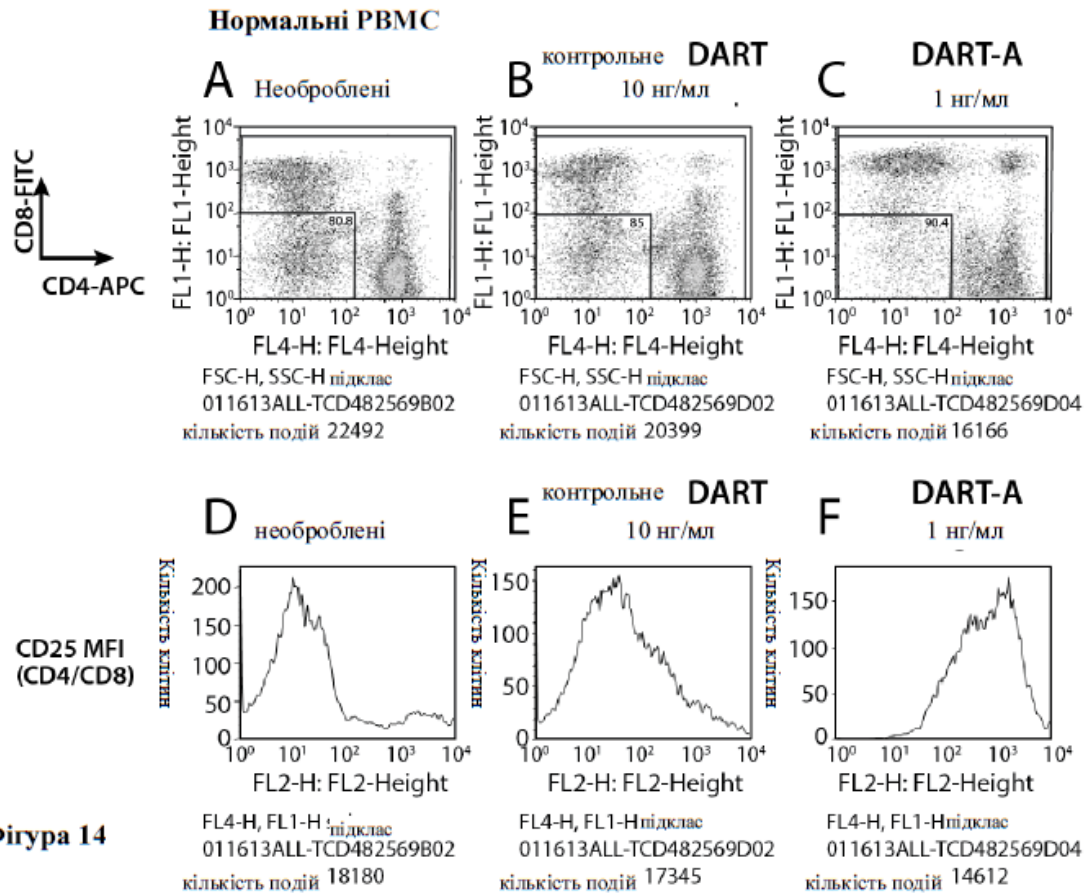


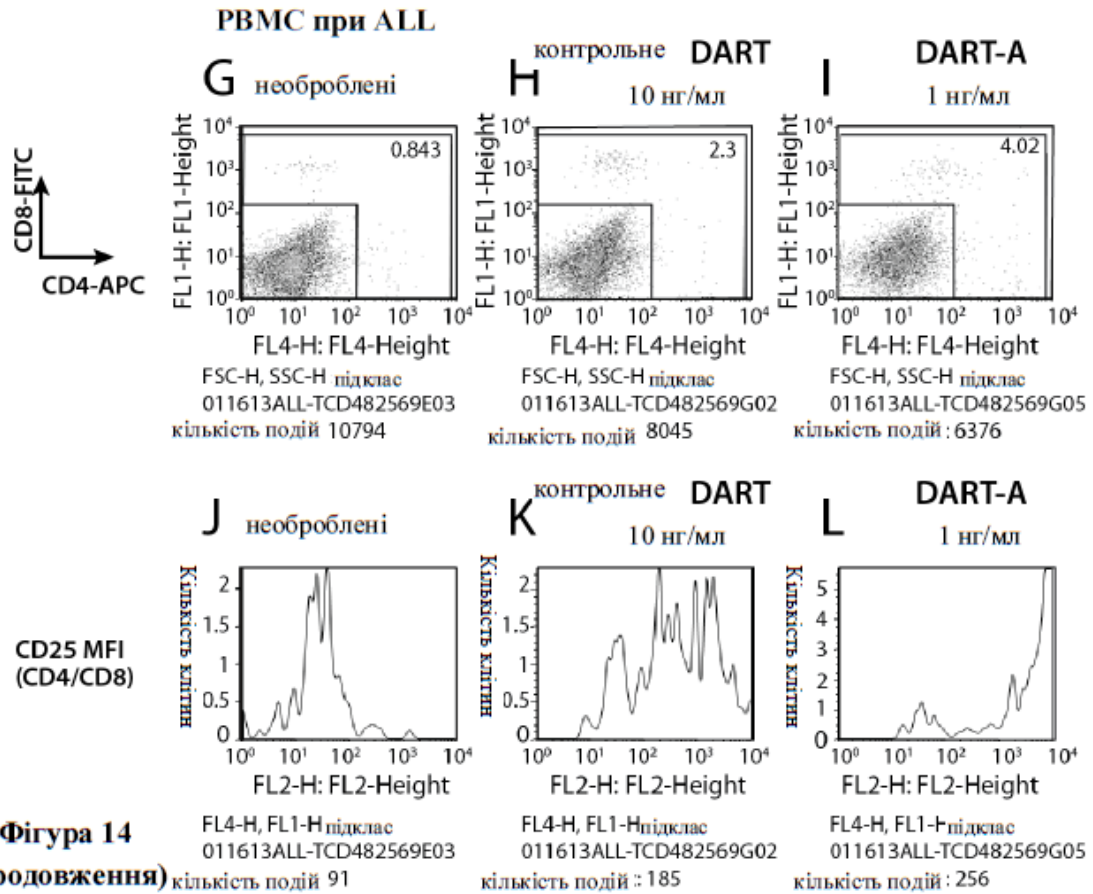
Фігура 11 (продовження)

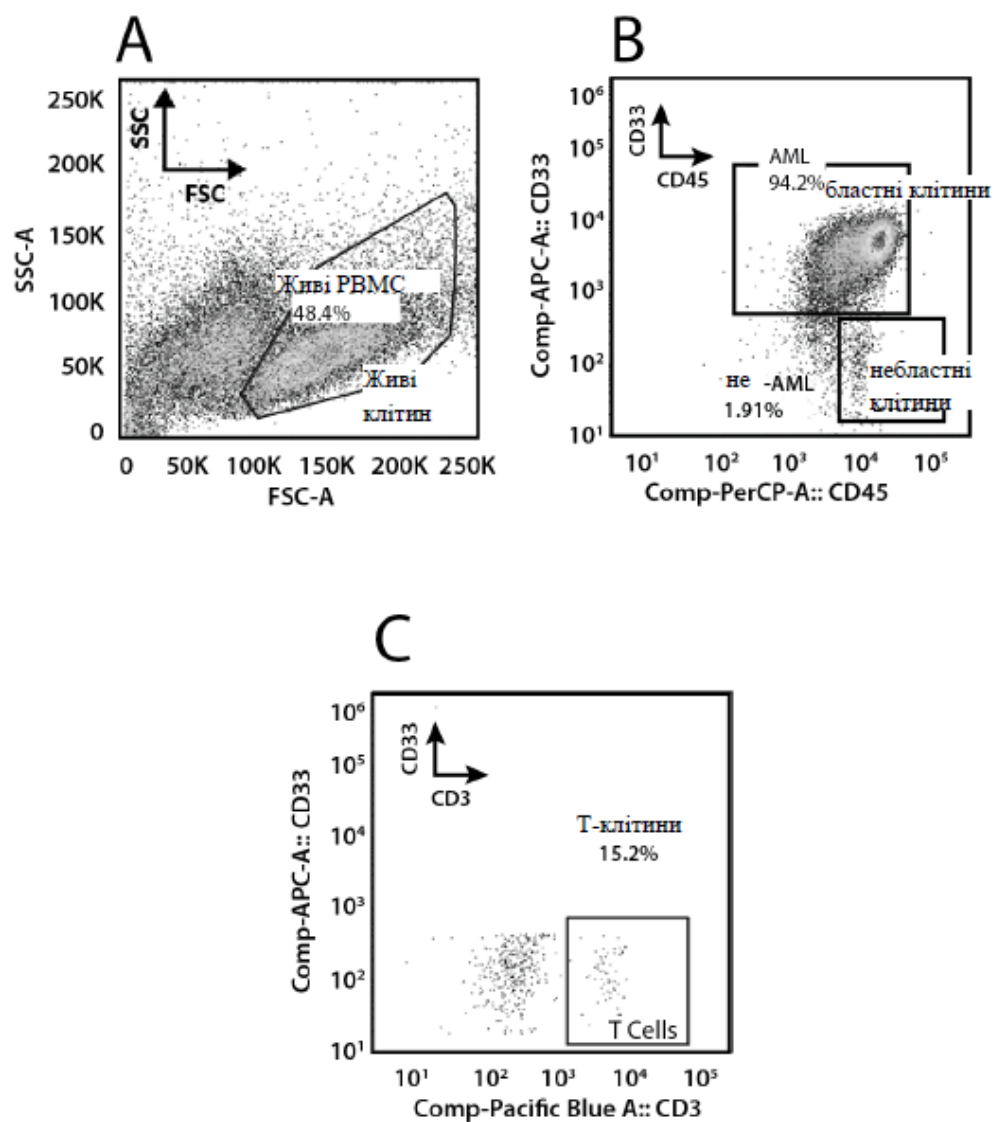


Фігура 13

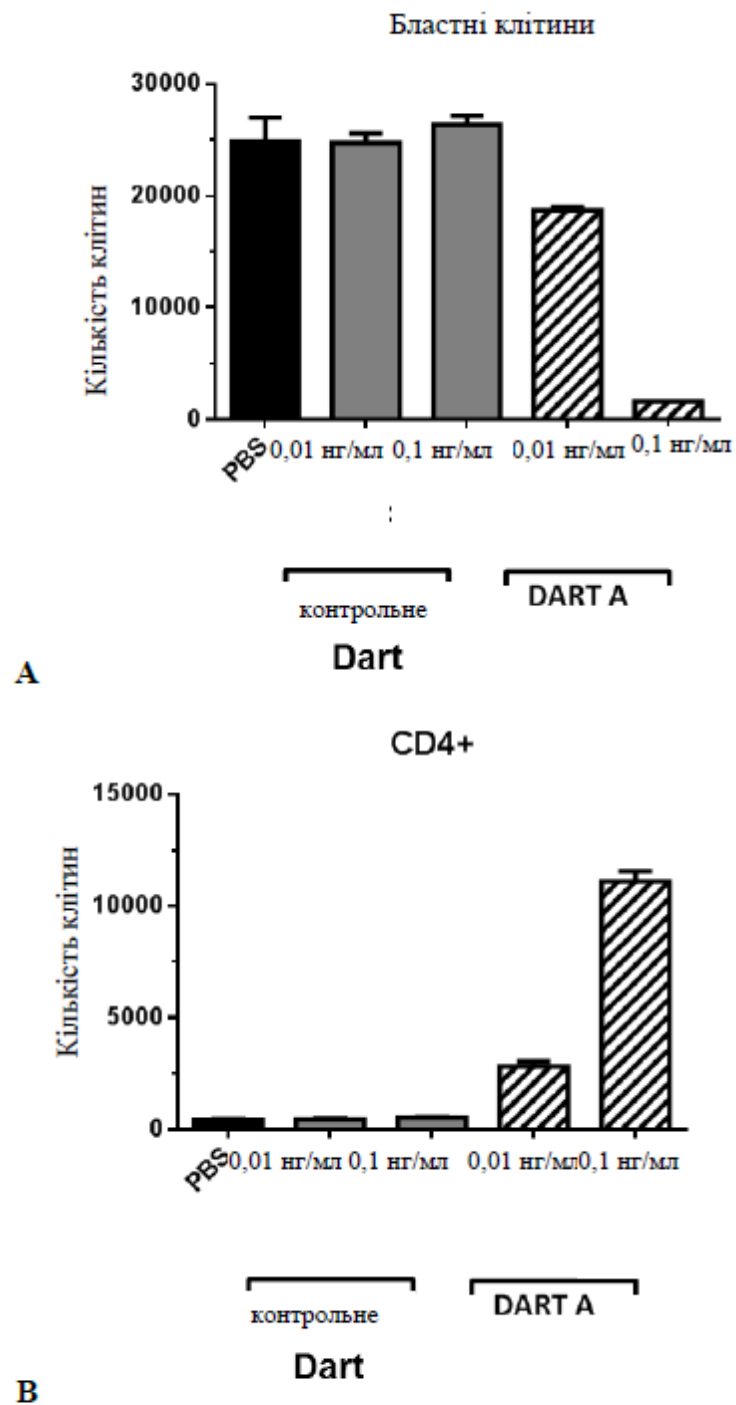




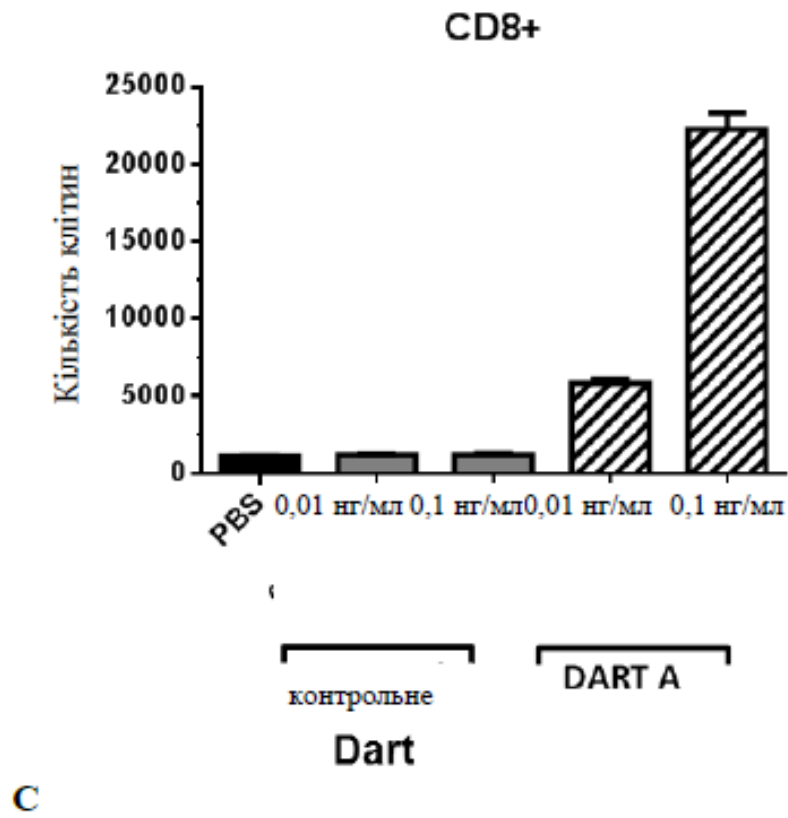




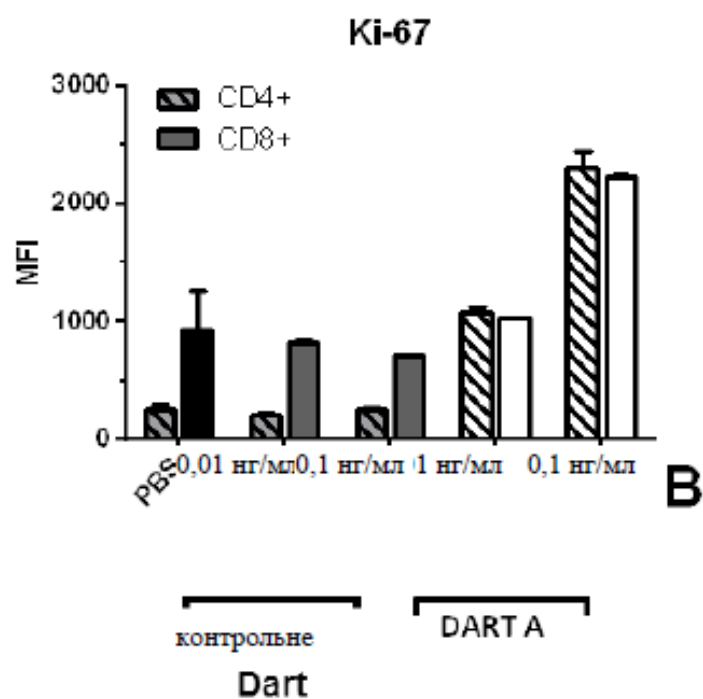
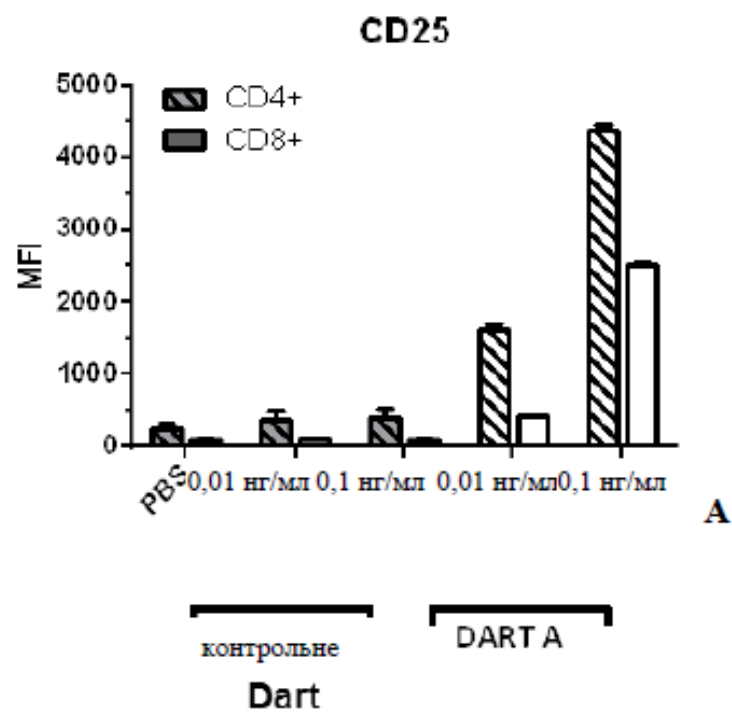
Фігура 15



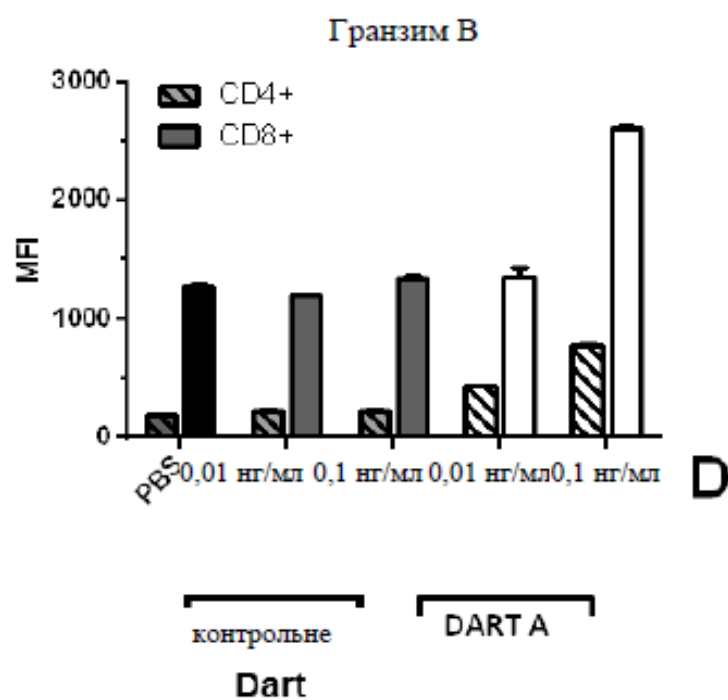
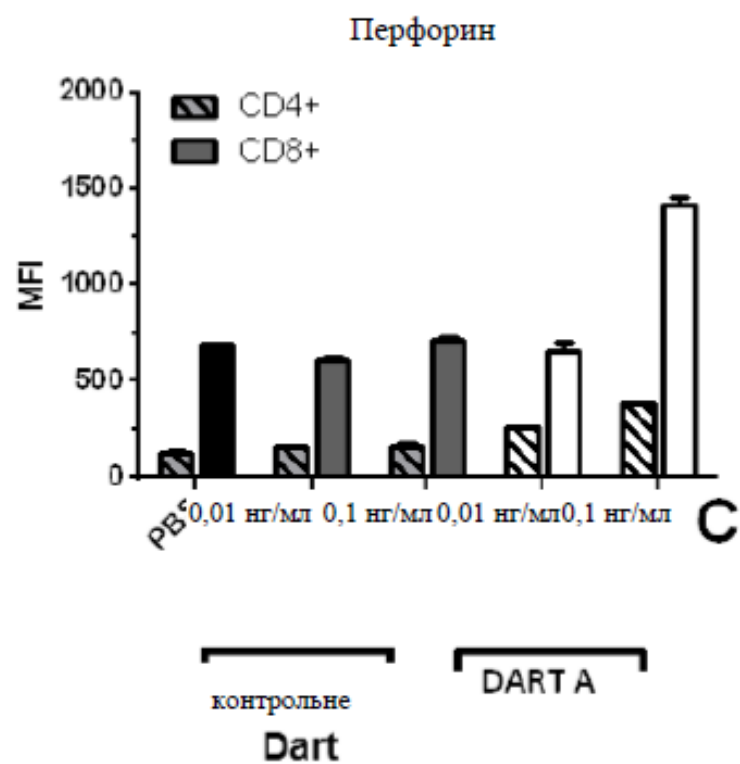
Фігура 16



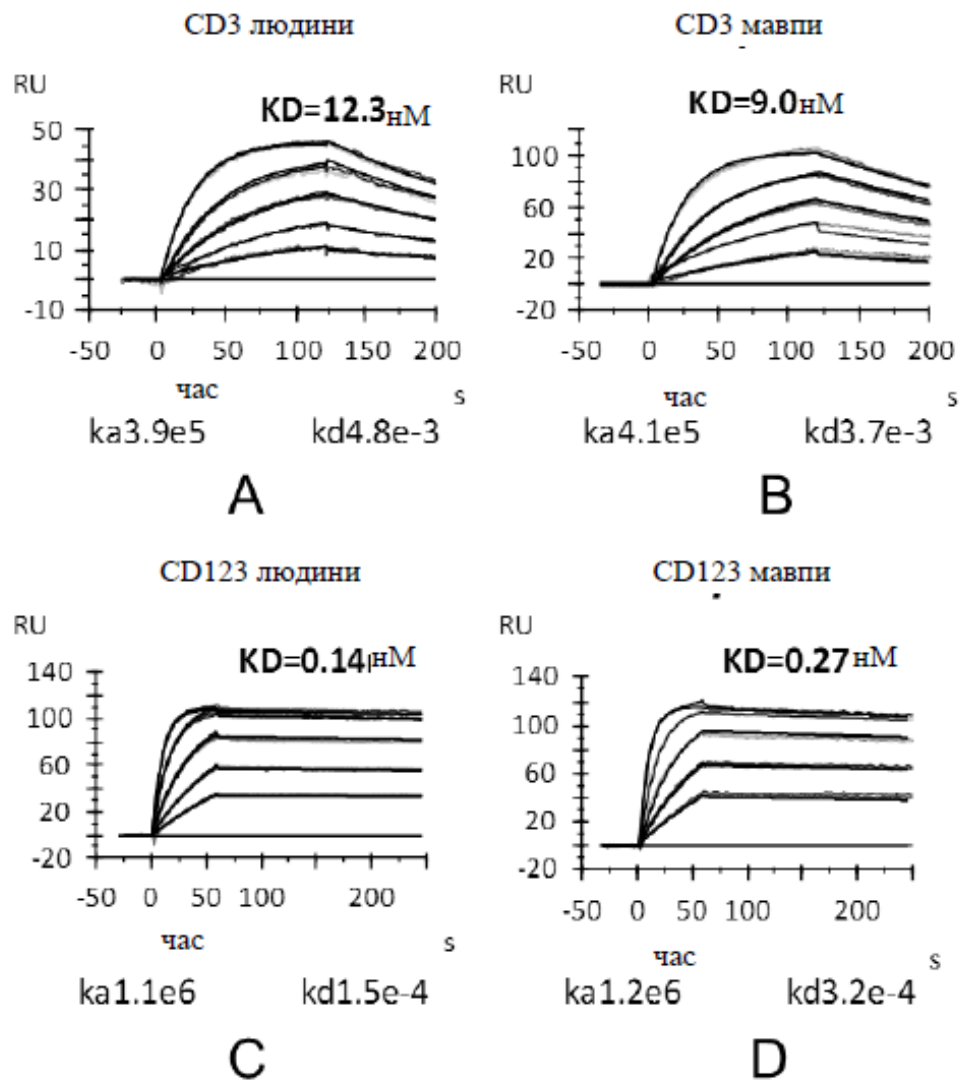
Фігура 16 (продовження)



Фігура 17

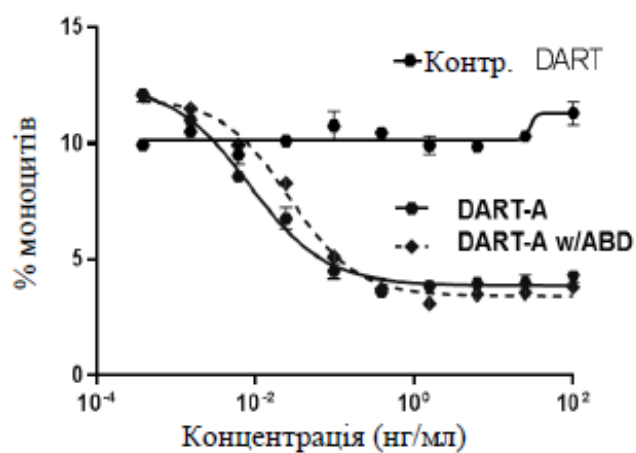


Фігура 17 (продовження)

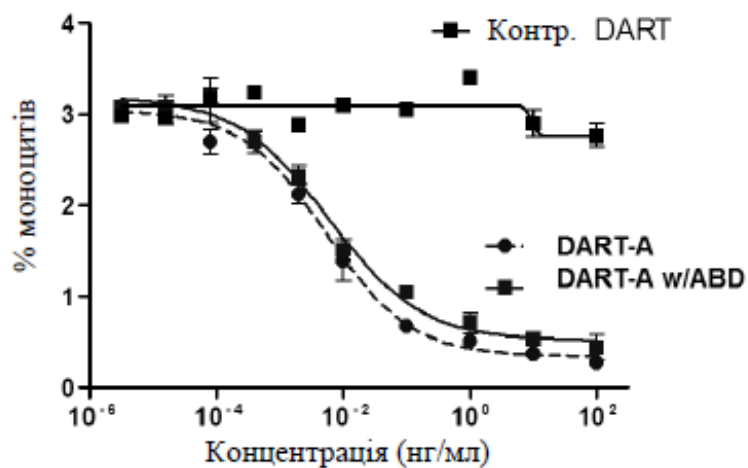


Фігура 18

А. Аутологічна деплеція моноцитів PBMC людини

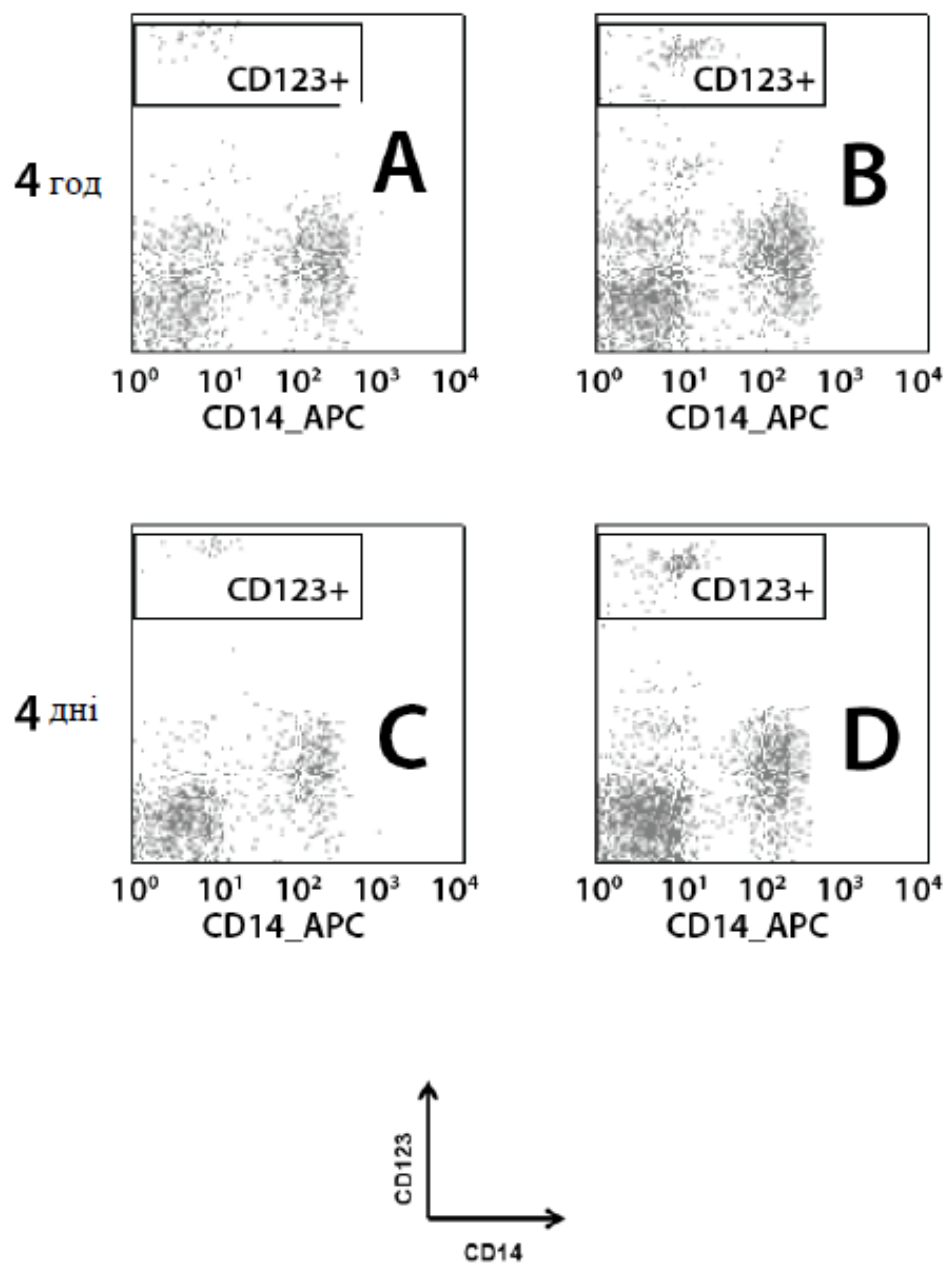


В. Аутологічна деплеція моноцитів PBMC яванської макаки

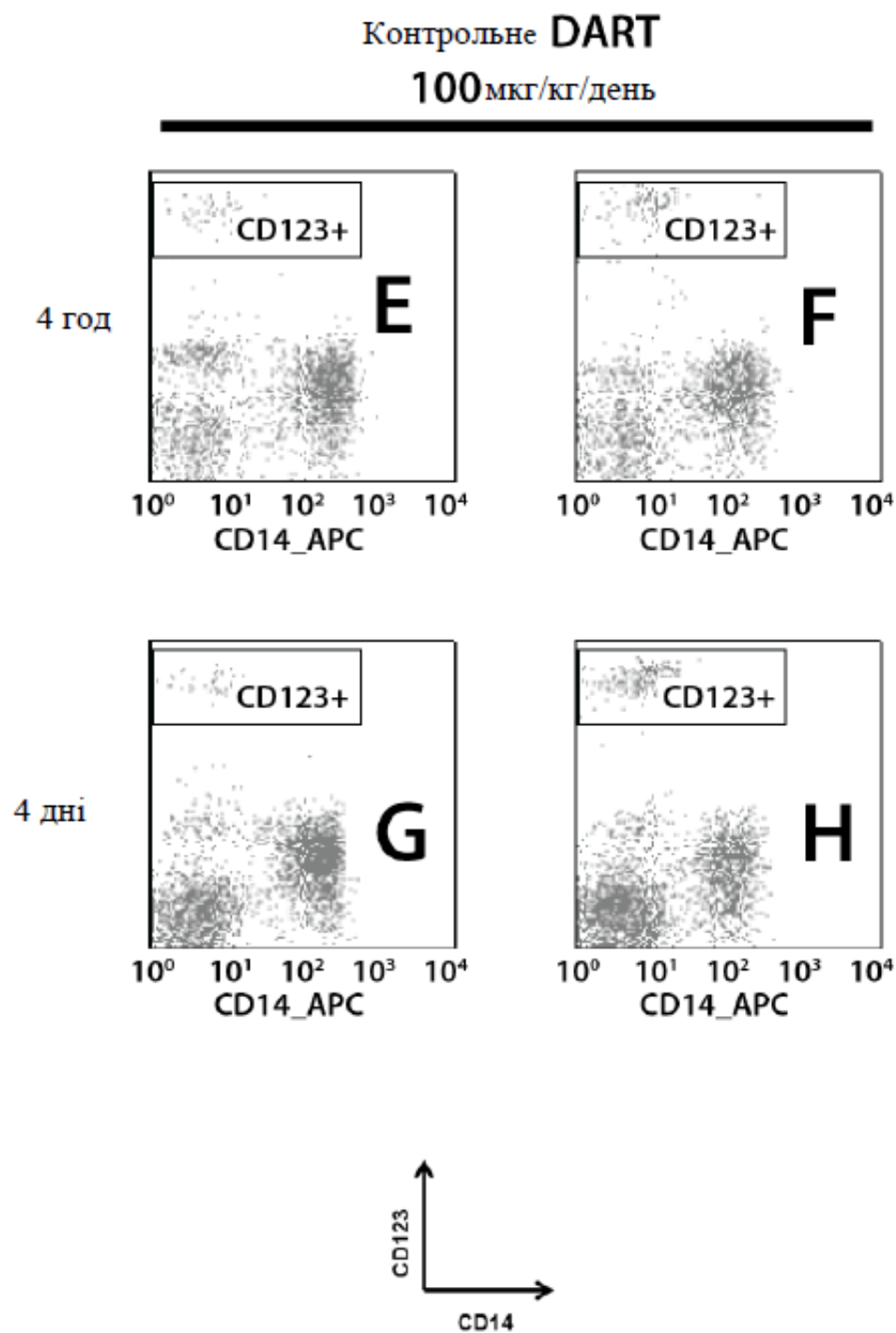


Фігура 19

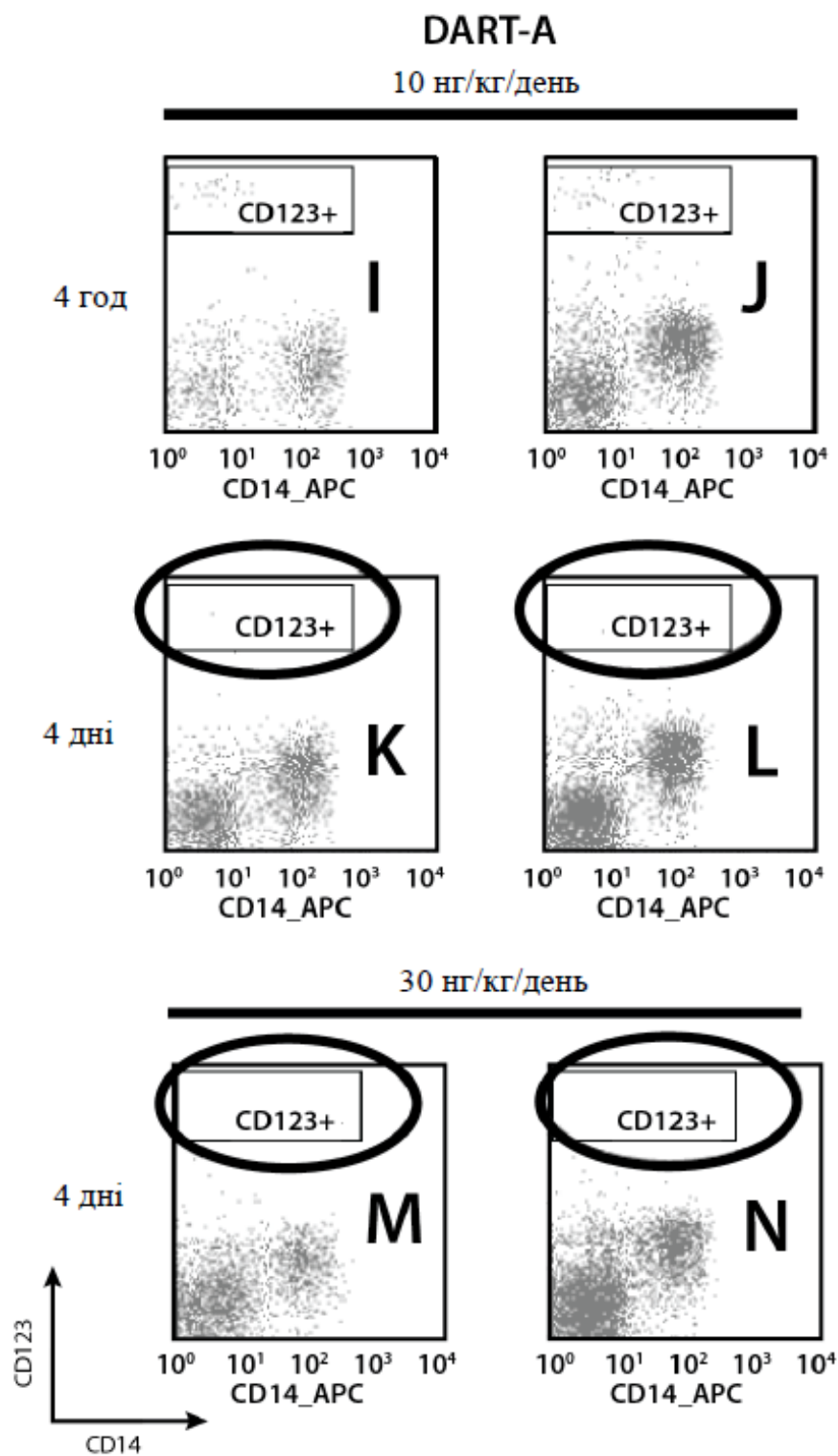
Інертний носій + наповнювач



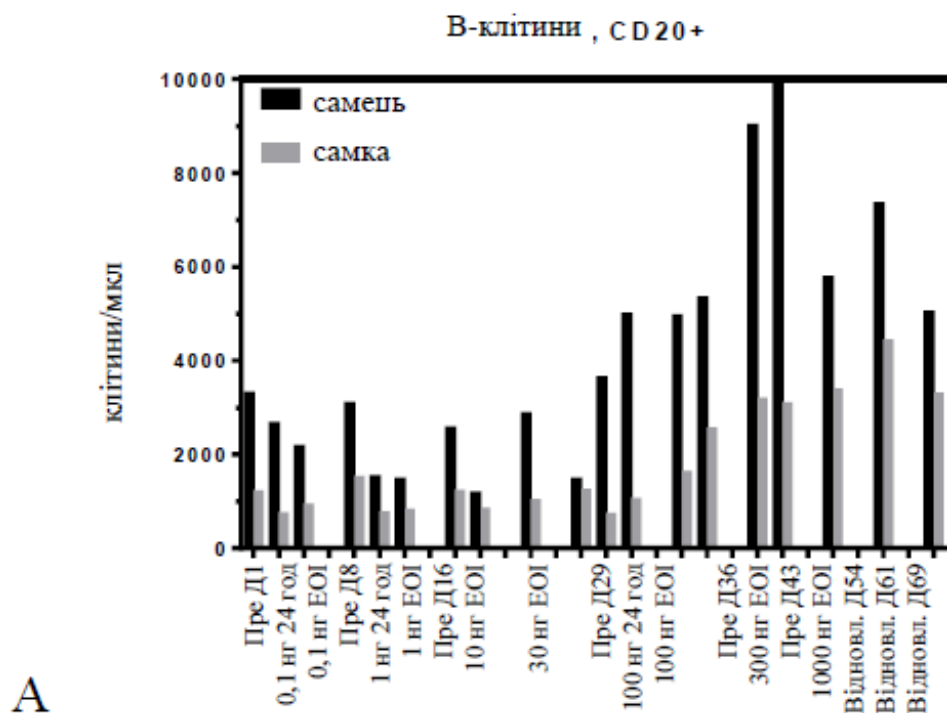
Фігура 20



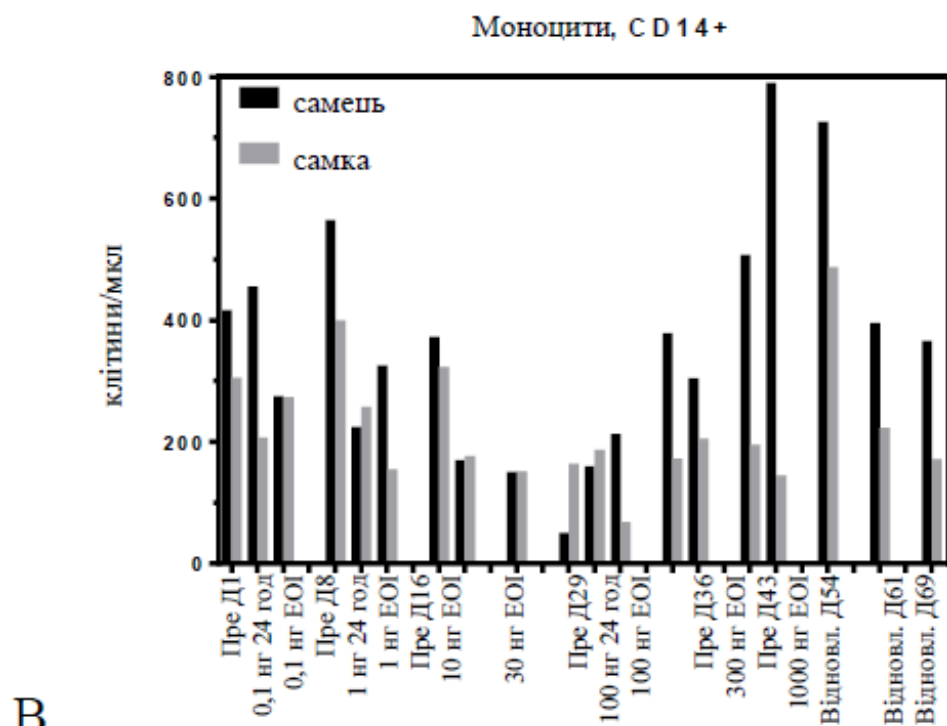
Фігура 20 (продовження)



Фігура 20 (продовження)



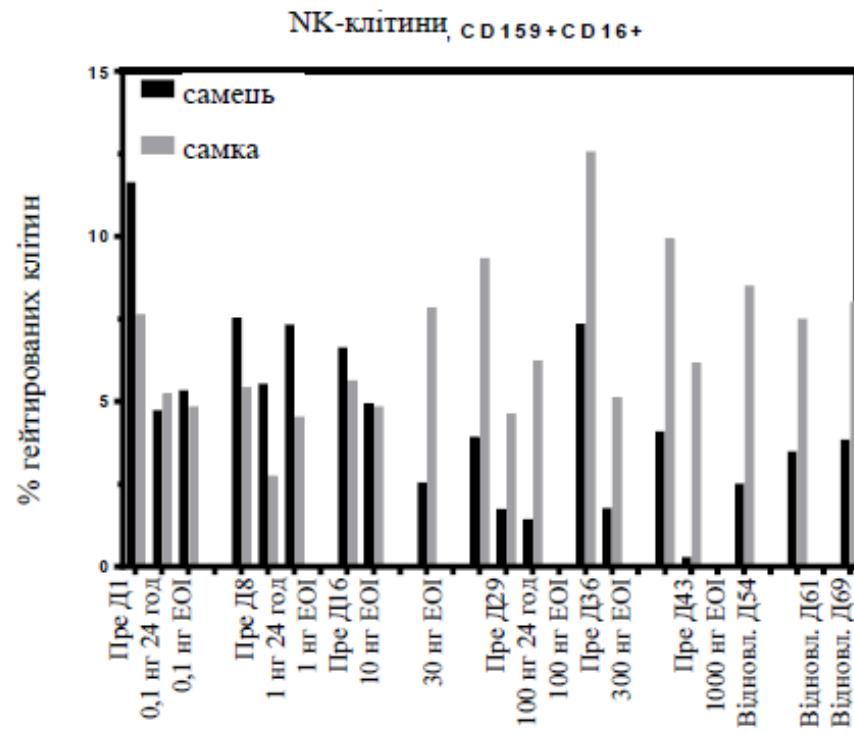
A



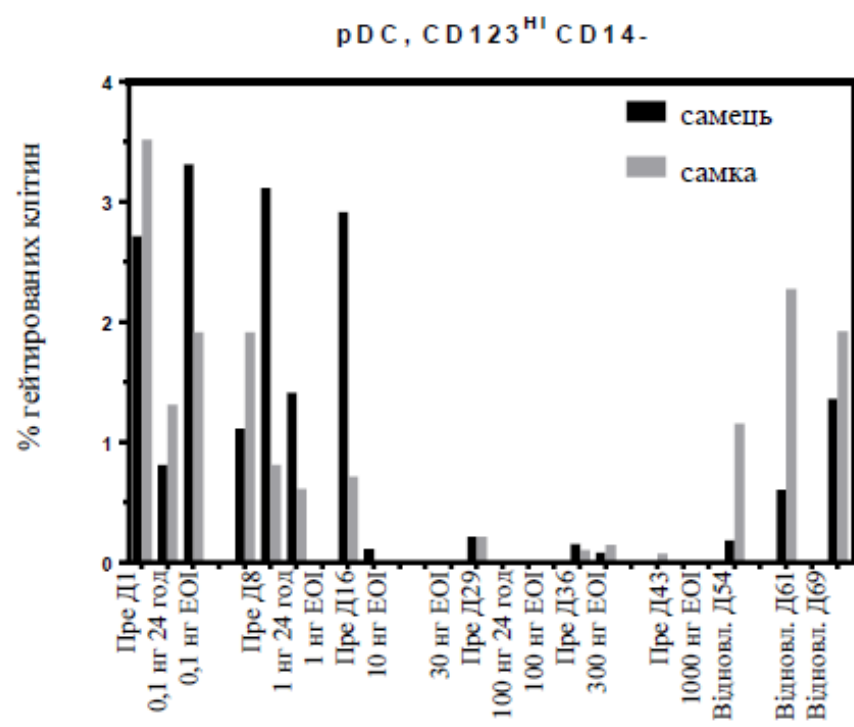
B

Фігура 21 (панелі А-В)

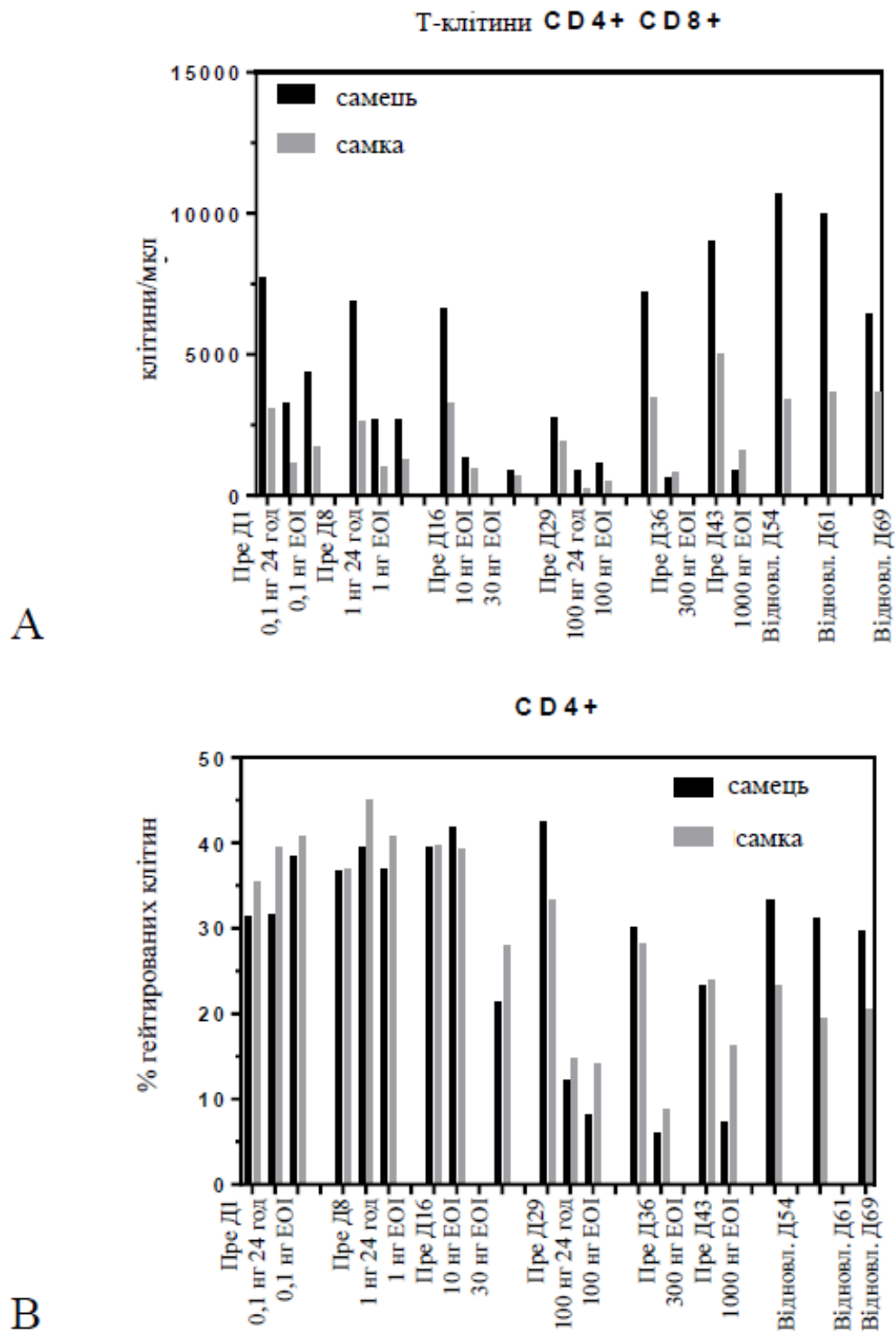
C



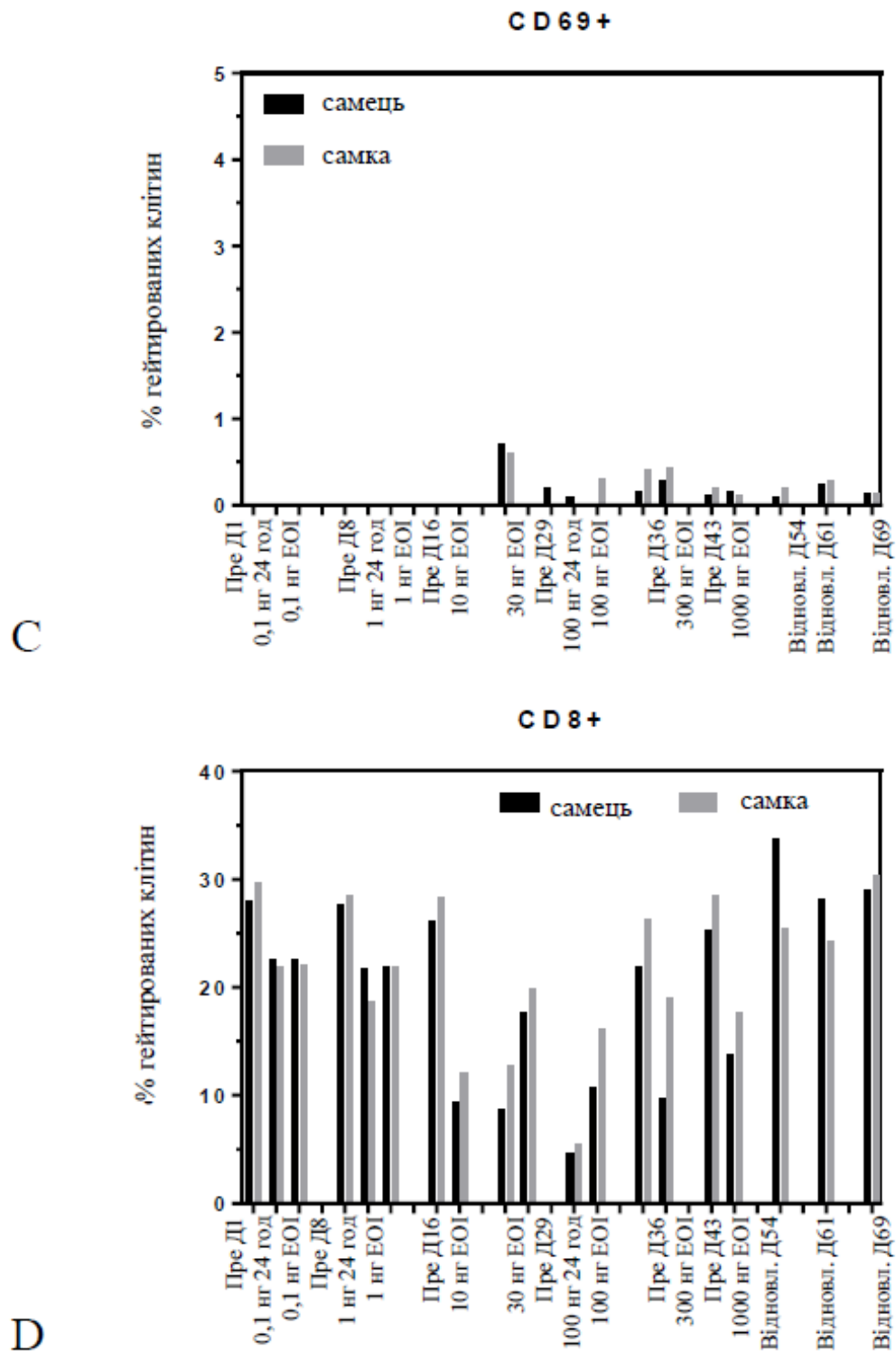
D

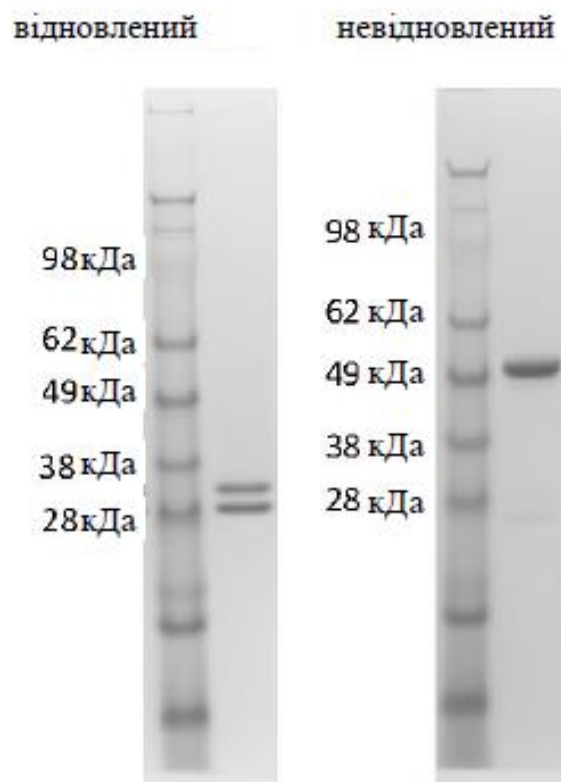


Фігура 21 (панелі C-D)

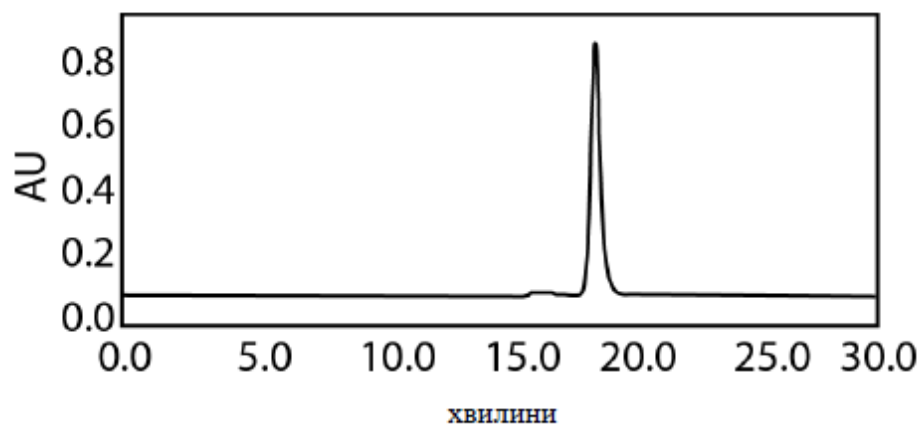


Фігура 22 (панелі А-В)

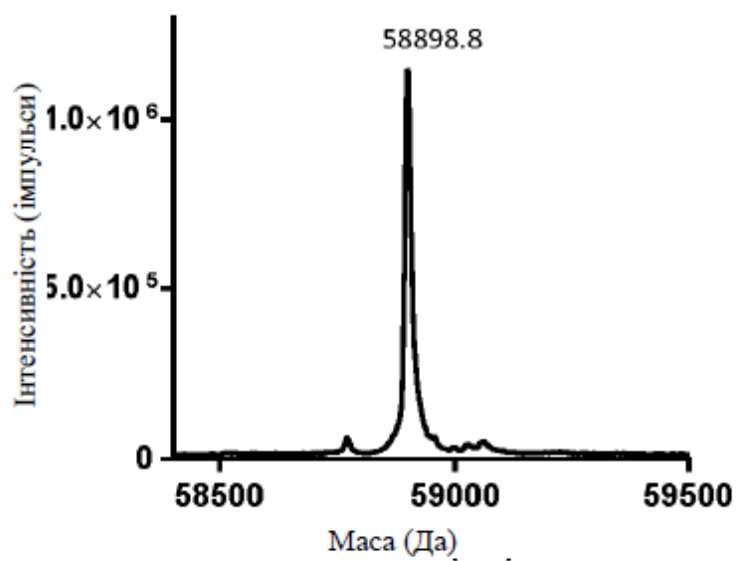




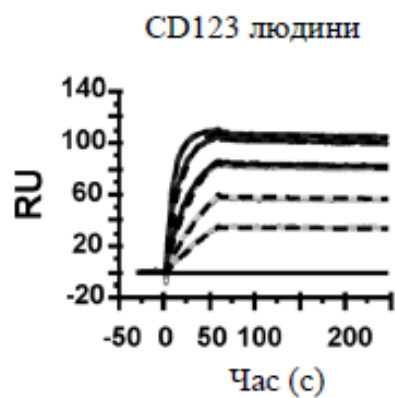
Фігура 23



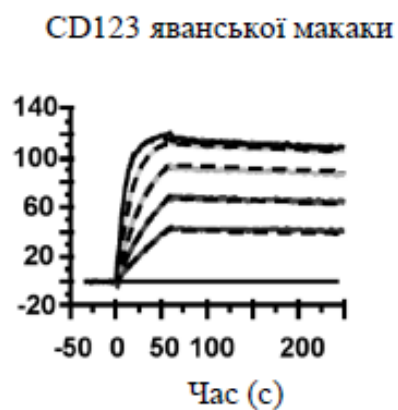
Фігура 24А



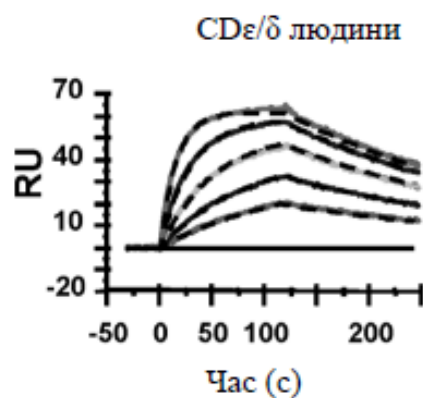
Фігура 24В



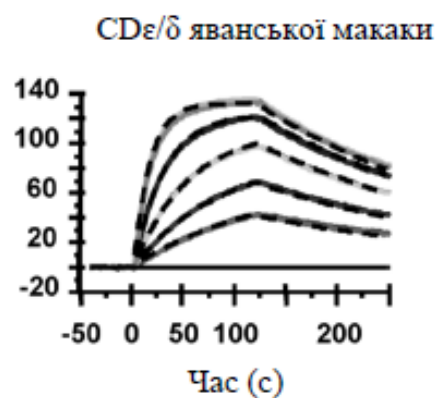
Фігура 25A



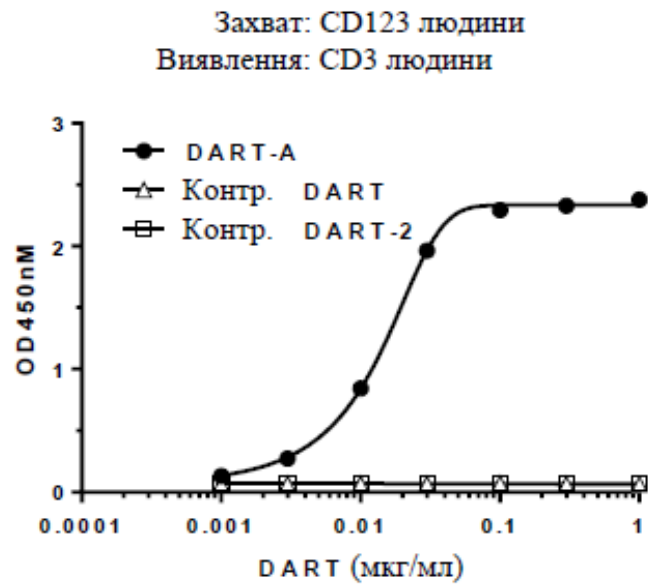
Фігура 25B



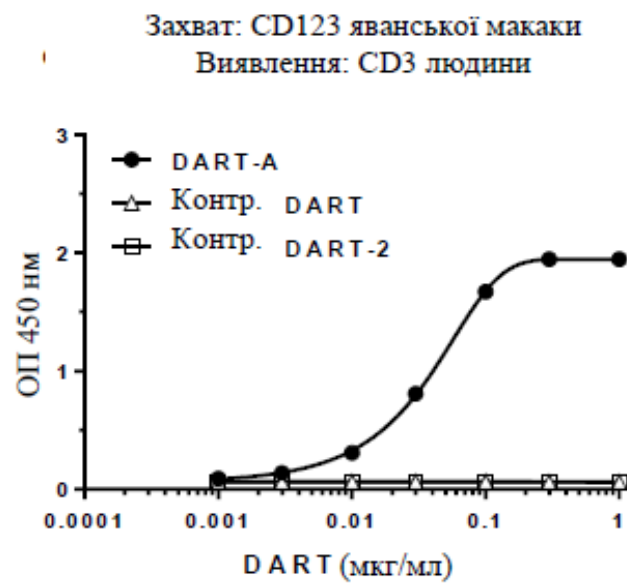
Фігура 25C



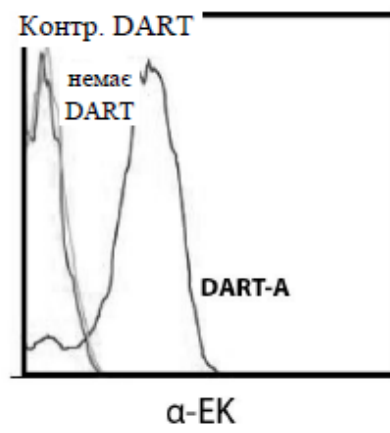
Фігура 25D



Фігура 26А

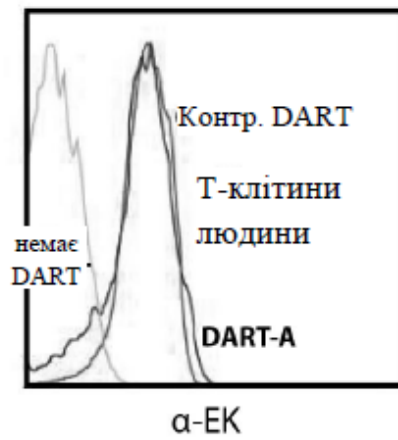


Фігура 26В



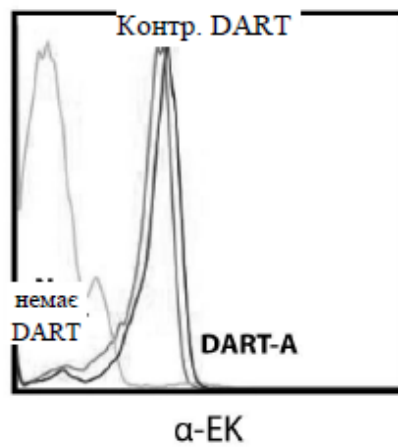
Molm-13

Фігура 26C



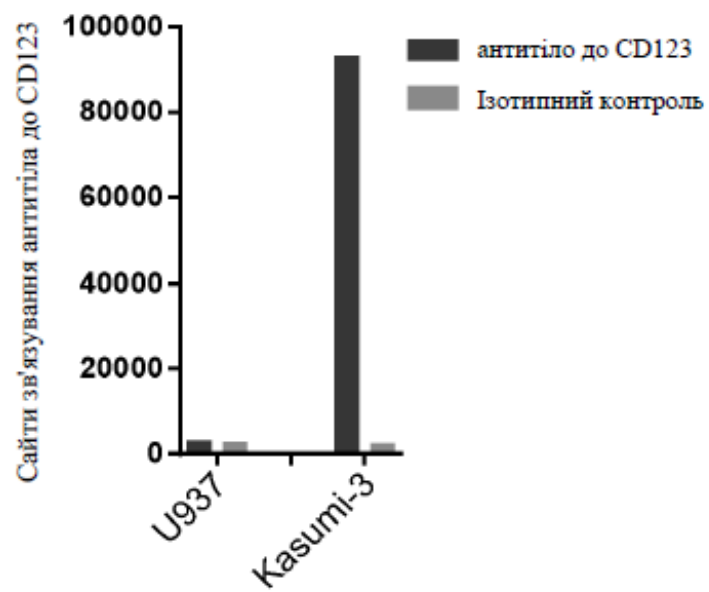
T- клітини людини

Фігура 26B

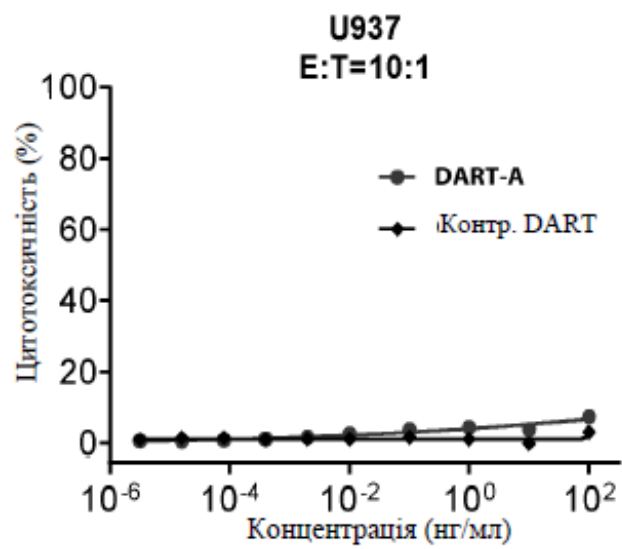


**T-клітини яванської
макаки**

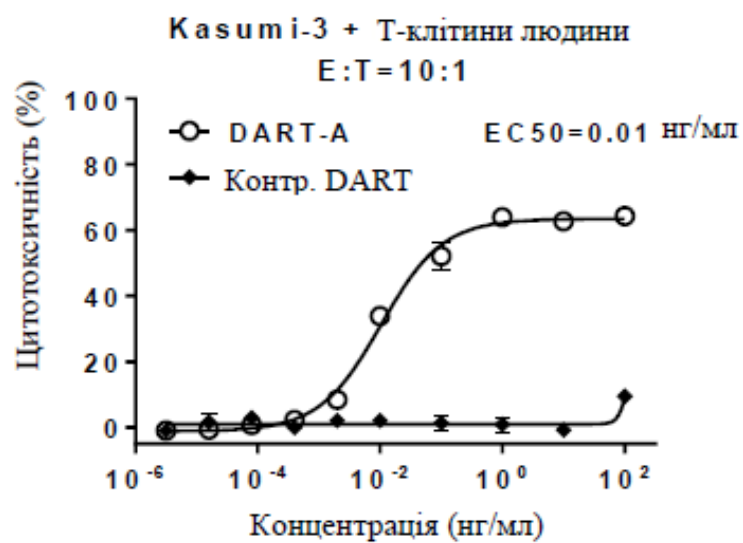
Фігура 26E



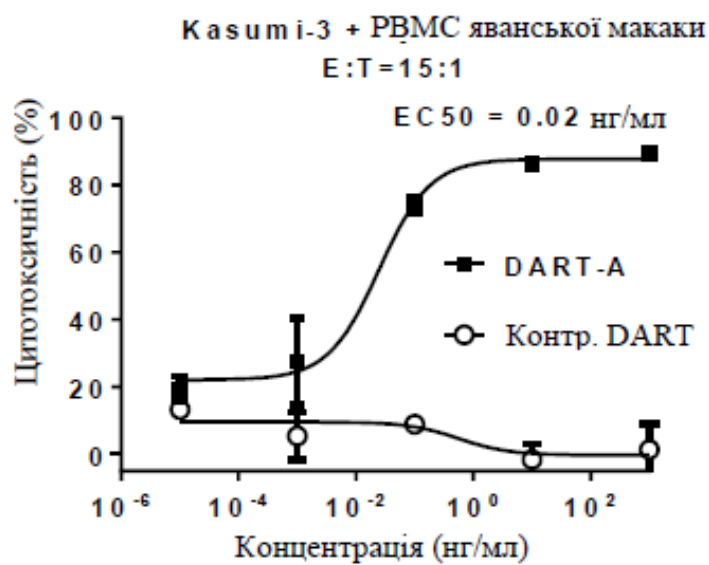
Фігура 27А



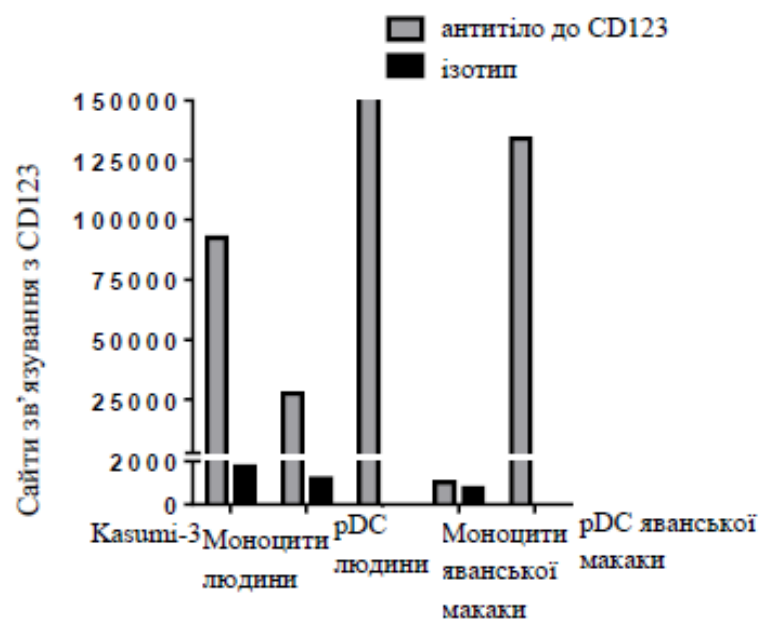
Фігура 27В



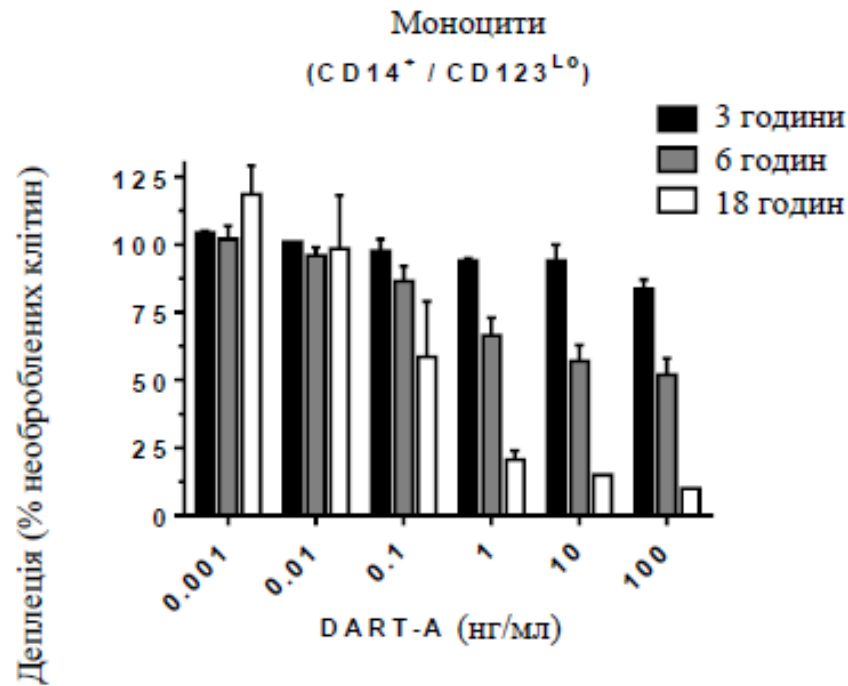
Фігура 27C



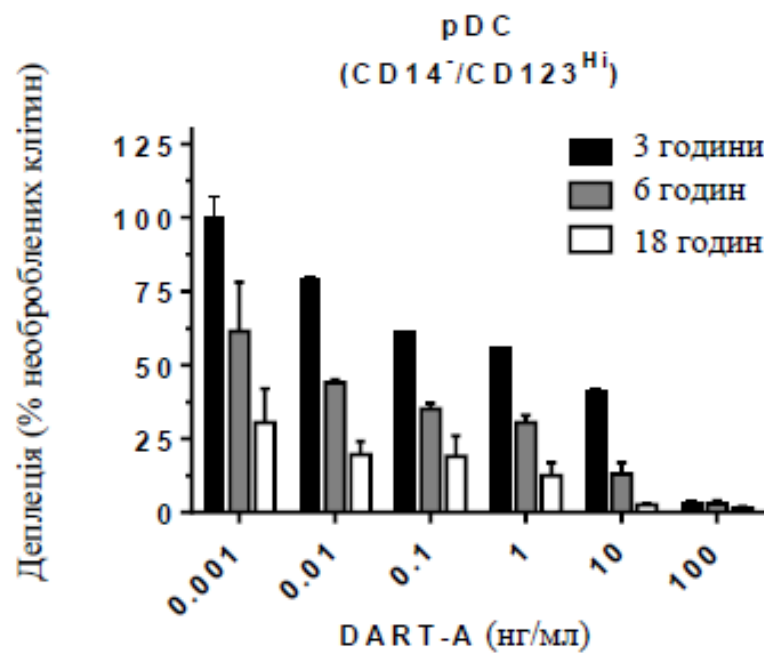
Фігура 27D



Фігура 27Е

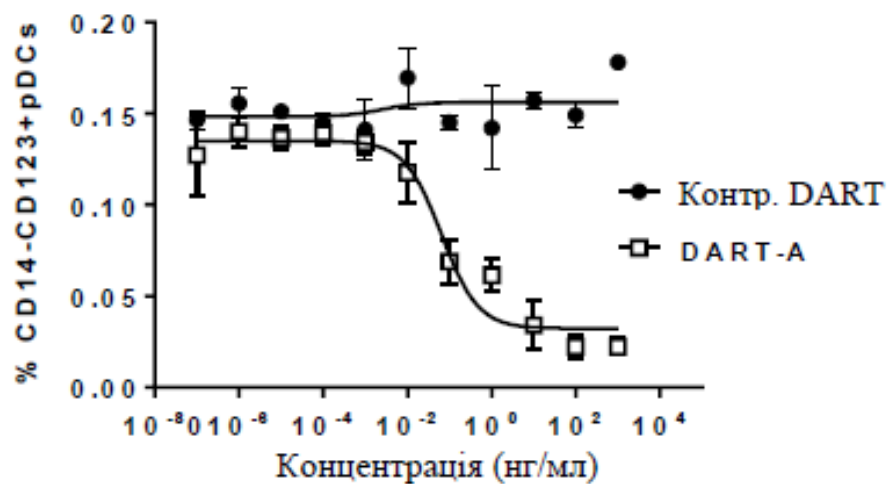


Фігура 27F

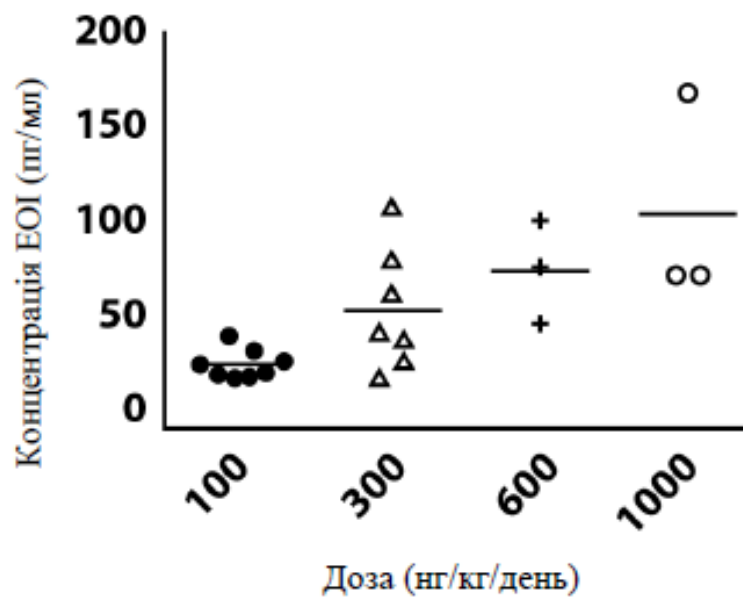


Фігура 27G

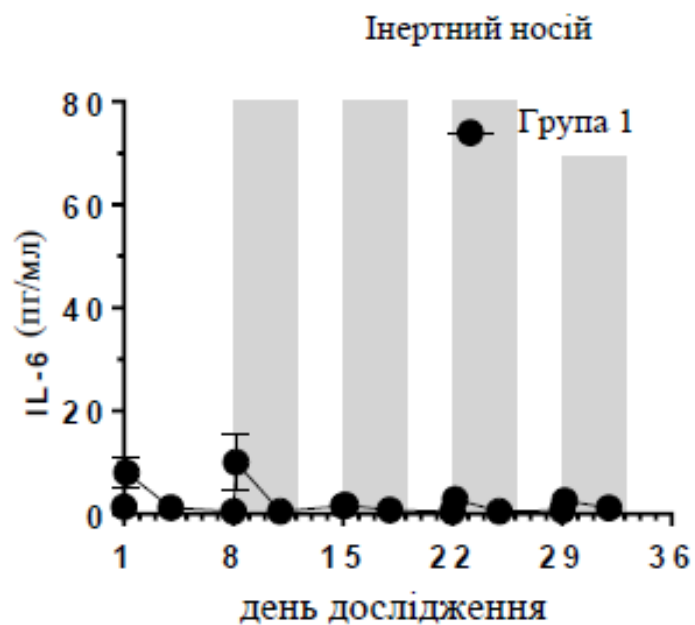
РВМС яванської макаки окремо
(FACS)



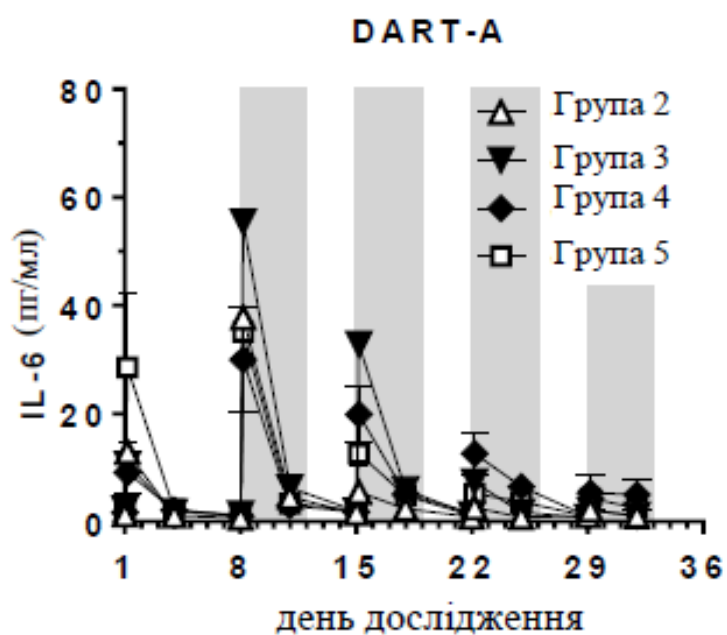
Фігура 27Н



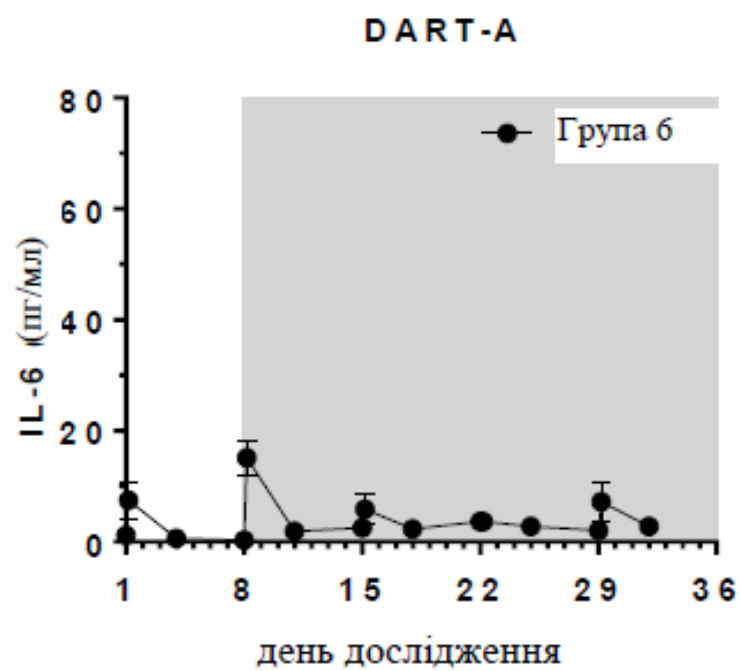
Фігура 28



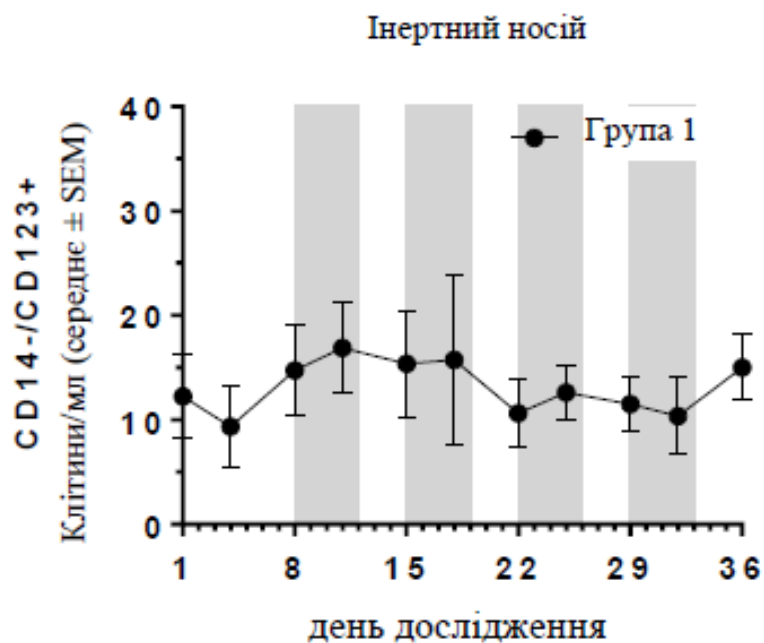
Фігура 29А



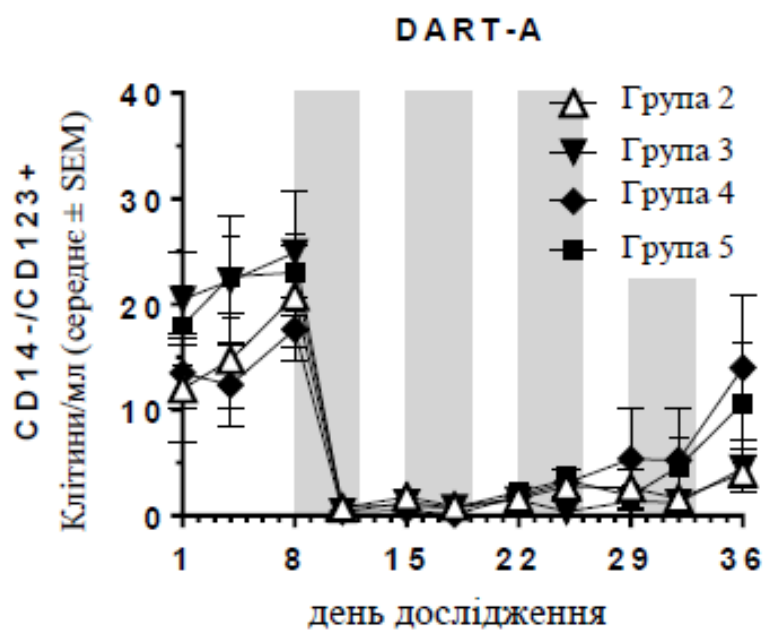
Фігура 29В



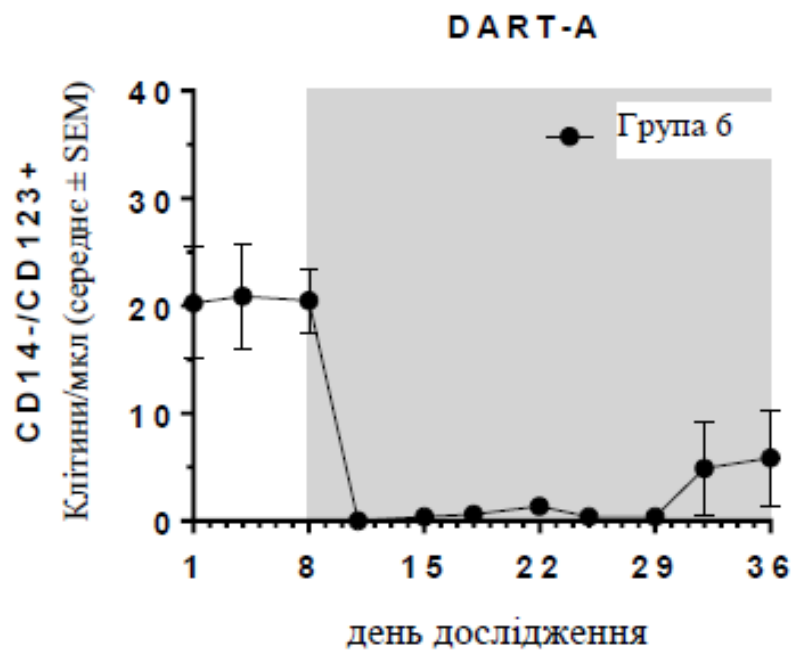
Фігура 29С



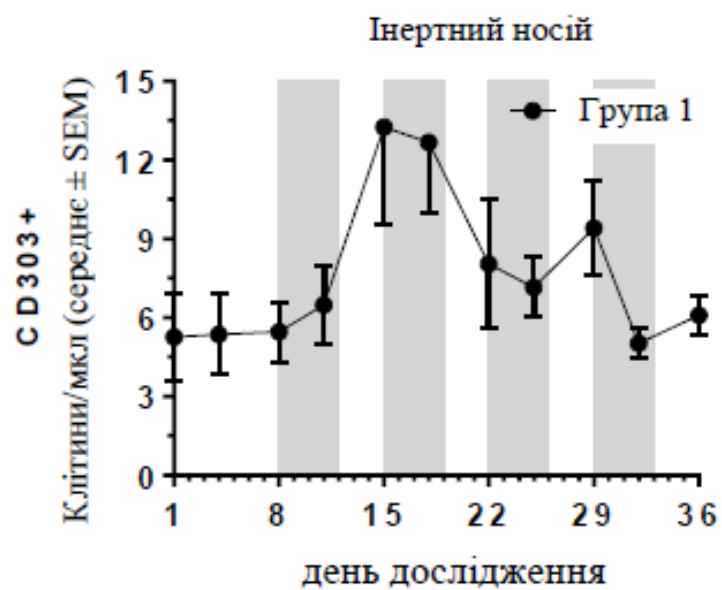
Фігура 30А



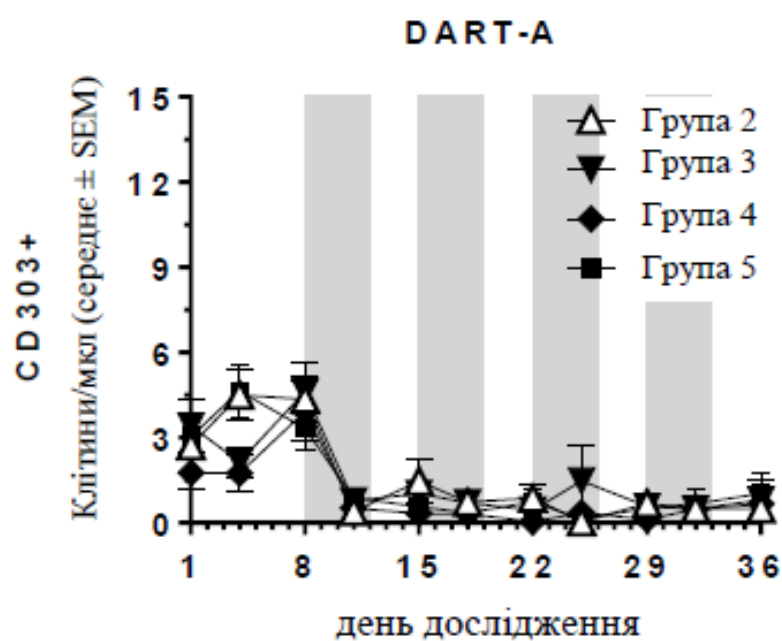
Фігура 30В



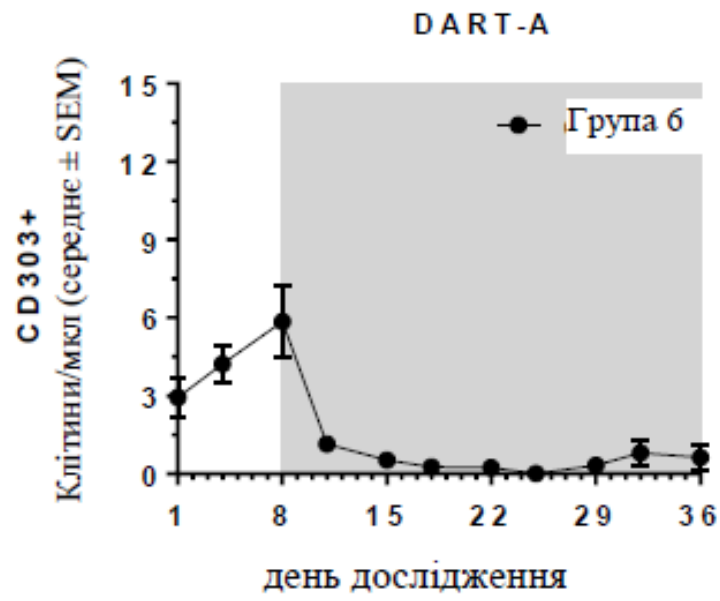
Фігура 30С



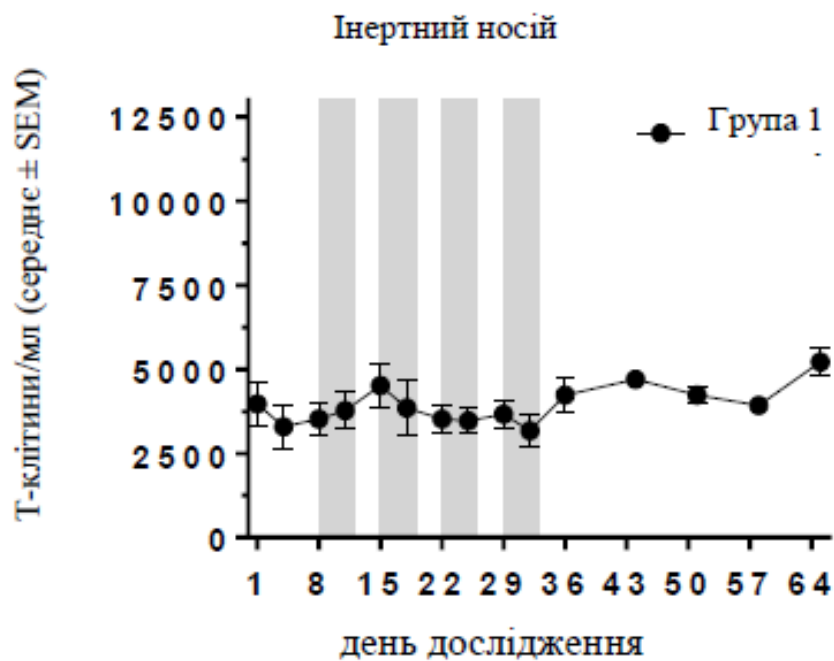
Фігура 30D



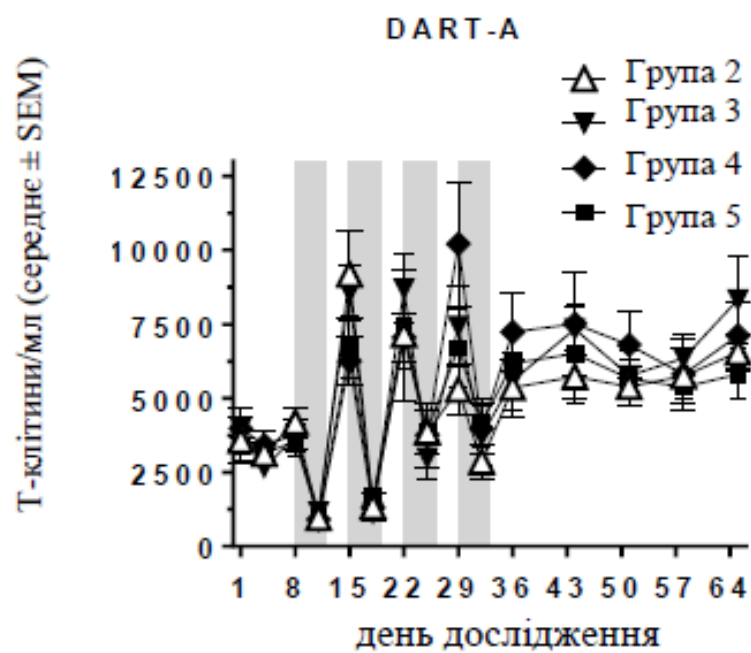
Фігура 30E



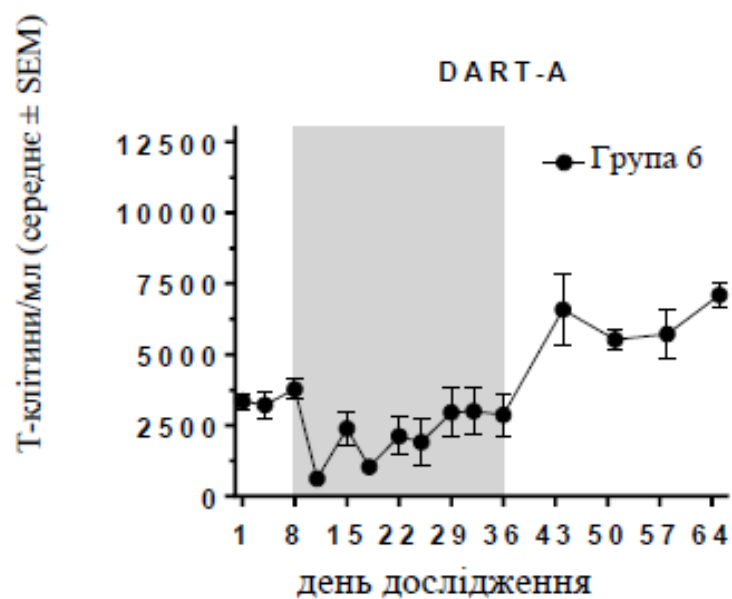
Фігура 30F



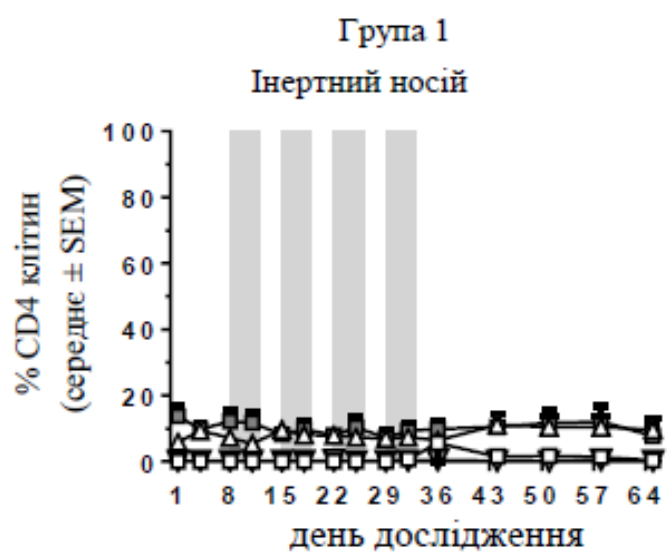
Фігура 31А



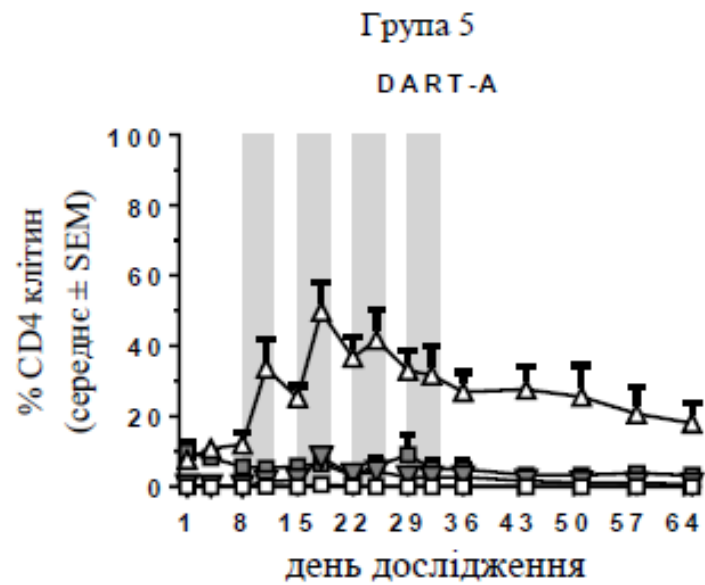
Фігура 31В



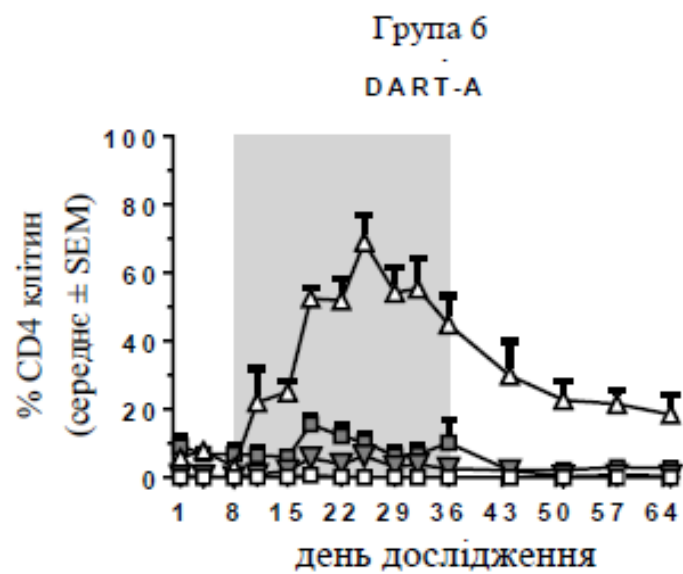
Фігура 31C



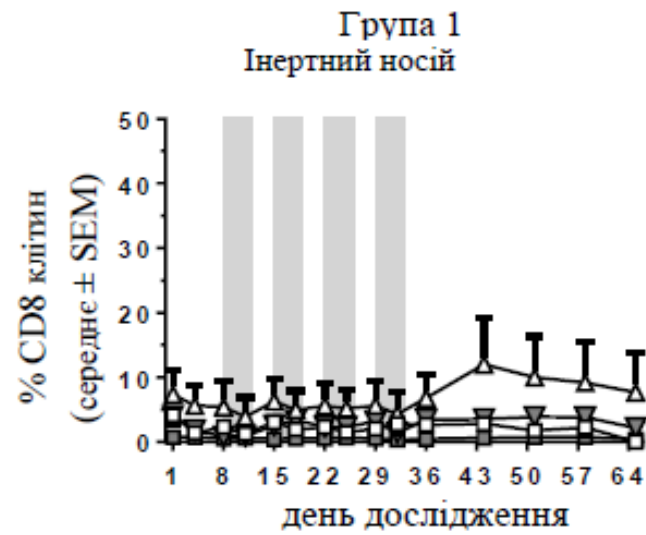
Фігура 31D



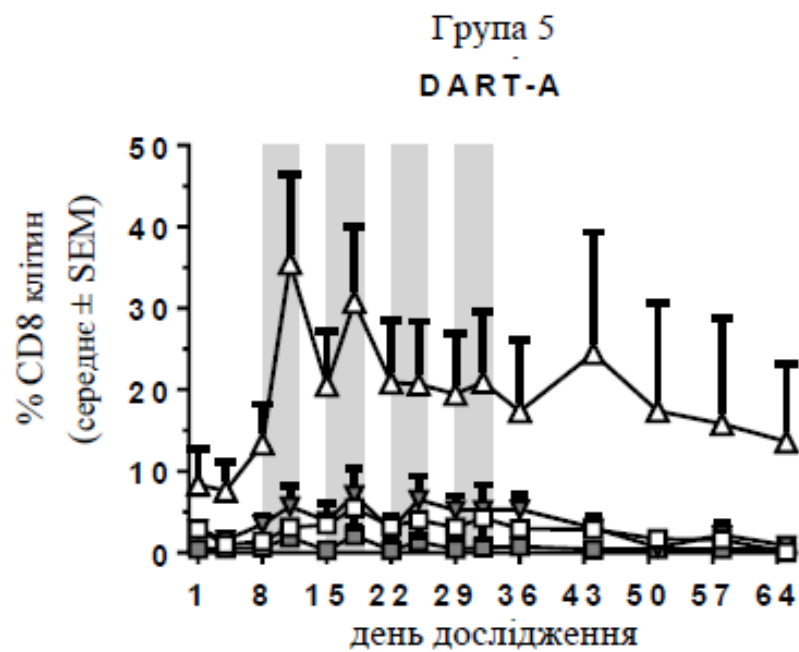
Фігура 31Е



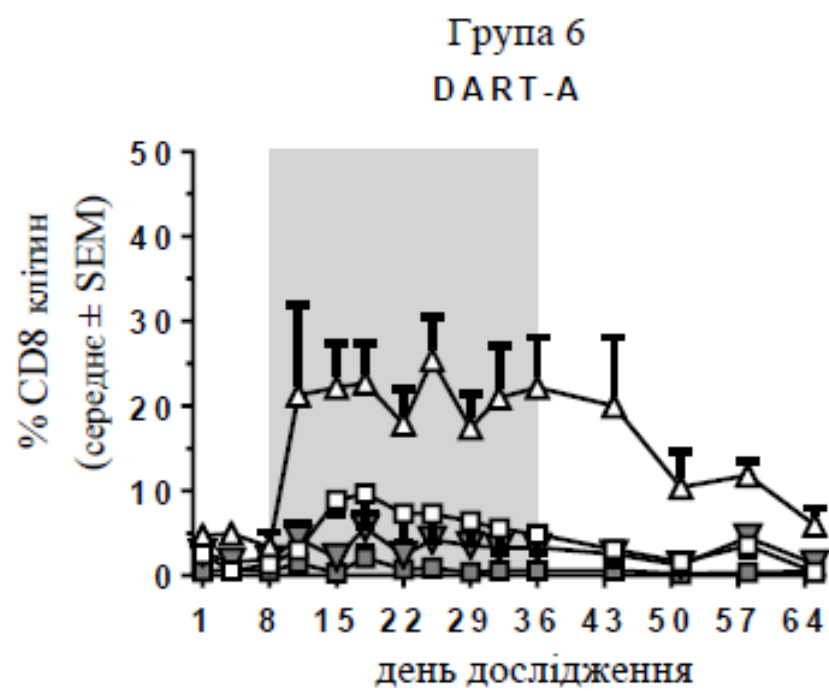
Фігура 31F



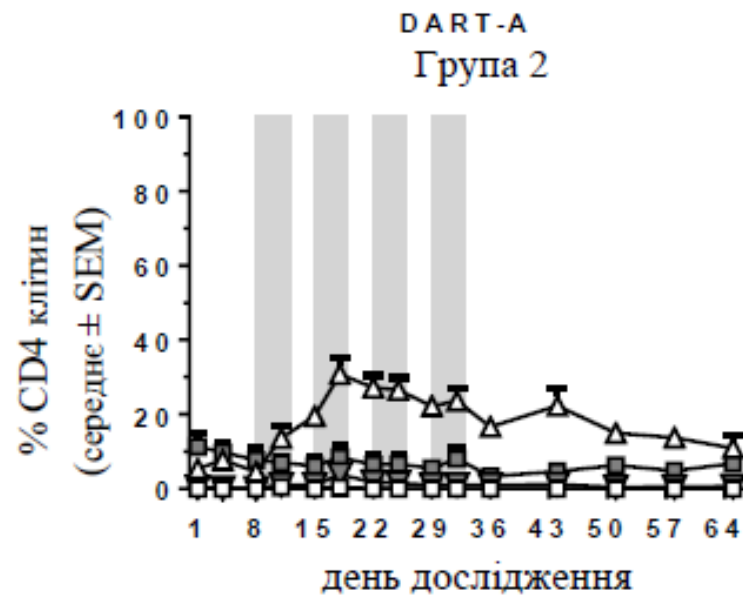
Фігура 31G



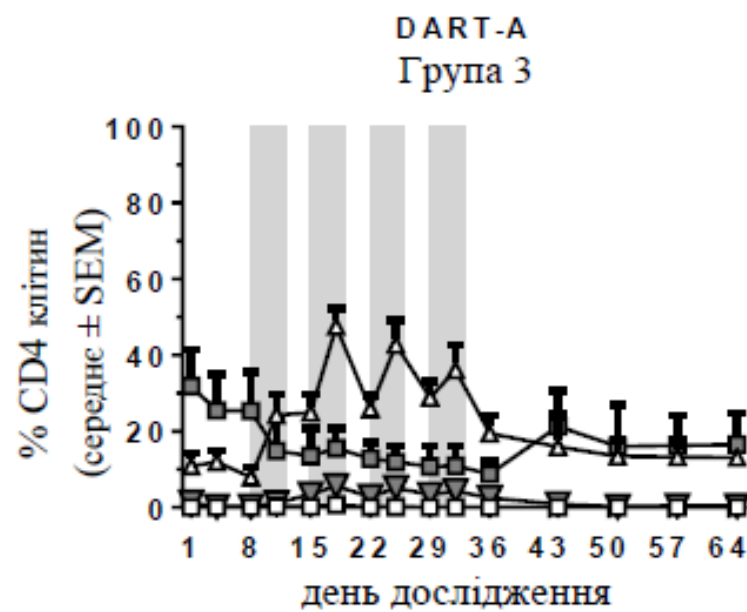
Фігура 31H



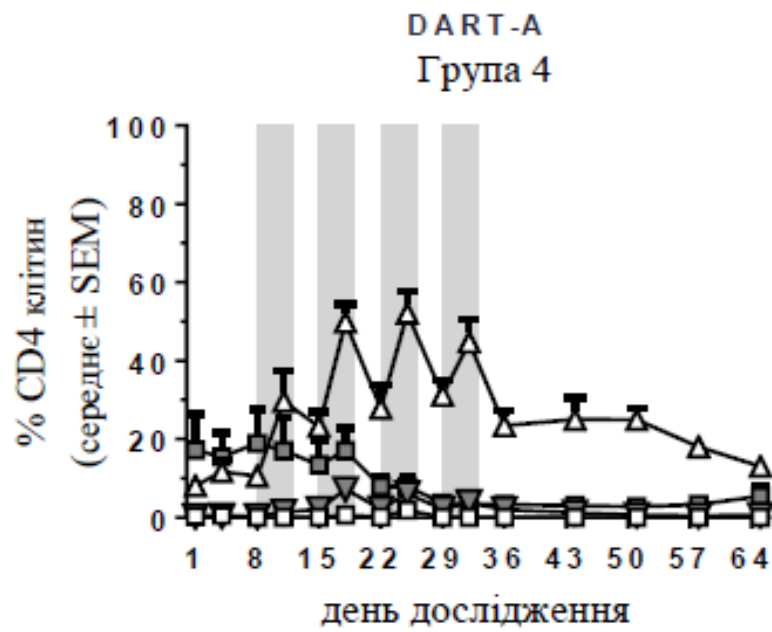
Фігура 31I



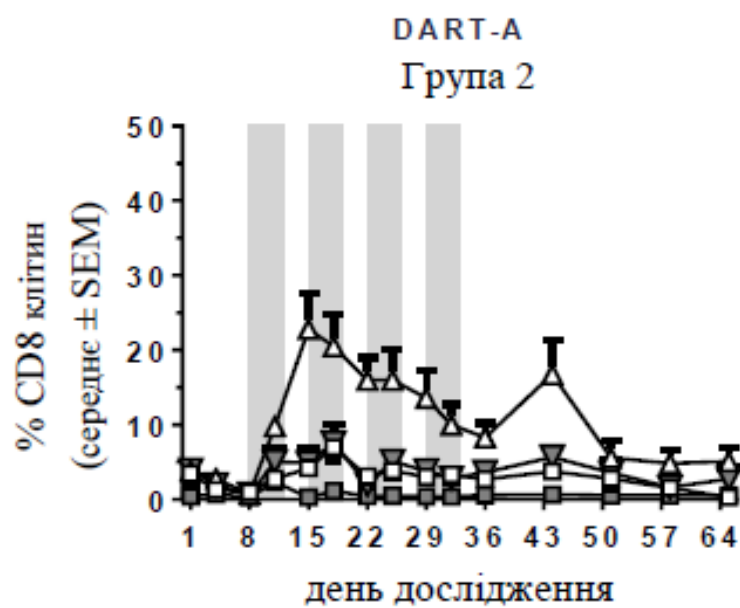
Фігура 32А



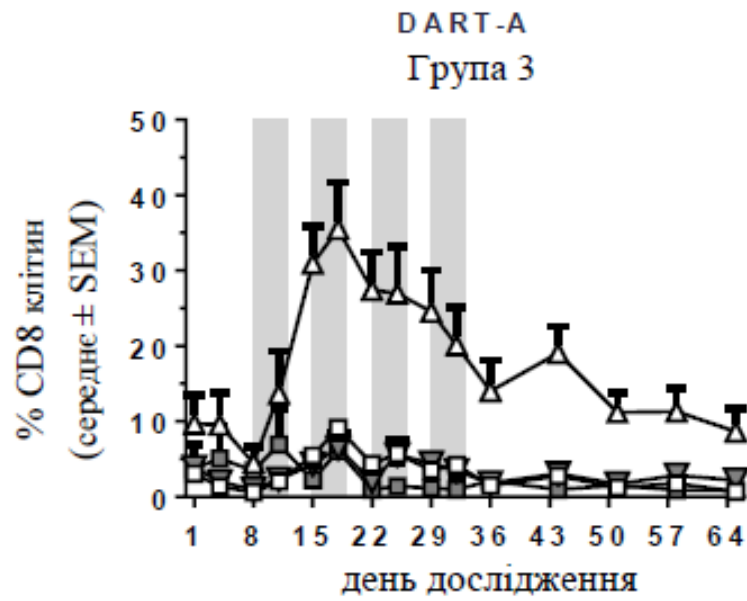
Фігура 32В



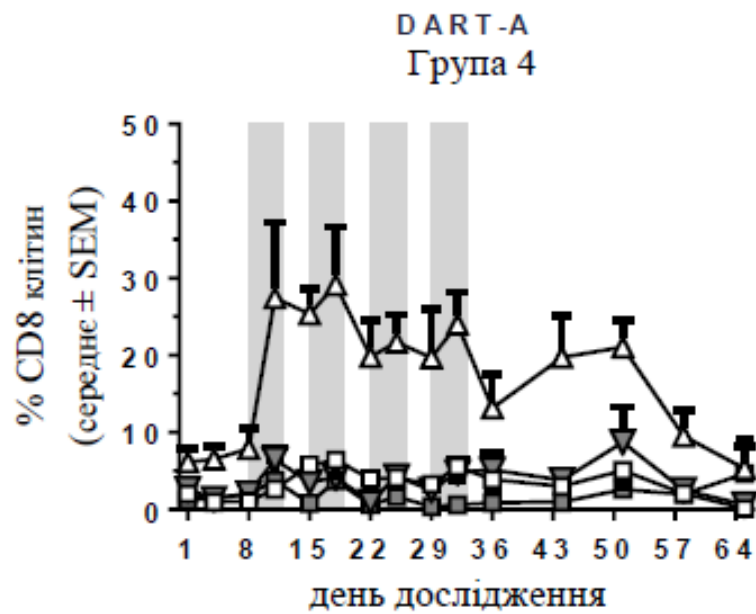
Фігура 32C



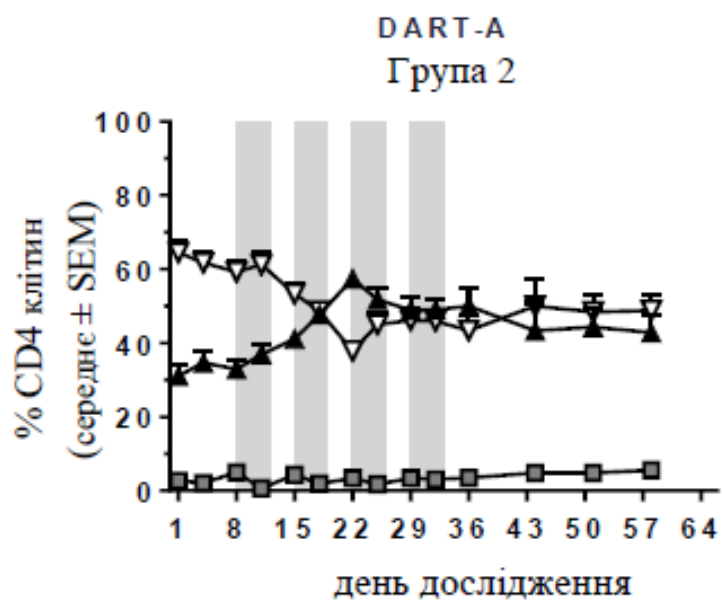
Фігура 32D



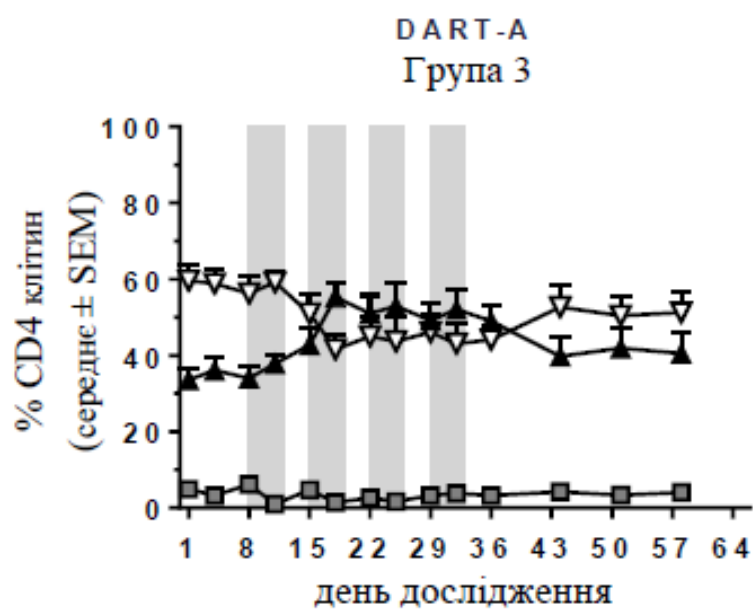
Фігура 32Е



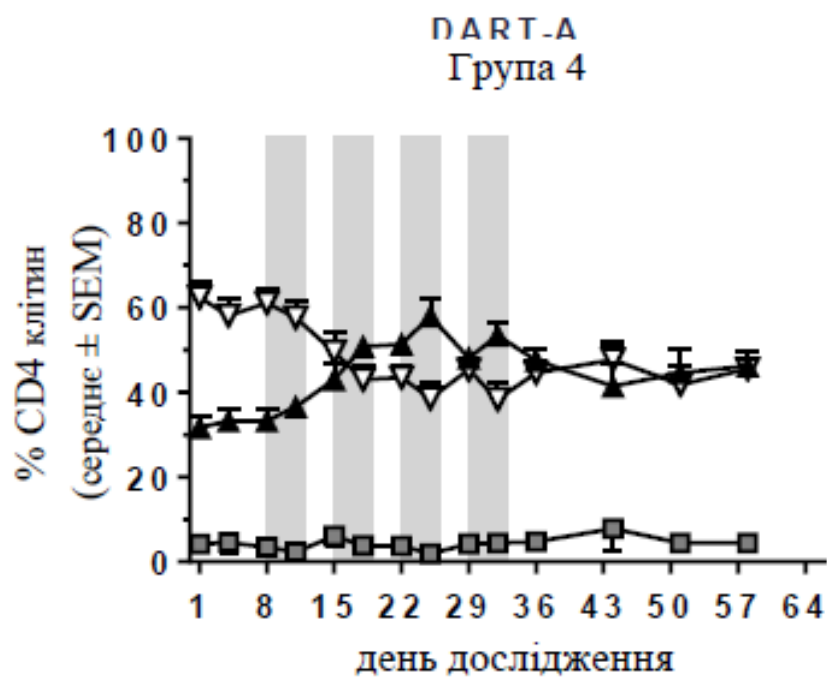
Фігура 32F



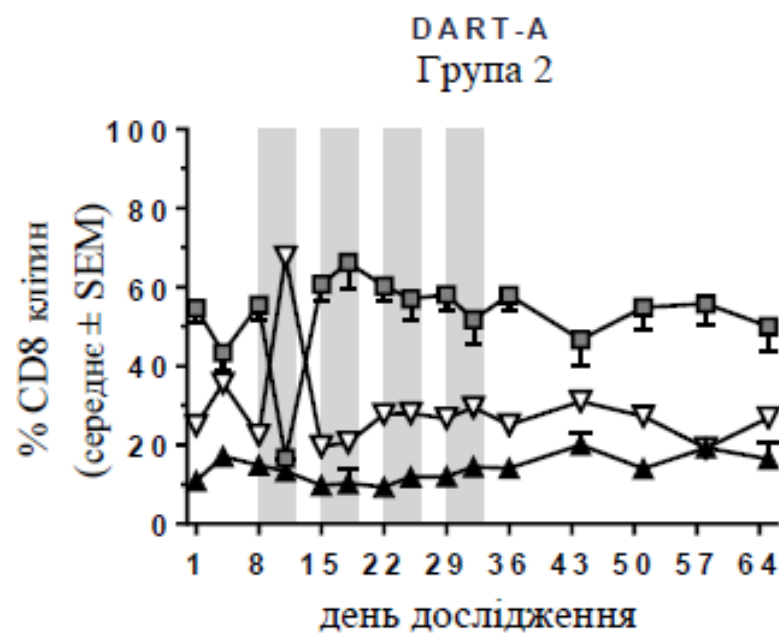
Фігура 33А



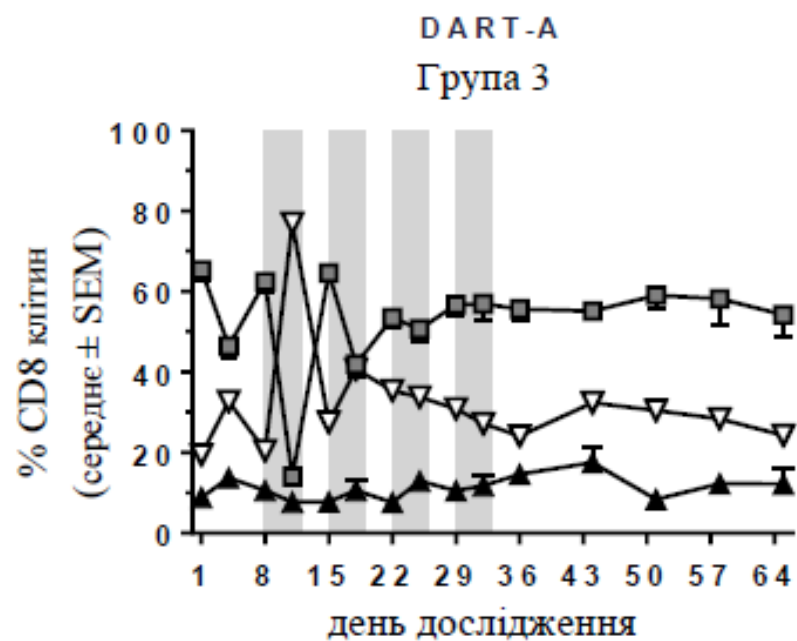
Фігура 33В



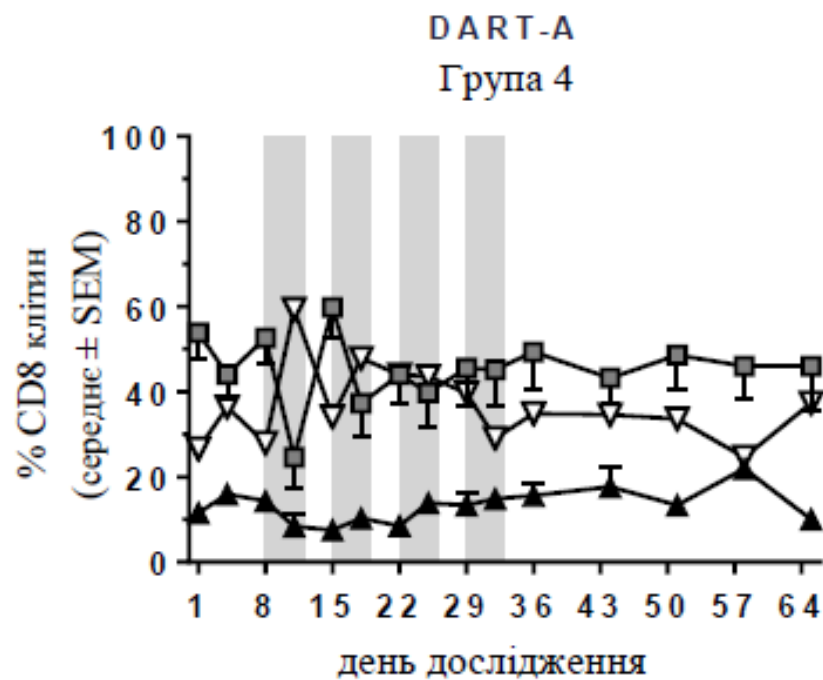
Фігура 33C



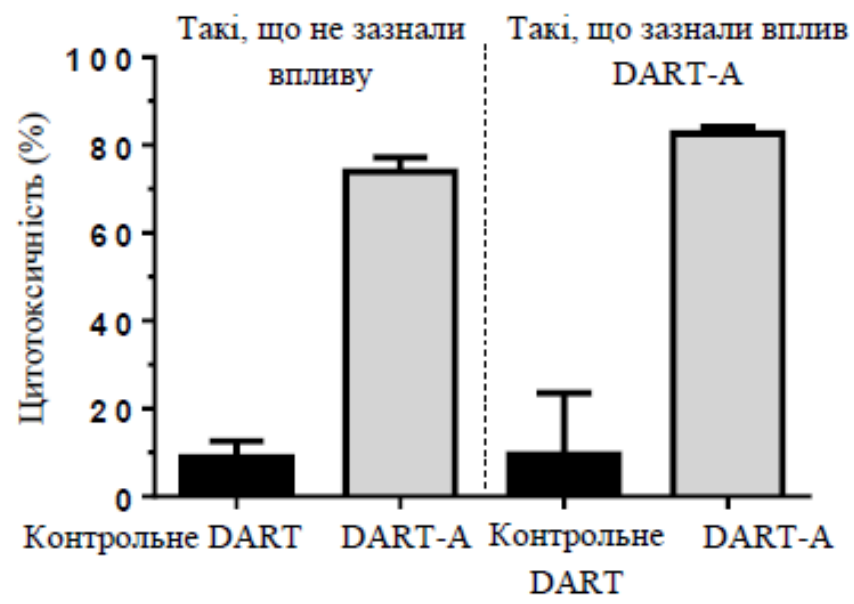
Фігура 33D



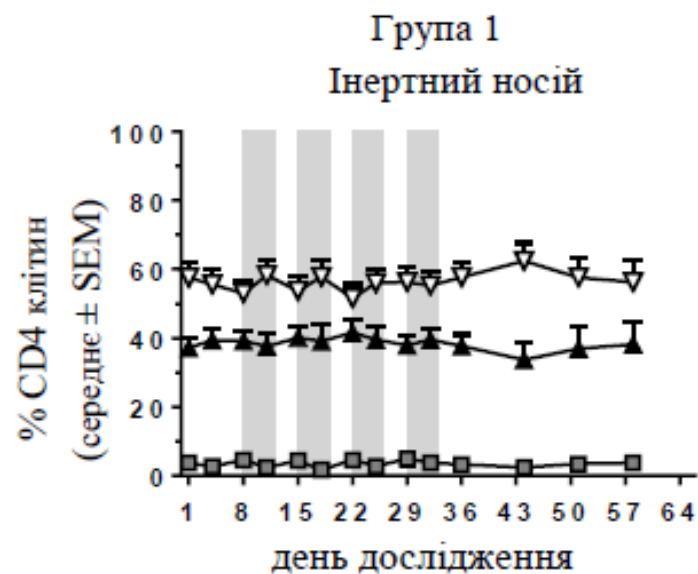
Фігура 33Е



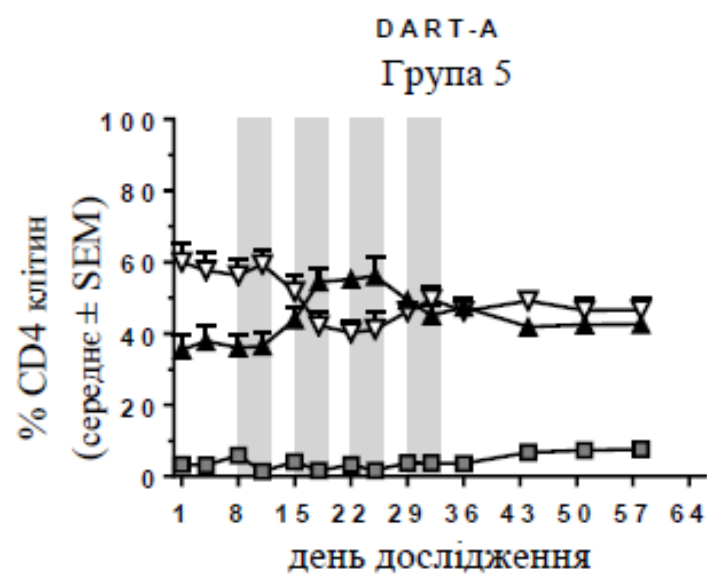
Фігура 33F



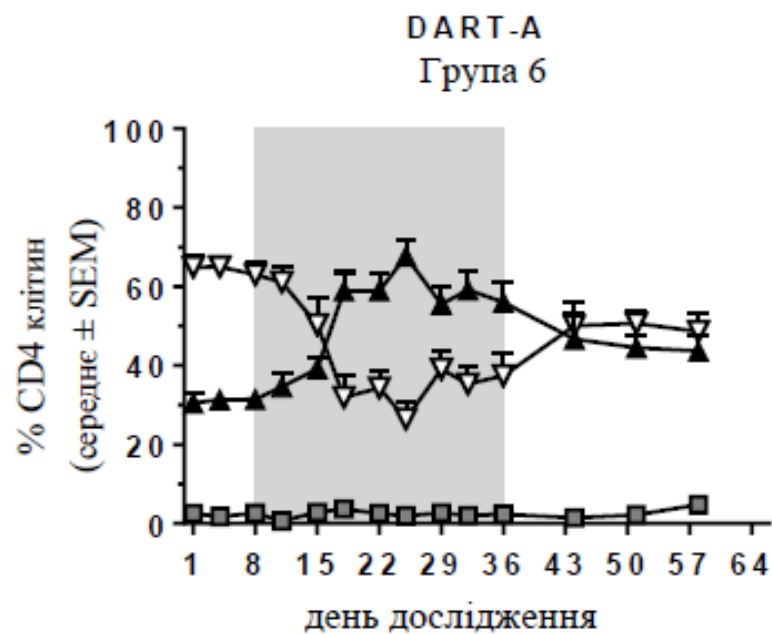
Фігура 34



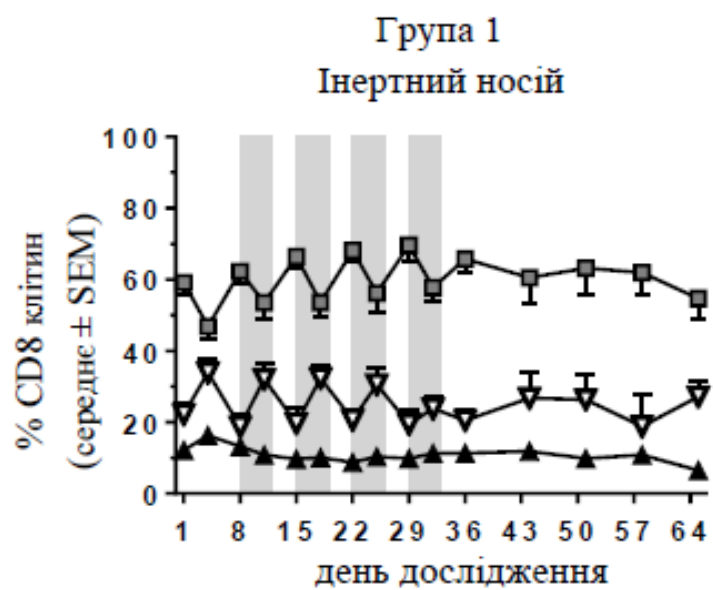
Фігура 35А



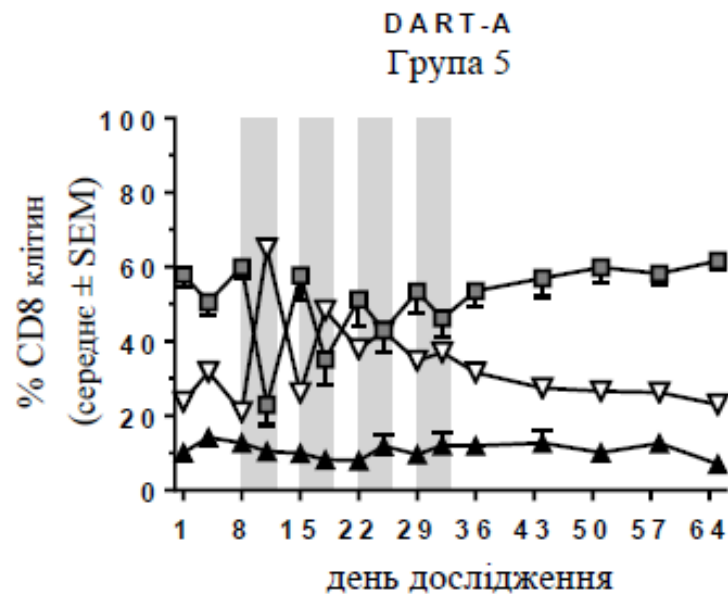
Фігура 35В



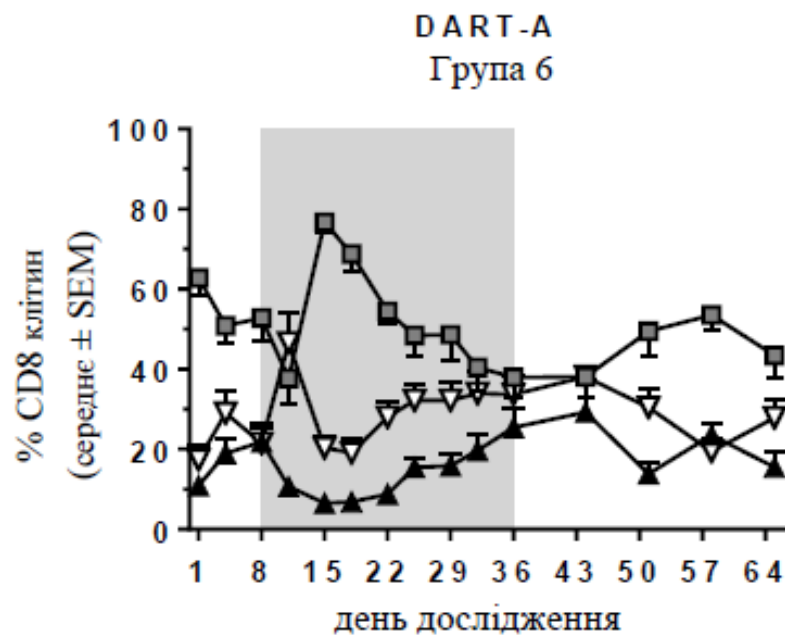
Фігура 35C



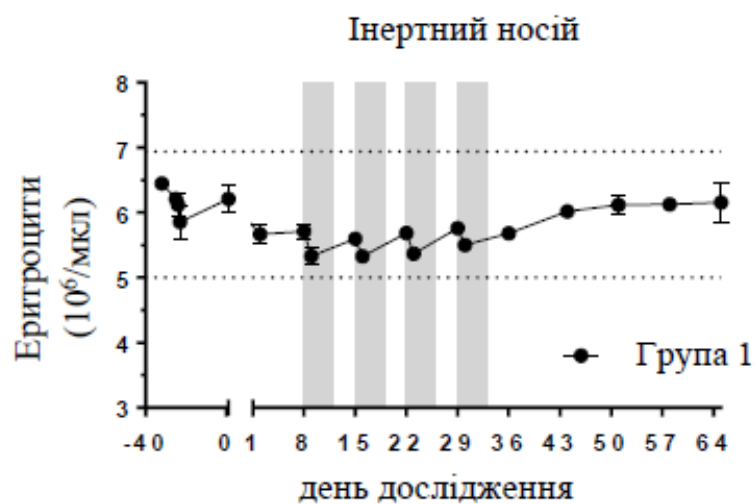
Фігура 35D



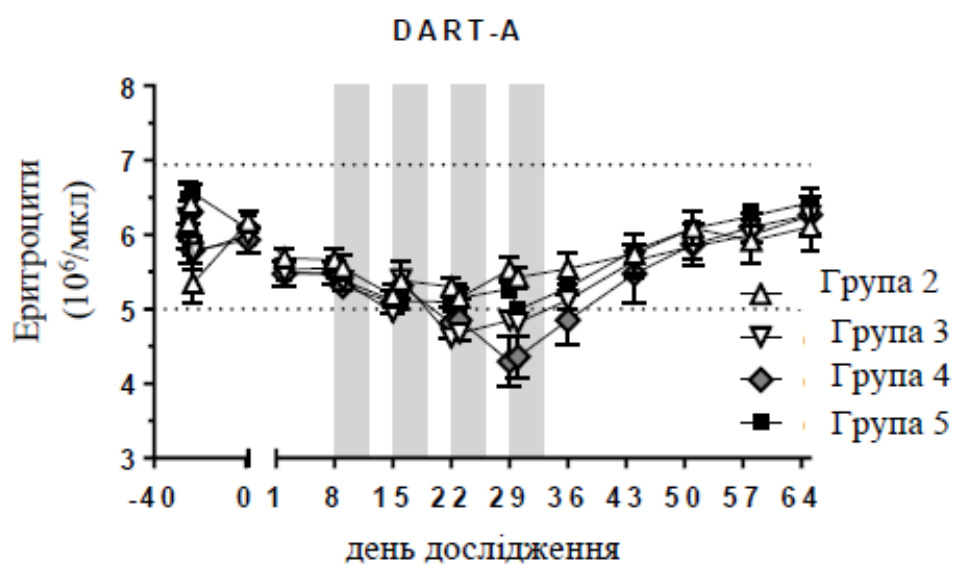
Фігура 35E



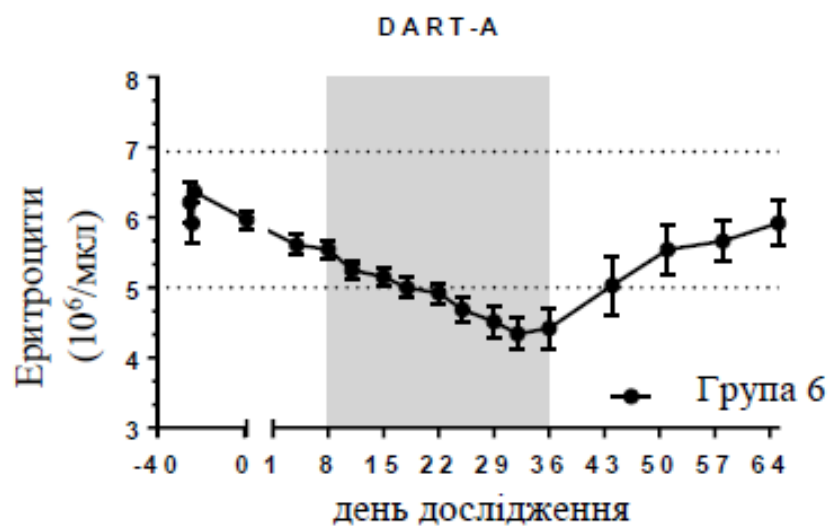
Фігура 35F



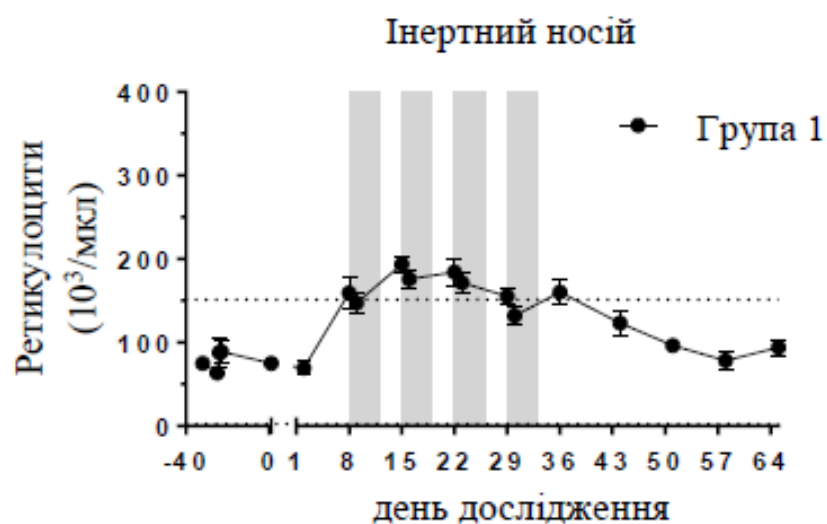
Фігура 36А



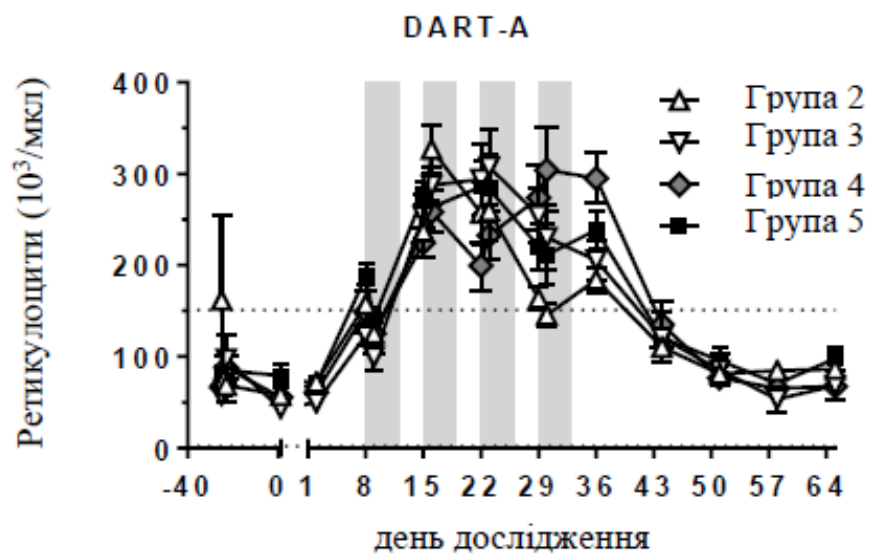
Фігура 36В



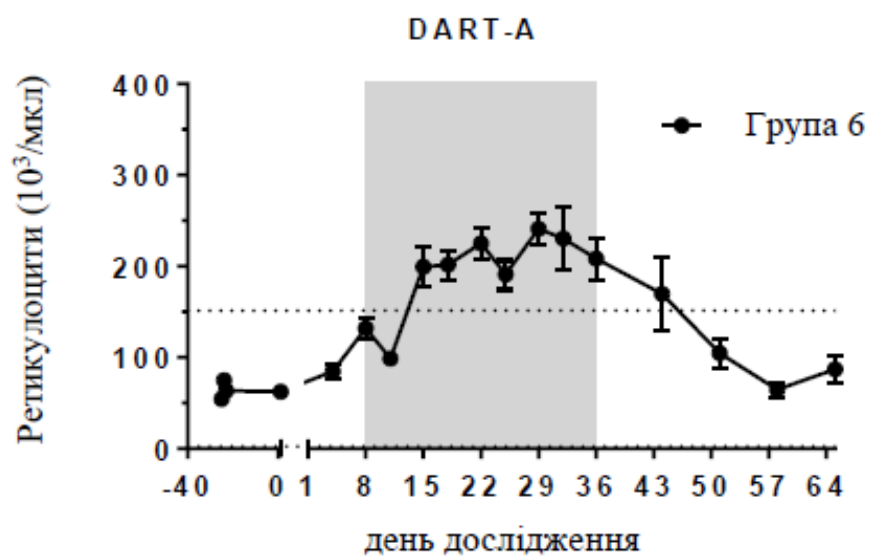
Фігура 36C



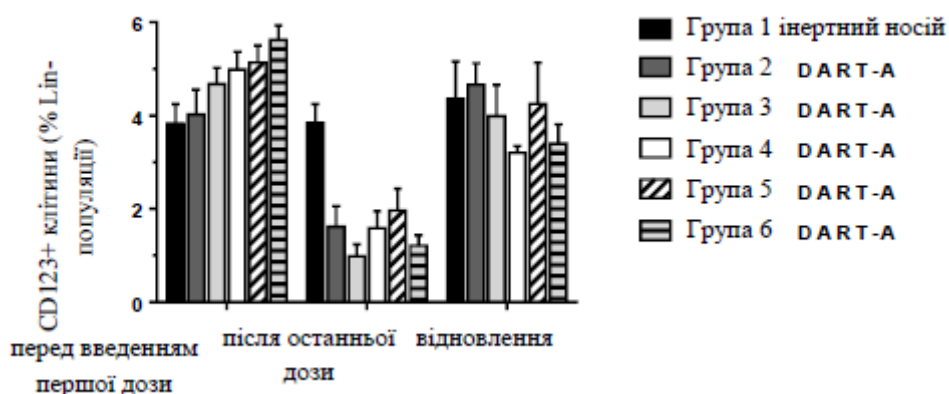
Фігура 36D



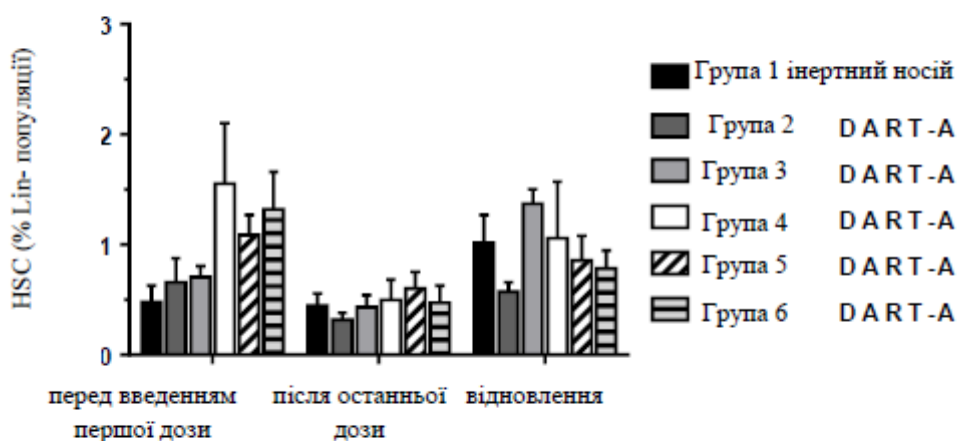
Фігура 36Е



Фігура 36F



Фігура 37А



Фігура 37В

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601