

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201690443 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.08.31

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.08.20

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬСЯ С CD123 И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/869,510; 61/907,749; 13198784;
61/990,475

(32) 2013.08.23; 2013.11.22; 2013.12.20;
2014.05.08

(33) US; US; EP; US

(86) PCT/US2014/051790

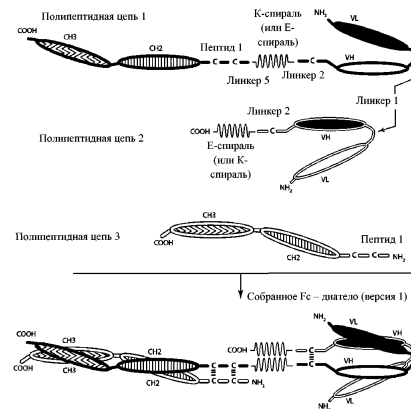
(87) WO 2015/026892 2015.02.26

(71) Заявитель:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Бонвини Эцио, Джонсон Лесли С.,
Хуанг Линг, Мур Пол А., Чичили
Гурунадх Редди, Алдерсон Ральф
Фроман (US)

(74) Представитель:
Карпенко О.Ю., Угрюмов В.М.,
Дементьев В.Н., Лыу Т.Н., Глухарёва
А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В.,
Христофоров А.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 × CD3 биспецифическим моновалентным диателам, которые способны одновременно связываться с CD123 и CD3, и к применениям таких диател в лечении гематологических злокачественных опухолей.



201690443

A1

A1

201690443

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬСЯ С CD123 И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Ссылки на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявками на выдачу патентов США №№ 61/869510 (поданной 23 августа 2013 г.; в стадии рассмотрения), 61/907749 (поданной 22 ноября 2013 г.; в стадии рассмотрения) и 61/990,475 (поданной 8 мая 2014 г.; в стадии рассмотрения), и заявкой на выдачу Европейского патента №13198784 (поданной 20 декабря 2013 г.), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает в себя один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 *et seq.*, которые раскрыты как на бумажном, так и на машиночитаемом носителе, и чьи бумажные и машиночитаемые раскрытия полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к CD123 x CD3 биспецифическим моновалентным диателам, которые способны одновременно связываться с CD123 и CD3, и к применениям таких молекул в лечении гематологических злокачественных опухолей.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

I. CD123

CD123 (альфа-рецептор интерлейкина 3, IL-3Ra) представляет собой молекулу с молекулярной массой 40 кДа и является частью комплекса рецепторов интерлейкина 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). Интерлейкин 3 (IL-3) управляет ранней дифференциацией мультипотентных стволовых клеток в клетки эритроидных, миелоидных и лимфоидных предшественников. CD123 экспрессируется на CD34+ коммитированных клетках - предшественниках (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), но не на CD34+/CD38- нормальных гемопоэтических стволовых клетках. CD123 экспрессируется базофилами, тучными клетками, плазмацитоидными дендритными клетками, некоторая экспрессия наблюдается у моноцитов, макрофагов и эозинофилов, и низкая экспрессия или ее отсутствие наблюдается у нейтрофилов и мегакариоцитов. Некоторые не относящиеся к гемопоэтическим ткани (плацента, клетки Лейдига в яичках, определенные клеточные элементы головного мозга и некоторые эндотелиальные клетки) экспрессируют CD123; тем не менее, экспрессия является, главным образом, цитоплазматической.

Сообщалось, что CD123 экспрессируется лейкобластами и лейкозными стволовыми клетками (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) (**фигура 1**). В нормальных популяциях клеток - предшественников у человека CD123 экспрессируется подклассом гемопоэтических клеток - предшественников (HPC), но не нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками (HSC). CD123 также экспрессируется плазмацитоидными дендритными клетками (pDC) и базофилами и в меньшей степени моноцитами и эозинофилами (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).

Сообщалось, что CD123 избыточно экспрессируется на злокачественных клетках в широком спектре гематологических злокачественных опухолей, включая в себя острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС) (Muñoz, L. *et al.* (2001) “*Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed*

In Hematologic Malignancies,” *Haematologica* 86(12):1261-1269). Избыточная экспрессия CD123 связана с более неблагоприятным прогнозом при ОМЛ (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).

Считается, что ОМЛ и МДС возникают и поддерживаются небольшой популяцией лейкозных стволовых клеток (LSC), которые, как правило, являются дремлющими (т.е. не быстро делящимися клетками) и, следовательно, являются устойчивыми к клеточной смерти (апоптозу) и традиционным химиотерапевтическим средствам. LSC характеризуются высокими уровнями экспрессии CD123, что отсутствует в соответствующей нормальной популяции гемопоэтических клеток в нормальном костном мозге человека (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 экспрессируется в 45%-95% случаев ОМЛ, 85% случаев волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ) и 40% случаев острого В-лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ). Экспрессия CD123 также связана с другими многочисленными злокачественными опухолями/предраковыми состояниями: клетки - предшественники хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) (включая в себя ХМЛ с бластным кризом); клетки Рид-Штернберга (RS) при ходжкинской лимфоме; трансформированная неходжкинская лимфома (НХЛ); некоторые типы хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) (CD11c+); подкласс острого Т-лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ) (16%, наиболее незрелый подкласс, главным образом поражает взрослых), злокачественные опухоли из плазмацитоидных дендритных клеток (pDC) (DC2) и злокачественные опухоли из CD34+/CD38- клеток костного мозга при миелодиспластическом синдроме (МДС).

ОМЛ представляет собой клональное заболевание, характеризующееся пролиферацией и накоплением трансформированных миелоидных клеток - предшественников в костном мозге, которое в итоге приводит к гемопоэтической недостаточности. Частота возникновения ОМЛ увеличивается с возрастом, и пациенты более старшего возраста, как правило, имеют худшие исходы лечения, чем более молодые пациенты (Robak, T. *et al.* (2009) “*Current And Emerging Therapies For Acute Myeloid Leukemia,*” *Clin. Ther.* 2:2349-2370). К сожалению, в настоящее время большинство взрослых пациентов с ОМЛ умирает вследствие своего заболевания.

Лечение ОМЛ изначально фокусируется на индукции ремиссии (индукционная терапия). Как только достигается индукция, фокус лечения сдвигается на закрепление этой ремиссии (послеремиссионная, или консолидационная терапия) и в некоторых случаях на поддерживающую терапию. Стандартная парадигма индукции ремиссии для ОМЛ представляет собой химиотерапию с помощью комбинации антрациклина и цитарабина с последующей либо консолидационной химиотерапией (как правило, с помощью повышенных доз тех же лекарственных средств, которые использовались в течение периода индукции ремиссии), либо трансплантацией стволовых клеток человека в зависимости от способности пациента переносить интенсивное лечение и вероятности выздоровления только с помощью химиотерапии (см., например, Roboz, G.J. (2012) “*Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia,*” *Curr. Opin. Oncol.* 24:711-719).

Средства, часто используемые в индукционной терапии, включают в себя цитарабин и антрациклин. Цитарабин, также известный как AraC, уничтожает злокачественные клетки (и другие быстро делящиеся нормальные клетки), препятствуя синтезу ДНК. Побочные эффекты, связанные с лечением с помощью AraC, включают в себя сниженную устойчивость к инфекции как результат сниженной продукции лейкоцитов; кровотечение как результат сниженной продукции тромбоцитов; и анемию вследствие потенциального снижения количества эритроцитов. Другие побочные эффекты включают в себя тошноту и рвоту. Антрациклины (например, даунорубин, доксорубин и идарубин) характеризуются несколькими механизмами действия, включая в себя ингибирование синтеза ДНК и РНК, разрушение структур ДНК более высоких порядков и производство повреждающих клетки свободных кислородных радикалов. Наиболее значительный побочный эффект антрациклинов представляет собой кардиотоксичность, которая существенно ограничивает вводимую в течение жизни дозу и в некоторой степени применимость антрациклинов.

Таким образом, к сожалению, несмотря на существенный прогресс в лечении впервые выявленного ОМЛ, 20% - 40% пациентов не достигают ремиссии с помощью стандартной индукционной химиотерапии, и у 50% - 70% пациентов, достигших вначале полной ремиссии, как предполагают, возникнет рецидив не позже чем через 3 года. Оптимальная стратегия в период рецидива или для пациентов с устойчивым к лечению заболеванием, остается неясной. Установлено, что трансплантация стволовых клеток является наиболее эффективной формой противолейкозной терапии у пациентов

с ОМЛ при первой или последующей ремиссии (Roboz, G.J. (2012) “*Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia*,” *Curr. Opin. Oncol.* 24:711-719).

II. CD3

CD3 представляет собой Т - клеточный корцептор, состоящий из четырех различных цепей (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 млекопитающих комплекс CD3 содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Указанные цепи связываются с молекулой, известной как Т - клеточный рецептор (TCR), для создания сигнала активации в Т - лимфоцитах. При отсутствии CD3 не происходит правильная сборка TCR, и они распадаются (Thomas, S. *et al.* (2010) “*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer*,” *Immunology* 129(2):170–177). CD3 обнаружен связанным с мембранами всех зрелых Т - клеток и практически ни с каким другим типом клеток (см. 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. Биспецифические диатела

Способность интактного, немодифицированного антитела (например, IgG) связывать эпитоп антигена зависит от присутствия вариабельных доменов на легких и тяжелых цепях иммуноглобулина (т.е. доменов VL и VH, соответственно). Конструкция диатела основана на одноцепочечном конструкторе Fv (scFv) (см., например, Holliger *et al.* (1993) “*‘Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448; патентную публикацию 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).

Взаимодействие легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействие его доменов VL и VH формирует один из сайтов связывания эпитопа антитела. Напротив, конструктор scFv содержит домен VL и VH антитела, содержащиеся в одной полипептидной цепи, причем в домены отделены гибким линкером, длина которого достаточна для обеспечения возможности самосборки двух доменов в функциональный сайт связывания эпитопа. Если самосборка доменов VL и VH становится невозможной вследствие недостаточной длины линкера (меньше чем приблизительно 12 аминокислотных остатков), два конструктора scFv взаимодействуют друг с другом с образованием бивалентной молекулы, в которой VL одной цепи ассоциируются с VH другой (рассмотрено в Marvin *et al.* (2005) “*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*,” *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658).

Природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопов (т.е. являются моноспецифическими), хотя они могут связываться с множественными копиями этого вида (т.е. проявляя бивалентность или мультивалентность). В известном уровне техники сообщалось о способности производить диатела, которые отличаются от таких природных антител в том, что они способны связывать два или больше различных видов эпитопов (т.е. проявляя биспецифичность или мультиспецифичность в дополнение к бивалентности или мультивалентности) (см., например, 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).

Обеспечение не моноспецифическими диателами предоставляет существенное преимущество: способность колигирования и колокализации клеток, которые экспрессируют различные эпитопы. Таким образом, биспецифические диатела характеризуются широким диапазоном применений, включая в себя терапию и иммунодиагностику. Биспецифичность обеспечивает возможность большой гибкости в конструировании и разработке диатела в различных применениях, обеспечивая повышенную авидность в отношении мультимерных антигенов, перекрестную сшивку различных антигенов и направленное нацеленное воздействие на конкретные типы клеток на основании присутствия обоих целевых антигенов. В связи с их повышенной валентностью низкие скорости диссоциации и быстрое выведение из циркуляции (для диател небольшого размера, составляющего ~50 кДа или ниже), известные в настоящей области техники молекулы диател также продемонстрировали конкретное применение в области визуализации опухолей (Fitzgerald *et al.* (1997) “*Improved Tumor Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris,*” *Protein Eng.* 10:1221). Особое значение представляет колигирование различных клеток, например, перекрестная сшивка цитотоксических Т - клеток с опухолевыми клетками (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).

Домены связывания с эпитопом диатела также могут быть направлены на поверхностную детерминанту любой иммунной эффекторной клетки, такой как CD3, CD16, CD32 или CD64, которые экспрессируются на Т - лимфоцитах, клетках - естественных киллерах (NK) или других мононуклеарных клетках. Во многих исследованиях также обнаружили, что связывание диатела с детерминантами эффекторных клеток, например, рецепторами Fc γ (Fc γ R), активирует эффекторную клетку (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; международные патентные публикации №№ WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Как правило, активация эффекторных клеток запускается связыванием антигена, связанного антителом, с эффекторной клеткой посредством взаимодействия Fc-FcγR; таким образом, в связи с этим, молекулы диател могут проявлять Ig-подобную функциональность, независимо от того, содержат ли они домен Fc (например, согласно результатам любого анализа эффекторной функции, известного в настоящей области техники или представленного в качестве примера в настоящем документе (например, анализа ADCC)). Путем перекрестной сшивки опухолевых и эффекторных клеток диатело не только приводит эффекторную клетку в пространственную близость относительно опухолевых клеток, но приводит к эффективному лизису опухолевых клеток (см., например, Cao *et al.* (2003) “*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics,*” Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

Тем не менее, вышеперечисленные преимущества сталкиваются с существенной стоимостью. Образование таких не моноспецифических диател требует успешной сборки двух или больше отдельных и различных полипептидов (т.е. такое образование требует, чтобы диатела образовывались посредством гетеродимеризации различных видов полипептидных цепей). Этот факт контрастирует с моноспецифическими диателами, которые образуются посредством гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку необходимо предоставить по меньшей мере два несходных полипептида (т.е. два вида полипептидов) для образования не моноспецифического диатела, и поскольку гомодимеризация таких полипептидов приводит к неактивным молекулам (Takemura, S. *et al.* (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*” Protein Eng. 13(8):583-588), получение таких полипептидов должно осуществляться таким путем, который предотвратит образование ковалентных связей между полипептидами одного и того же вида (т.е. так, чтобы предотвратить гомодимеризацию) (Takemura, S. *et al.* (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*” Protein Eng. 13(8):583-588). В связи с этим в настоящей области техники раскрыто нековалентное связывание таких полипептидов (см., например, 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).

Тем не менее, в настоящей области техники установлено, что биспецифические диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов, являются нестабильными и легко диссоциируются до нефункциональных мономеров (см. например, 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).

Ввиду такой проблемы, в настоящей области техники добились успеха в разработке стабильных, ковалентно связанных гетеродимерных не моноспецифических диател (см., например, международные патентные публикации №№ 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 Fcgamma 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). Такие подходы предусматривают конструирование одного или нескольких цистеиновых остатков в каждом из используемых видов полипептидов. Например, было показано, что добавление цистеинового остатка к С-концу таких конструкторов обеспечивает образование дисульфидной связи между полипептидными цепями, стабилизируя полученный гетеродимер, не создавая помехи для характеристик связывания бивалентной молекулы.

Несмотря на такой успех, получение стабильных, функциональных гетеродимерных, не моноспецифических диател может быть дополнительно оптимизировано путем тщательного рассмотрения и размещения цистеиновых остатков

в одной или нескольких используемых полипептидных цепях. Такие оптимизированные диатела можно получить с более высоким выходом и с повышенной активностью, чем не оптимизированные диатела. Таким образом, настоящее изобретение относится к проблеме получения полипептидов, которые специально разработаны и оптимизированы для образования гетеродимерных диател. Настоящее изобретение решает указанную проблему путем обеспечения иллюстративных, оптимизированных CD123 x CD3 диател.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к CD123 x CD3 биспецифическим диателам, которые способны одновременно связываться с CD123 и CD3, и к применениям таких молекул в лечении заболевания, в частности гематологических злокачественных опухолей.

CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере две различных полипептидных цепи, которые ассоциируются друг с другом гетеродимерным образом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD123, и одного сайтом связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Таким образом, CD123 x CD3 диатело согласно настоящему изобретению является моновалентным в том смысле, что оно способно связываться только с одной копией эпитопа CD123 и только с одной копией эпитопа CD3, но является биспецифическим в том смысле, что отдельное диатело способно связываться одновременно с эпитопом CD123 и с эпитопом CD3. Отдельные полипептидные цепи диател ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Согласно конкретным вариантам осуществления диатела согласно настоящему изобретению дополнительно содержат домен Fc иммуноглобулина или альбуминсвязывающий домен для увеличения периода полужизни *in vivo*.

Более конкретно, согласно настоящему изобретению также предусмотрено характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, способное специфически связываться с эпитопом CD123 и с эпитопом CD3, причем диатело содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, ковалентно связанные друг с другом, причем:

А. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к С-концу:

- i. домен 1, содержащий:
 - (1) субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:21**);
и
 - (2) субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}) (**SEQ ID NO:26**);
причем субдомены 1A и 1B отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:29**);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:30**); и
- B. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий:
 - (1) субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}) (**SEQ ID NO:25**); и
 - (2) субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:22**);
причем субдомены 1A и 1B отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:29**);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой K-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**) или E-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:30**); и причем домен 2 первой и второй полипептидных цепей не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена;
- и при этом:
- (a) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
 - (b) указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи и указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD123.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено характеризующееся неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, способное специфически связываться с эпитопом CD123 и с эпитопом CD3, причем диатело содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, ковалентно связанные друг с другом, причем:

- A. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий:
 - (1) субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:23**);
и
 - (2) субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}) (**SEQ ID NO:28**);
причем субдомены 1A и 1B отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:29**);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:30**); и
- B. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий:
 - (1) субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}) (**SEQ ID NO:27**); и
 - (2) субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:24**);
причем субдомены 1A и 1B отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:29**);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой K-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**) или E-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:30**); и причем домен 2 первой и второй полипептидных цепей не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена;

и при этом:

- (a) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (b) указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи и указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD123.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления описанных выше биспецифических моновалентных диател, в котором первая или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит альбуминсвязывающий домен (**SEQ ID NO:36**), соединенный на С-конце с доменом 2 или на N-конце с доменом 1 посредством пептидного линкера (**SEQ ID NO:31**).

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления описанных выше биспецифических моновалентных диател, в котором первая или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит домен 3, содержащий домен CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG (**SEQ ID NO:37**), причем домен 3 соединен на N-конце с доменом 1А посредством пептидного линкера (**SEQ ID NO:33**).

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления описанных выше биспецифических моновалентных диател, в котором первая или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит домен 3, содержащий домен CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG (**SEQ ID NO:37**), причем домен 3 соединен на С-конце с доменом 2 посредством пептидного линкера (**SEQ ID NO:32**).

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления любого из описанных выше биспецифических моновалентных диател, в котором домен 2 первой полипептидной цепи представляет собой К-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**), и домен 2 второй полипептидной цепи представляет собой Е-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**).

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления любого из описанных выше биспецифических моновалентных диател, в котором домен 2 первой полипептидной цепи представляет собой Е-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**), и домен 2 второй полипептидной цепи представляет собой К-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**).

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления биспецифического моновалентного диатела, способного специфически связываться с эпитопом CD123 и с эпитопом CD3, причем диатело содержит первую

полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, ковалентно связанные друг с другом, причем: указанное биспецифическое диатело содержит следующее:

А. первая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:1**; и

В. вторая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:3**;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом дисульфидной связью.

Диатела согласно настоящему изобретению проявляют неожиданно усиленные функциональные активности, как дополнительно описано ниже.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны перекрестно реагировать с белками CD123 и CD3 как человека, и так примата, предпочтительно белками CD123 и CD3 яванского макака.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны подвергаться деплеции *in vitro* клеточном анализе плазмацитоидные дендритные клетки (pDC) из культуры первичных PBMC со значением IC50, составляющим приблизительно 1 нг/мл или меньше, приблизительно 0,8 нг/мл или меньше, приблизительно 0,6 нг/мл или меньше, приблизительно 0,4 нг/мл или меньше, приблизительно 0,2 нг/мл или меньше, приблизительно 0,1 нг/мл или меньше, приблизительно 0,05 нг/мл или меньше, приблизительно 0,04 нг/мл или меньше, приблизительно 0,03 нг/мл или меньше, приблизительно 0,02 нг/мл или меньше или приблизительно 0,01 нг/мл или меньше. Значение IC50 предпочтительно составляет приблизительно 0,01 нг/мл или меньше. В описанном выше анализе культура первичных PBMC может происходить от яванского макака, в этом случае указанная деплеция представляет собой деплецию плазмацитоидных дендритных клеток яванского макака (pDC). Необязательно диатела согласно настоящему изобретению могут быть способны подвергаться деплеции плазмацитоидные дендритные клетки (pDC) из первичной культуры PBMC, как описано выше, причем анализ проводят согласно или в соответствии с протоколом примера 14, как описано в настоящем документе, или путем модификации такого анализа, что будет понятно специалистам в настоящей области техники, или другими способами, известными специалистам в настоящей области техники.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно проявляют цитотоксичность в *in vitro* анализе Kasumi-3 со значением EC50, составляющим

приблизительно 0,05 нг/мл или меньше. Значение EC50 предпочтительно составляет приблизительно 0,04 нг/мл или меньше, приблизительно 0,03 нг/мл или меньше, приблизительно 0,02 нг/мл или меньше или приблизительно 0,01 нг/мл или меньше. Не обязательно диатела согласно настоящему изобретению могут проявлять цитотоксичность, как описано выше, причем анализ проводят согласно или в соответствии с протоколом примера 3, как описано в настоящем документе, или путем модификации такого анализа, что будет понятно специалистам в настоящей области техники, или другими способами, известными специалистам в настоящей области техники.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно проявляют цитотоксичность в *in vitro* анализе Molm-13 со значением EC50, составляющим приблизительно 5 нг/мл или меньше. Значение EC50 предпочтительно составляет приблизительно 3 нг/мл или меньше, приблизительно 2 нг/мл или меньше, приблизительно 1 нг/мл или меньше, приблизительно 0,75 нг/мл или меньше или приблизительно 0,2 нг/мл или меньше. Не обязательно диатела согласно настоящему изобретению могут проявлять цитотоксичность, как описано выше, причем анализ проводят согласно или в соответствии с протоколом примера 3, как описано в настоящем документе, или путем модификации такого анализа, что будет понятно специалистам в настоящей области техники, или другими способами, известными специалистам в настоящей области техники.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата MOLM-13 у мыши. Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно могут быть способны ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата MOLM-13 у мыши в концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 20 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 4 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,8 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,6 мкг/кг или по меньшей мере приблизительно 0,4 мкг/кг. Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению будут ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата MOLM-13 у мыши по меньшей мере на 25%, но возможно по меньшей мере приблизительно на 40% или больше, по меньшей мере приблизительно на 50% или больше, по меньшей мере приблизительно на 60% или больше, по меньшей мере приблизительно на 70% или больше, по меньшей мере приблизительно на 80% или больше, по меньшей мере приблизительно на 90% или больше или даже полностью ингибировать рост опухоли MOLM-13 через

некоторый период времени или вызывая регрессию или исчезновение опухоли. Указанное ингибирование наблюдается по меньшей мере для линии мышей NSG. Не обязательно диатела согласно настоящему изобретению могут быть способны ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата MOLM-13 у мыши описанным выше образом согласно или в соответствии с протоколом примера 6, как описано в настоящем документе, или путем модификации такого анализа, что будет понятно специалистам в настоящей области техники, или другими способами, известными специалистам в настоящей области техники.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата RS4-11 у мыши. Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно могут быть способны ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата RS4-11 у мыши в концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 0,5 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,2 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,02 мг/кг или по меньшей мере приблизительно 0,004 мг/кг. Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению будут ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата RS4-11 у мыши по меньшей мере приблизительно на 25%, но возможно по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или даже полностью ингибировать рост опухоли RS4-11 через некоторый период времени или вызывая регрессию или исчезновение опухоли. Указанное ингибирование наблюдается по меньшей мере для линии мышей NSG. Не обязательно диатела согласно настоящему изобретению могут быть способны ингибировать рост опухолевого ксенотрансплантата RS4-11 у мыши описанным выше образом согласно или в соответствии с протоколом примера 6, как описано в настоящем документе, или путем модификации такого анализа, что будет понятно специалистам в настоящей области техники, или другими способами, известными специалистам в настоящей области техники.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны подвергать деплеции лейкозные бластные клетки *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ. Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно могут быть способны подвергать деплеции лейкозные бластные клетки *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ при концентрациях, составляющих по

меньшей мере приблизительно 0,01 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,02 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,04 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,06 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,08 нг/мл или по меньшей мере приблизительно 0,1 нг/мл. Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно могут быть способны подвергать деплеции лейкозные бластные клетки *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ меньше чем на 20% от общей популяции первичных лейкозных бластных клеток при концентрациях диатела, составляющих по меньшей мере приблизительно 0,01 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,02 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,04 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,06 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,08 нг/мл или по меньшей мере приблизительно 0,1 нг/мл, необязательно после инкубации первичной культуры с диателом в течение приблизительно 120 часов. Лейкозные бластные клетки предпочтительно подвергают деплеции *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ меньше чем на 20% от общей популяции первичных лейкозных бластных клеток при концентрациях диатела, составляющих приблизительно 0,01 нг/мл или 0,1 нг/мл, после инкубации первичной культуры с диателом в течение приблизительно 120 часов.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны индуцировать экспансию Т-клеточной популяции *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ. Такая экспансия предпочтительно может составлять приблизительно 70% или больше от максимальной Т-клеточной популяции, которая может быть подвергнута экспансии в анализе. Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно могут быть способны индуцировать экспансию Т-клеточной популяции *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ приблизительно на 70% или больше от максимальной Т-клеточной популяции, которая может быть подвергнута экспансии в анализе при концентрациях диатела, составляющих по меньшей мере приблизительно 0,01 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,02 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,04 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,06 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,08 нг/мл или по меньшей мере приблизительно 0,1 нг/мл, необязательно после инкубации первичной культуры с диателом в течение приблизительно 120 часов. Т-клеточная популяция предпочтительно увеличивается *in vitro* в первичной культур клеток костного мозга ОМЛ приблизительно на 70% или больше от максимальной Т-клеточной популяции, которая может быть подвергнута экспансии в анализе при концентрациях диатела,

составляющих приблизительно 0,01 нг/мл или приблизительно 0,1 нг/мл после инкубации первичной культуры с диателом в течение приблизительно 120 часов.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны индуцировать активацию Т-клеточной популяции *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ. Такая активация может происходить при концентрациях диатела, составляющих по меньшей мере приблизительно 0,01 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,02 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,04 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,06 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,08 нг/мл или по меньшей мере приблизительно 0,1 нг/мл, необязательно после инкубации первичной культуры с диателом в течение приблизительно 72 часов. Такую активацию можно измерить по экспрессии маркера Т-клеточной активации, такого как CD25. Активация Т-клеточная популяция *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ, измеряемая по экспрессии CD25, предпочтительно происходит при концентрациях диатела, составляющих приблизительно 0,01 нг/мл или приблизительно 0,1 нг/мл, после инкубации первичной культуры с диателом в течение приблизительно 72 часов.

Диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно способны подвергать деплеции лейкозные бластные клетки *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ меньше чем на 20% от общей популяции первичных лейкозных бластных клеток и в то же время индуцировать экспансию Т-клеточной популяции *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ приблизительно на 70% или больше от максимальной Т-клеточной популяции, которая может быть подвергнута экспансии в анализе, при концентрациях диатела, составляющих по меньшей мере приблизительно 0,01 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,02 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,04 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,06 нг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,08 нг/мл или по меньшей мере приблизительно 0,1 нг/мл, необязательно после инкубации первичной культуры с диателом в течение приблизительно 120 часов. Концентрации диатела предпочтительно составляют приблизительно 0,01 нг/мл или приблизительно 0,1 нг/мл, и первичную культуру инкубируют с диателом в течение приблизительно 120 часов.

Диатела согласно настоящему изобретению могут быть способны подвергать деплеции лейкозные бластные клетки *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ и/или индуцировать экспансию Т-клеточной популяции *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ и/или индуцировать активацию Т-клеточной популяции *in vitro* в первичной культуре клеток костного мозга ОМЛ

описанным выше образом согласно или в соответствии с протоколом примера 8, как описано в настоящем документе, или путем модификации такого анализа, что будет понятно специалистам в настоящей области техники, или другими способами, известными специалистам в настоящей области техники.

Во избежание неверного толкования, диатела согласно настоящему изобретению могут проявлять один, два, три, больше трех или все из функциональных признаков, описанных в настоящем документе. Таким образом, диатела согласно настоящему изобретению могут проявлять любую комбинацию функциональных признаков, описанных в настоящем документе.

Диатела согласно настоящему изобретению являются пригодными для применения в качестве фармацевтического средства. Диатела предпочтительно являются пригодными для применения в лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией CD123 или характеризующегося экспрессией CD123. Настоящее изобретение также относится к применению диатела согласно настоящему изобретению в производстве фармацевтической композиции, предпочтительно для лечения заболевания или состояния, связанного с экспрессией CD123 или характеризующегося экспрессией CD123, как дополнительно определено в настоящем документе.

Заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, может представлять собой злокачественную опухоль. Например, злокачественная опухоль может быть выбрана из группы, состоящей из следующего: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), включая в себя бластный криз ХМЛ и онкоген Абельсона, связанный с ХМЛ (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластический синдром (МДС), острый В-лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), включая в себя ХЛЛ с синдромом Рихтера или трансформацией Рихтера, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток (ОБПДК), нехождкинские лимфомы (НХЛ), включая в себя мантийноклеточную лимфому (МКЛ) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфома Ходжкина, системный мастоцитоз и лимфома Беркитта.

Заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, может представлять собой воспалительное состояние. Например, воспалительное состояние может быть выбрано из группы,

состоящей из следующего: системная красная волчанка (СКВ), аллергия, бронхиальная астма и ревматоидный артрит.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любое из описанных выше диател и физиологически приемлемый носитель.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрено применение описанной выше фармацевтической композиции в лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией CD123 или характеризующегося экспрессией CD123.

В частности, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления такого применения, в котором заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, представляет собой злокачественную опухоль (особенно злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из следующего: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), включая в себя бластный криз ХМЛ и онкоген Абельсона, связанный с ХМЛ (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластический синдром (МДС), острый В-лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), включая в себя ХЛЛ с синдромом Рихтера или трансформацией Рихтера, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток (ОБПДК), нехождкинские лимфомы (НХЛ), включая в себя мантийноклеточную лимфому (МКЛ) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфома Ходжкина, системный мастоцитоз и лимфома Беркитта).

В частности, согласно настоящему изобретению предусмотрен вариант осуществления такого применения, в котором заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, представляет собой воспалительное состояние (особенно воспалительное состояние, выбранное из группы, состоящей из следующего: системная красная волчанка (СКВ), аллергия, бронхиальная астма и ревматоидный артрит).

Такие термины, как “приблизительно” следует понимать как среднее в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от указанного значения, если контекстом не предусмотрено иное.

Краткое описание графических материалов

На **фигуре 1** показано, что CD123, как известно, экспрессируется на лейкозных стволовых клетках.

На **фигуре 2** проиллюстрированы структуры первой и второй полипептидных цепей двухцепочечного CD123 x CD3 биспецифического моновалентного диатела согласно настоящему изобретению.

На **фигурах 3А и 3В** проиллюстрированы структуры двух версий первой, второй и третьей полипептидных цепей трехцепочечного CD123 x CD3 биспецифического моновалентного Fc - диатела согласно настоящему изобретению (версия 1, **фигура 3А**; версия 2, **фигура 3В**).

На **фигуре 4 (панели А-Е)** показана способность различных CD123 x CD3 биспецифических диател опосредовать Т-клеточный перенаправленный цитолиз клеток – мишеней, проявляющих изменяющееся количество CD123. На фигуре представлены кривые зависимости от дозы, указывающие на то, что характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (“DART-A”), содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-A с ABD “w/ABD”) проявило большую цитотоксичность, чем контрольное биспецифическое диатело (контрольное DART) или характеризующееся неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (“DART-B”) в многочисленных типах клеток-мишеней: RS4-11 (**панель А**); TF-1 (**панель В**); Molm-13 (**панель С**); Kasumi-3 (**панель D**); и THP-1 (**панель Е**) в соотношении Е:Т (эффектор : мишень), составляющем 10:1.

На **фигуре 5 (панели А-Д)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A), характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен (DART-A с ABD “w/ABD”) и характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (DART-A с Fc “w/Fc”), опосредовать Т-клеточную активацию в процессе перенаправленного цитолиза клеток-мишеней. На фигуре представлены кривые зависимости от дозы, показывающие цитотоксичность, опосредованную DART-A, DART-A w/ABD и DART-A w/Fc в клетках Kasumi-3 (**панель А**) и THP-1 (**панель В**) и очищенных CD8 Т-клетках при соотношении Е:Т (эффекторная клетка : клетка - мишень), составляющем 10:1 (18 ч инкубация). На панелях С и D показаны кривые зависимости от дозы Т-клеточной активации с использованием маркера CD25 на CD8 Т-клетках в присутствии (**панель D**) и при отсутствии (**панель С**) клеток - мишеней.

На **фигуре 6 (панели А-В)** показаны содержания гранзима В и перфорина в CD4 и CD8 Т-клетках после обработки с помощью характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) (**панель А**) или контрольного биспецифического диатела (контрольного DART) (**панель В**) в присутствии клеток-мишеней Kasumi-3 и дремлющих Т-клеток в соотношении Е:Т, составляющем 10:1.

На **фигуре 7 (панели А-В)** показана *in vivo* противоопухолевая активность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) при уровнях дозировки в нг/кг. Клетки MOLM-13 (промежуточный уровень экспрессии CD123) смешивали с Т-клетками и имплантировали подкожно (Т:Е 1:1) мышам NSG. Внутривенное лечение осуществляли один раз в день в течение 8 дней (QDx8), начиная со дня имплантации. Различные концентрации DART-A сравнивали с контрольным биспецифическим диателом (контрольным DART). На **панели А** показаны клетки Molm-13 отдельно или с Т-клетками, и эффект различных доз DART-A на объем опухоли, даже во временные точки за пределами 30 дней. На **панели В** показан эффект повышающихся доз DART-A на объем опухоли, наблюдаемый у мышей NSG, получивших клетки MOLM-13 и Т-клетки (Т:Е 1:1) в течение периода времени, составляющего 0-18 дней.

На **фигуре 8** показана *in vivo* противоопухолевая активность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) на клетки RS4-11 (ОЛЛ с признаками моноцитов). Клетки смешивали с Т-клетками и имплантировали подкожно (Т:Е 1:1) мышам NSG. Внутривенное лечение осуществляли один раз в день в течение 4 дней (QDx4), начиная со дня имплантации. Различные концентрации DART-A сравнивали с контрольным биспецифическим диателом (контрольное DART).

На **фигуре 9 (панели А-В)** показаны CD123+ бластные клетки в мононуклеарах костного мозга (ВМ МНС) и мононуклеарах периферической крови (РВМС) от пациента 1 с ОМЛ (**панель А**) по сравнению с клеточной линией ОМЛ Kasumi-3 (**панель В**).

На **фигуре 10 (панели А-С)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать сокращение бластных клеток при первичном ОМЛ через 120 ч (**панель А**), управлять экспансией Т-клеточной популяции при первичном ОМЛ через

120 ч (**панель В**) и индуцировать Т-клеточную активацию при ОМЛ через 48 ч и 72 ч (**панель С**).

На **фигуре 11 (Панели А-Н)** показана идентификация популяции CD123+ бластных клеток в первичном образце РВМС ОЛЛ. На **панелях А и Е** показано прямое и боковое светорассеяние вводимой популяции нормальных РВМС (**панель А**) и РВМС ОЛЛ (**панель Е**). На **панелях В и F** показана идентификация популяции лимфоцитов в качестве, главным образом, В-клеток (**панель В**) и лейкозных бластных клеток (**панель F**). На **панелях С и G** показана идентификация популяции лимфоцитов, которые являются CD123+. На **панелях D и H** показана идентификация CD19+ клеток и CD123+ клеток.

На **фигуре 12 (панели А-В)** показана идентификация CD4 и CD8 популяций Т-клеток в первичном образце РВМС ОЛЛ. На **панели А** показано прямое и боковое светорассеяние вводимой популяции РВМС ОЛЛ. На **панели В** показаны CD4 или CD8 популяции Т-клеток, присутствующие в образцах. Количества указывают, что CD4 Т-клетки представляют приблизительно 0,5% от общего количества клеток, и CD8 Т-клетки представляют приблизительно 0,4% от общего количества клеток, присутствующих в образце РВМС ОЛЛ.

На **фигуре 13 (панели А-Н)** показана способность характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать деплецию бластных клеток при ОЛЛ с помощью аутологических CTL (цитотоксические Т-лимфоциты). На **панелях А и Е** показано прямое и боковое светорассеяние вводимой популяции нормальных РВМС (**панель А**) и РВМС ОЛЛ (**панель Е**). РВМС оставляли не обработанными (**панели В и F**), обрабатывали с помощью контрольного биспецифического диатела (контрольного DART) (**панели С и G**) или обрабатывали с помощью DART-A (**панели D и H**) и инкубировали в течение 7 дней, после чего окрашивали в отношении CD34 и CD19.

На **фигуре 14 (панели А-L)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать Т-клеточную экспансию (**панели А, В, С, G, H и I**) и активацию (**панели D, E, F, J, K и L**) в нормальных РВМС (**панели А-F**) и РВМС ОЛЛ (**панели G-L**). Клетки оставляли не обработанными (**панели А, D, G и J**) или обрабатывали с помощью контрольного биспецифического диатела (контрольного DART) (**панели В, E, H и K**) или DART-A (**панели С, F, I и L**) в течение 7 дней.

На **фигуре 15 (панели А-С)** показана идентификация бластной популяции ОМЛ и Т-клеток в первичном образце ОМЛ. На **панели А** показано прямое и боковое светорассеяние вводимой популяции РВМС ОМЛ. На **панели В** показана идентификация бластной популяции ОМЛ в образце ОМЛ. На **панели С** показана идентификация Т-клеточной популяции в образце ОМЛ.

На **фигуре 16 (панели А-С)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать деплецию бастных клеток при ОМЛ с помощью аутологических CTL и Т-клеточной экспансии. Первичные РВМС ОМЛ от пациента 2 инкубировали с PBS, контрольным биспецифическим диателом (контрольным DART) или DART-A в течение 144 ч. Подсчитывали бластные клетки (**панель А**), CD4 Т-клетки (**панель В**) и CD8 Т-клетки (**панель С**).

На **фигуре 17 (панели А-Д)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать Т-клеточную активацию при ОМЛ. Экспрессию CD25 (**панель А**) и Ki-67 (**панель В**) определяли для CD4 и CD8 Т-клеток от пациента 2 с ОМЛ после инкубации с контрольным биспецифическим диателом (контрольным DART) или DART-A с аутологическими РВМС. Содержание перфорина (**панель С**) и гранзима В (**панель Д**) определяли для CD4 и CD8 Т-клеток от пациента 2 с ОМЛ после инкубации с контрольным DART или DART-A с аутологическими РВМС.

На **фигуре 18 (панели А-Д)** показано, что характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) способно перекрестно реагировать с белками CD123 и CD3 как человека, так и примата. На панелях показаны кривые сенсограмм VIACORE™ результатов анализов, проведенных для оценки способности DART-A связываться с белками CD3 (**панели А и В**) и CD123 (**панели С и Д**) человека (**панели А и С**) и нечеловекообразного примата (**панели В и Д**). Представлены значения KD.

На **фигуре 19 (панели А-В)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать деплецию аутологических моноцитов *in vitro* с РВМС человека и яванского макака. На панелях представлены результаты кривых зависимости от дозы опосредованной DART-A цитотоксичности с первичными РВМС человека (**панель А**) или РВМС яванского макака (**панель В**).

На **фигуре 20 (панели A-N)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать деплецию pDC у яванских макаков без системной индукции цитокинов. На **панелях A-D** показаны контрольные результаты, полученные через 4 ч и 4 дней с инертным носителем и носителем. На **панелях E-H** показаны контрольные результаты, полученные через 4 ч и 4 дней с контрольным биспецифическим диателом (контрольным DART). На **панелях I-N** показаны результаты, полученные через 4 ч и 4 дней в дозе DART-A, составляющей 10 нг/кг/день, и через 4 дня в дозе DART-A, составляющей 30 нг/кг/день.

На **фигуре 21 (панели A-D)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) опосредовать зависимую от дозы деплецию pDC у яванских макаков. Яванским макакам вводили дозы DART-A, составляющие 0,1, 1, 10, 30 100, 300 или 1000 нг/кг. PBMC оценивали в указанное время и определяли общее количество В-клеток (**панель A**), моноцитов (**панель B**), NK-клеток (**панель C**) и pDC (**панель D**).

На **фигуре 22 (панели A-D)** показана способность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) периодически модулировать Т-клетки у яванских макаков. Яванским макакам вводили дозы DART-A, составляющие 0,1, 1, 10, 30 100, 300 или 1000 нг/кг. PBMC оценивали в указанное время и определяли общее количество Т-клеток (**панель A**), CD4 Т-клеток (**панель B**), CD69 клеток (**панель C**) и CD8 Т-клеток (**панель D**).

На **фигуре 23** показан анализ SDS-PAGE очищенного белка DART-A при восстанавливающих (слева) и невосстанавливающих (справа) условиях.

На **фигурах 24A-24B** показаны физико-химические характеристики очищенного DART-A. На **фигуре 24A**: профиль SEC белка DART-A на калиброванной колонке TSK G3000SWxL. На **фигуре 24B**: масс-спектр белка DART-A.

На **фигурах 25A-25D** показан анализ SPR связывания DART-A с иммобилизованными CD123 и CD3 человека или яванского макака. Пунктирными линиями представлена глобальная аппроксимация к 1:1 модели Ленгмюра экспериментальных кривых связывания, полученных при концентрациях DART-A, составляющих 0, 6,25, 12,5, 25, 50 или 100 нМ (непрерывные линии). Данные являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

На **фигурах 26A-26E** показано, что DART-A способно одновременно связываться как с CD3, так и CD123. На **фигуре 26A-26B** представлены результаты

бифункционального анализа ELISA и продемонстрировано одновременное вовлечение обоих антигенов-мишеней DART-A. На планшеты ELISA наносили CD123 человека (**фигура 26А**) или яванского макака CD123 (**фигура 26В**). За титрованием концентраций DART-A и контрольного DART следовало обнаружение с помощью CD3-биотин человека. На **фигурах 26С-26Е** продемонстрировано связывание клеточной поверхностью DART-A на CD123+ Molm-13 клетке-мишени (**фигура 26С**), Т-клетках человека (**фигура 26D**) и Т-клетках яванского макака (**фигура 26Е**). Связывание обнаруживали с помощью анализа FACS с использованием моноклонального антитела, специфического в отношении Е-спиральной и К-спиральной области молекулы DART-A или контрольного DART.

На **фигурах 27А-27Н** показана способность DART-A опосредовать перенаправленный цитоллиз клетки - мишени эффекторными клетками человек или обезьяны против CD123+ Kasumi-3 лейкозных клеточных линий, показана способность молекул связываться с подклассом нормальных циркулирующих в кровотоке лейкоцитов, включая в себя pDC и моноциты, и показана способность молекул подвергать деплеции CD14⁻CD123^{high} клетки (pDC и базофилы), не поражая моноциты (CD14⁺ клетки). На **фигуре 27А** показаны относительные сайты связывания с антителом к CD123-PE U937 и лейкозные клеточные линии Kasumi-3, определенные с помощью анализа QFACS. На **фигуре 27В** показана относительно низкая процентная цитотоксичность, опосредованная DART-A или контрольным DART на клеточной линии ОМЛ (клетках U937), которые, как показано на **фигуре 27А**, содержат относительно немного сайтов связывания с CD123). На **фигуре 27С** показана процентная цитотоксичность, опосредованная DART-A или контрольным DART в присутствии очищенных Т-клеток человека (в качестве эффекторных клеток) на клеточной линии ОМЛ (клетках Kasumi-3), которые, как показано на **фигуре 27А**, содержат значительное количество сайтов связывания с CD123. На **фигурах 27В-27С** соотношение Е:Т составляет 10:1. На **фигуре 27D** показана процентная цитотоксичность, опосредованная DART-A или контрольным DART в присутствии очищенных РВМС яванского макака (в качестве эффекторных клеток) на клетках Kasumi-3 (соотношение Е:Т составляет 15:1), и продемонстрировано, что DART-A может связываться с Т-клетками яванского макака. На **фигуре 27Е** показаны относительные сайты связывания с антителом к CD123-PE на клетках Kasumi-3, моноцитах человека, плазмацитоидных дендритных клетках человека ("pDC"), моноцитах яванского макака и плазмацитоидных дендритных клетках яванского

макака, что определяли с помощью анализа QFACS. На **фигуре 27F** показана способность DART-A подвергать деплеции CD14⁻ CD123^{lo} клетки. На **фигуре 27G** показана способность DART-A подвергать деплеции CD14⁻ CD123^{Hi} клетки человека. На **фигуре 27H** показана способность DART-A подвергать деплеции CD14⁻ CD123^{Hi} клетки яванского макака. Цитотоксичность определяли по высвобождению LDH, при этом значения EC50 определяли с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM®.

На **фигуре 28** показано применение двухкомпарментной модели для оценки фармакокинетических параметров DART-A. Данные показывают концентрации DART-A в сыворотке в конце инфузии (EOI) у яванских макаков после получения 96-часовой инфузии в дозе, составляющей 100 нг/кг/день, 300 нг/кг/день, 600 нг/кг/день и 1000 нг/кг/день. Каждая точка представляет отдельное животное; горизонтальные линии представляют среднее значение для группы дозирования.

На **фигурах 29А-29С** показан эффект инфузий DART-A на продукцию цитокина, IL-6. Содержания IL-6 в сыворотке (среднее ± SEM) у обезьян, которым вводили инфузии DART-A, показаны по группам лечения. Яванским макакам вводили инертный носитель – контроль в 1 день, после чего вводили 4 еженедельных инфузии или инертного носителя (группа 1) (**фигура 29А**), или DART-A, вводимого в виде 4-дневных инфузий каждую неделю, начиная с 8 дня, в 15, 22 и 29 день (группы 2-5) (**фигура 29В**) или в виде инфузии 7 дней в неделю в течение 4 недель, начиная на 8 день (группа 6) (**фигура 29С**). Интервалы лечения указаны серыми столбиками.

На **фигурах 30А-30F** показан эффект инфузий DART-A на деплецию CD14-/CD123+ клеток (**фигуры 30А-30С**) и CD303+ клеток (**фигуры 30D-30F**). Показано среднее ± SEM циркулирующих в кровотоке содержаний CD14-/CD123+ (**фигуры 30А-30С**) или CD303+ (**фигуры 30D-30F**) по дням исследования и группам. Яванским макакам вводили инертный носитель – контроль в 1 день, после чего вводили 4 еженедельных инфузии или инертного носителя (группа 1) (**фигуры 30А и 30D**), или DART-A, вводимого в виде 4-дневных инфузий каждую неделю, начиная с 8 дня, в 15, 22 и 29 день (группы 2-5) (**фигуры 30А и 30Е**) или в виде инфузии 7 дней в неделю в течение 4 недель, начиная на 8 день (группа 6) (**фигуры 30С и 30F**). Интервалы лечения указаны серыми столбиками.

На **фигуре 31А-31I** показаны наблюдаемые изменения в Т-клеточных популяциях (**фигуры 31А-31С**), CD4+ клеточных популяциях (**фигуры 31D-31F**) и CD8+ клеточных популяциях (**фигуры 31G-31I**), получающих DART-A, вводимое в

виде 4-дневных инфузий, начиная на 8 день, в 15, 22 и 29 день. Легенда: CD25+ (серые квадраты); CD69+ (серые треугольники), PD-1+ (белые треугольники); Tim-3+ (белые квадраты). Т-клетки подсчитывали с помощью маркеров CD4 и CD8, а не канонического CD3, для устранения возможного взаимовлияния со стороны DART-A. Яванским макакам вводили инертный носитель – контроль в 1 день, после чего вводили 4 еженедельных инфузии или инертного носителя (группа 1), или DART-A, вводимого в виде 4-дневных инфузий каждую неделю, начиная с 8 дня, в 15, 22 и 29 день (группа 5) или в виде инфузии 7 дней в неделю в течение 4 недель, начиная на 8 день (группа 6). Интервалы лечения указаны серыми столбиками. Показано среднее \pm SEM от абсолютного количества циркулирующих в кровотоке Т-клеток по дням исследования и группам (**фигуры 31A-31C**). Показаны относительные значения (средний процент \pm SEM) CD25+, CD69+, PD-1+ и Tim-3+ на CD4 (**фигуры 31D-31E**) или CD8 Т-клетках (**фигуры 31F-31H**) по дням исследования и группам.

На **фигуре 32A-32F** показаны наблюдаемые изменения в CD4+ Т-клеточных популяциях (**фигуры 32A-32C**) и CD8+ Т-клеточных популяциях (**фигуры 32D-32F**) во время и после непрерывной 7-дневной инфузии DART-A. Показано среднее \pm SEM в процентах от CD25+, CD69+, PD-1+ и Tim-3+ на CD4 (**фигуры 32A-32C**) или CD8 (**фигуры 32D-32F**) Т-клетках по дням исследования и группам 2, 3 и 4. Интервалы лечения указаны серыми столбиками. Легенда: CD25+ (серые квадраты); CD69+ (серые треугольники), PD-1+ (белые треугольники); Tim-3+ (белые квадраты).

На **фигуре 33A-33F** показаны наблюдаемые изменения в CD4+ Т-клеточных популяциях (**фигуры 33A-33C**) и CD8+ Т-клеточных популяциях (**фигуры 33D-33F**) во время и после непрерывной 7-дневной инфузии DART-A. Показано среднее \pm SEM в процентах от CD4+ наивных клеток (CD95-/CD28+), СМТ (CD95+/CD28+) и ЕМТ (CD95+/CD28-) Т-клеток в CD4+ популяции (**фигуры 33A-33C**) или CD8 популяции (**фигуры 33D-33F**) по дням исследования и группам 2, 3 и 4. Яванским макакам вводили инертный носитель – контроль в 1 день, после чего вводили 4 еженедельных инфузии или инертного носителя или DART-A, вводимого в виде 4-дневных инфузий каждую неделю, начиная с 8 дня, в 15, 22 и 29 день (группы 2-4). Интервалы лечения указаны серыми столбиками. Легенда: наивные клетки (белые треугольники); СМТ (черные треугольники), ЕМТ (серые квадраты).

На **фигуре 34** показана опосредованная DART-A цитотоксичность против клеток Kasumi-3 с РВМС либо от не подвергшихся воздействию обезьян, либо обезьян, получивших лечение с помощью многочисленных инфузий DART-A.

На **фигурах 35А-35F** показано, что воздействие DART-A повышало относительную частоту центральных CD4 клеток памяти и эффекторных CD8+ клеток памяти за счет соответствующей ранее не подверженной воздействиям Т-клеточной популяции. Показано среднее \pm SEM в процентах от CD4+ наивных клеток (CD95-/CD28+), CMT (CD95+/CD28+) и EMT (CD95+/CD28-) Т-клеток в CD4+ популяции (**фигуры 35А-35С**) или в CD8+ популяции (**фигуры 35D-35F** по дням исследования и группам. Яванским макакам вводили инертный носитель – контроль в 1 день, после чего вводили 4 еженедельных инфузии или инертного носителя (группа 1), или DART-A, вводимого в виде 4-дневных инфузий каждую неделю, начиная с 8 дня, в 15, 22 и 29 день (группа 5) или в виде инфузии 7 дней в неделю в течение 4 недель, начиная на 8 день (группа 6). Интервалы лечения указаны серыми столбиками. Легенда: наивные (белые треугольники); CMT (черные треугольники), EMT (серые квадраты).

На **фигурах 36А-36F** показан эффект DART-A на параметры эритроцитов у обезьян, которые получили инфузии молекул. Показаны содержания циркулирующих эритроцитов (**фигуры 36А-36С**) или ретикулоцитов (**фигуры 36D-36F**) (среднее \pm SEM) в образцах, собранных в указанные временные точки от обезьян, получивших лечение с помощью DART-A.

На **фигурах 37А-37В** показана частота встречаемости (средний процент \pm SEM) CD123+ клеток (**фигура 37А**) или HSC (CD34+/CD38-/CD45-/CD90+ клеток) (**фигура 37В**) в Lin- клеточной популяции в образцах костного мозга, собранных в указанные временные точки от обезьян, получивших лечение с помощью DART-A. Яванским макакам вводили инертный носитель – контроль в 1 день, после чего вводили 4 еженедельных инфузии или инертного носителя (группа 1), или DART-A, вводимого в виде 4-дневных инфузий каждую неделю, начиная с 8 дня, в 15, 22 и 29 день (группы 2-5) или в виде инфузии 7 дней в неделю в течение 4 недель, начиная на 8 день (группа 6).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим моновалентным диаталам, которые способны одновременно связываться с CD123 и CD3, и к применениям таких молекул в лечении гематологических злокачественных опухолей. Несмотря на то, что неоптимизированные CD123 x CD3 биспецифические диатела являются полностью функциональными, аналогично усовершенствованиям, полученным в экспрессии генов

посредством оптимизации кодонов (см., например, 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), возможно дополнительно усилить стабильность и/или функцию CD123 x CD3 биспецифических диател путем модификации или оптимизации их последовательностей.

Предпочтительные CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению состоят из по меньшей мере двух полипептидных цепей, которые ассоциируются друг с другом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD123, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (**фигура 2**). Отдельные полипептидные цепи диатела ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Каждая полипептидная цепь содержит антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи, антигенсвязывающий домен переменного домена тяжелой цепи и домен гетеродимеризации. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи от антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи. Антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи первой полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи второй полипептидной цепи с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или CD123, или CD3). Аналогично, антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи второй полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго антигена (т.е. или CD123, или CD3, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор антигенсвязывающего домена переменного домена легкой цепи и антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидных цепи совместно содержали антигенсвязывающие домены переменных доменов легкой и тяжелой цепи, способные связываться с CD123 и CD3.

Образование гетеродимеров первой и второй полипептидных цепей может управляться доменами гетеродимеризации. Такие домены включают в себя GVEPKSC (**SEQ ID NO:50**) (или VEPKSC; **SEQ ID NO:51**) на одной полипептидной цепи и GFNRGEC (**SEQ ID NO:52**) (или FNRGEC; **SEQ ID NO:53**) на другой полипептидной цепи (US2007/0004909). Альтернативно, такие домены можно сконструировать так, чтобы они содержали спирали противоположных зарядов. Домен гетеродимеризации одной из полипептидных цепей содержит последовательность по меньшей мере из шести, по меньшей мере из семи или по меньшей мере из восьми положительно заряженных аминокислот, и домен гетеродимеризации другой полипептидной цепи содержит последовательность по меньшей мере из шести, по меньшей мере из семи или по меньшей мере из восьми отрицательно заряженных аминокислот. Например, первый или второй домен гетеродимеризации предпочтительно будет содержать последовательность из восьми положительно заряженных аминокислот, и другой из доменов гетеродимеризации предпочтительно будет содержать последовательность из восьми отрицательно заряженных аминокислот. Положительно заряженная аминокислота может представлять собой лизин, аргинин, гистидин и т.д. и/или отрицательно заряженная аминокислота может представлять собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и т.д. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой лизин и/или отрицательно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой глутаминовую кислоту.

CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению сконструированы так, чтобы такие первые и вторые полипептидные цепи были ковалентно связаны друг с другом посредством цистеиновых остатков вдоль их длины. Такие цистеиновые остатки могут быть введены в промежуточный линкер, который отделяет домены VL и VH полипептидов. Альтернативно и более предпочтительно, второй пептид (линкер 2) введен в каждую из полипептидных цепей, например, на amino-конце полипептидных цепей или в положении, которое помещает линкер 2 между доменом гетеродимеризации и антигенсвязывающим доменом переменного домена легкой цепи или переменного домена тяжелой цепи.

Согласно конкретным вариантам осуществления характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению дополнительно содержат

домен Fc иммуноглобулина или альбуминсвязывающий домен для увеличения периода полужизни *in vivo*.

CD123 x CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению, которые содержат домен Fc иммуноглобулина (т.е. CD123 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела) состоят из первой полипептидной цепи, второй полипептидной цепи и третьей полипептидной цепи. Первая и вторая полипептидные цепи ассоциируются друг с другом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD123, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Первая полипептидная цепь и третья полипептидная цепь ассоциируются друг с другом с образованием домена Fc иммуноглобулина (**фигура 3А** и **фигура 3В**). Первая и вторая полипептидные цепи биспецифического моновалентного Fc - диатела ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи.

Первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Каждая из первой и второй полипептидных цепей содержит антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи, антигенсвязывающий домен переменного домена тяжелой цепи и домен гетеродимеризации. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи от антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи. Антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи первой полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи второй полипептидной цепи с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или CD123, или CD3). Аналогично, антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи второй полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго антигена (т.е. или CD3, или CD123, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор антигенсвязывающего домена переменного домена легкой цепи и антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи первой и второй

полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидные цепи совместно содержали антигенсвязывающие домены переменных доменов легкой и тяжелой цепи, способные связываться с CD123 и CD3. Каждая из первой и третьей полипептидных цепей содержат некоторую часть или весь домен CH2 и/или некоторую часть или весь домен CH3 полного домена Fc иммуноглобулина и цистеинсодержащий пептид. Некоторая часть или весь домен CH2 и/или некоторая часть или весь домен CH3 ассоциируются с образованием домена Fc иммуноглобулина биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению. Первая и третья полипептидные цепи биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах цистеинсодержащего пептида полипептидных цепей.

I. Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело, "DART-A"

Согласно настоящему изобретению предусмотрено характеризующееся оптимизированной последовательностью биспецифическое диатело, способное одновременно и специфически связываться с эпитопом CD123 и с эпитопом CD3 ("CD123 x CD3" биспецифическое диатело или DART-A). Как обсуждается ниже, обнаружено, что DART-A проявляет повышенную функциональную активность относительно других характеризующихся неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател сходного состава, и, в связи с этим, называется "характеризующееся оптимизированной последовательностью" CD123 x CD3 биспецифическое диатело.

Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь. Первая полипептидная цепь биспецифического диатела будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, переменный домен легкой цепи (домен VL) моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), переменный домен тяжелой цепи (домен VH) моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}), и C-конец. Предпочтительная последовательность такого домена VL_{CD3} представляет собой SEQ ID NO:21:

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQOKPGQAPRGLIGGTNKRA
PWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

Антигенсвязывающий домен VL_{CD3} содержит CDR1 **SEQ ID NO:38:** RSSTGAVTTSNYAN, CDR2 **SEQ ID NO:39:** GTNKRAP и CDR3 **SEQ ID NO:40:** ALWYSNLWV.

Предпочтительная последовательность такого линкера 1 представляет собой **SEQ ID NO:29:** GGGSGGGG. Предпочтительная последовательность такого домена VH_{CD123} представляет собой **SEQ ID NO:26:**

EVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAWYWGQGT
LTVVSS

Антигенсвязывающий домен VH_{CD123} содержит CDR1 **SEQ ID NO:47:** DYMK, CDR2 **SEQ ID NO:48:** DIIPSNGATFYNQKFKG и CDR3 **SEQ ID NO:49:** SHLLRAS.

Вторая полипептидная цепь будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}), промежуточный линкерный пептид (например, линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}), и C-конец. Предпочтительная последовательность такого домена VL_{CD123} представляет собой **SEQ ID NO:25:**

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLNQKNYLTWYQOKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK

Антигенсвязывающий домен VL_{CD123} содержит CDR1 **SEQ ID NO:44:** KSSQSLLNQKNYLT, CDR2 **SEQ ID NO:45:** WASTRES и CDR3 **SEQ ID NO:46:** QNDYSYPYTFGQGTKLEIK.

Предпочтительная последовательность такого домена VH_{CD3} представляет собой **SEQ ID NO:22:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAWYWGQGT
LTVVSS

Антигенсвязывающий домен VH_{CD3} содержит CDR1 **SEQ ID NO:41:** TYAMN, CDR2 **SEQ ID NO:42:** RIRSKYNNYATYYADSVKD и CDR3 **SEQ ID NO:43:** HGNFGNSYVSWFAWYWGQGT.

Характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению сконструированы так, чтобы первый и второй полипептиды были ковалентно связаны друг с другом

посредством цистеиновых остатков по их длине. Такие цистеиновые остатки могут быть введены в промежуточный линкер (например, линкер 1), который отделяет домены VL и VH полипептидов. Альтернативно и более предпочтительно, второй пептид (линкер 2) введен в каждую полипептидную цепь, например, в положении на N-конце относительно домена VL или на C-конце относительно домена VH такой полипептидной цепи. Предпочтительная последовательность такого линкера 2 представляет собой **SEQ ID NO:30**: GGCGGG.

Образование гетеродимеров может управляться с помощью дополнительной инженерии таких полипептидных цепей, чтобы они содержали полипептидные спирали противоположных зарядов. Таким образом, согласно предпочтительному варианту осуществления одна из полипептидных цепей будет сконструирована так, чтобы она содержала “Е-спиральный” домен (**SEQ ID NO:34**: EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK), чьи остатки образуют отрицательный заряд при pH 7, тогда как другая из двух полипептидных цепей будет сконструирована так, чтобы содержать “К-спиральный” домен (**SEQ ID NO:35**: KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE), чьи остатки образуют положительный заряд при pH 7. Присутствие таких заряженных доменов обеспечивает ассоциацию между первым и вторым полипептидами и, таким образом, способствует гетеродимеризации.

Несущественно, которая спираль обеспечивается первой или второй полипептидными цепями. Тем не менее, предпочтительное характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело согласно настоящему изобретению (“DART-A”) содержит первую полипептидную цепь, характеризующуюся следующей последовательностью (**SEQ ID NO:1**):

QAVVTQEPSTLVSPGGTIVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA
PWT PARFSGSLLGGKAALITGAQAEDEADYICALWYNSLWVFGGGTKLTVLGGGGS
GGGGEVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTDYMKWVRQAPGGGLEWIGDIIP
SNGATFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSHLLRASWFAYW
GGTTLVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Цепь 1 DART-A состоит из следующего: **SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:26 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:34**. Кодирующей цепью 1 DART-A полинуклеотид представляет собой **SEQ ID NO:2**:

caggctgtgggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcgggaactgtgacc
ctgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgcccaattgggtg
cagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcgggggtacaacaaaagggt
ccctggaccctgcacgggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgact
attaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagc
aatctgtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgctgggaggggggtggatcc

ggcggcggagggcgaggtgcagctggtgcagtcggggctgagctgaagaaacccgga
gcttccgtgaaggtgtcttgcaaagccagtggtacaccttcacagactactatatg
aagtgggtcagggcaggctccaggacagggactggaatggatcgggcagatattcct
tccaacggggccactttctacaatcagaagttaaaggcagggtgactattaccgtg
gacaaatcaacaagcactgcttatatggagctgagctccctgcgctctgaagataca
gccgtgtactattgtgctcgggtcacacctgctgagagccagctggtttgcttattgg
ggacagggcaccctgggtgacagtgcttccggaggatgtggcgggtggagaagtggcc
gcactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggag
gtcgcagccctggagaaa

Вторая полипептидная цепь DART-A характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:3**):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVDPDRFSGSGSDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKG
GGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGR
IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YVSWFAYWGQGLVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Цепь 2 DART-A состоит из следующего: **SEQ ID NO:25 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:22 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:35**. Кодированная цепь 2 DART-A полинуклеотид представляет собой **SEQ ID NO:4**:

gacttcgtgatgacacagtcctcctgatagtcctggccgtgagtcctgggggagcgggtg
actatgtcttgcaagagctcccagtcactgctgaacagcggaaatcagaaaaactat
ctgacctggtaccagcagaagccagggcagccccctaaactgctgatctattgggct
tccaccagggaaatctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcacagat
ttaccctgacaatttctagtcctgcaggccgaggacgtggctgtgtactattgtcag
aatgattacagctatccctacactttcggccaggggaccaagctggaaattaaagga
ggcggatccggcggcggaggcgaggtgcagctgggtggagtctgggggaggcttggtc
cagcctggagggctccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcaca
tacgctatgaattgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggttggagg
atcagggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaaggataga
ttcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctg
aaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattct
tacgtgtcttggtttgcttattggggacaggggacactggtgactgtgtcttccgga
ggatgtggcgggtggaaaagtggccgactgaaggagaaagttgctgctttgaaagag
aaggtcgccgacttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag

Как обсуждается ниже, обнаружено, что характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диалело (DART-A) характеризуется способностью одновременно связывать CD123 и CD3 клетки как человека, так и обезьяны. Обнаружено, что обеспечение DART-A вызывало Т-клеточную активацию, опосредовало уменьшение бластных клеток, управляло экспансией Т-клеточной популяции, индуцировало Т-клеточную активацию и вызывало перенаправленный цитолиз злокачественных клеток - мишеней.

II. Характеризующееся неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело сравнения, “DART-B”

DART-B представляет собой характеризующееся неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело, характеризующееся макроструктурой, сходной с таковой у DART-A. Первая полипептидная цепь DART-B будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}), промежуточный линкер 2, E-спиральный домен и C-конец. Домен VL_{CD3} первой полипептидной цепи DART-B характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO:23):

DIQLTQSPAIMASASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV
PYRFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

Домен VH_{CD123} первой полипептидной цепи DART-B характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO:28):

QVQLVQSGAELKPKGASVKVSCKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSS

Таким образом, цепь 1 DART-B состоит из следующего: **SEQ ID NO:23 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:28 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:34**. Последовательность первой полипептидной цепи DART-B представляет собой следующее (SEQ ID NO:5):

DIQLTQSPAIMASASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV
PYRFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKGGGSGGGG
QVQLVQSGAELKPKGASVKVSCKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Кодирующей цепь 1 DART-B полинуклеотид представляет собой **SEQ ID NO:6:**

gacattcagctgacccagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtc
accatgacctgcagagccagttcaagtgttaagttacatgaactggtaccagcagaag
tcaggcacctccccaaaagatggatttatgacacatccaagtggtctctggagtc
ccttatcgcttcagtggtcagtggtctgggacctcactctctcacaatcagcagc
atggaggctgaagatgctgaccttattactgccaacagtggtgtagtaaccgctc
acgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaaggaggcggatccggcggcggaggc
caggtgcagctggtgcagtcagggtgagctgaagaaccggagcttccgtgaag
gtgtcttgcaagccagtggttacaccttcacagactactatatgaagtgggtcagg
caggctccaggacagggactggaatggatcgggcgaatcattcctccaacggggcc
actttctacaatcagaagtttaaggcaggggtgactattaccgtggacaaatcaaca
agcactgcttatatggagctgagctccctgctctgaagatacagccgtgtactat
tgtgctcggtcacacctgctgagagccagctgggtttgcttattggggacagggcacc
ctggtgacagtgcttccggaggatgtggcgggtggagaagtggccgcactggagaaa

gaggttgctgctttggagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgcagccctg
gagaaa

Вторая полипептидная цепь DART-B будет содержать, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1) и домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}), промежуточный линкер 2, К-спиральный домен и С-конец.

Домен VL_{CD123} второй полипептидной цепи DART-B характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:27**):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK

Домен VH_{CD3} второй полипептидной цепи DART-B характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:24**):

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLTVSS

Таким образом, цепь 2 DART-B состоит из следующего: **SEQ ID NO:27 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:24 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:35**. Последовательность второй полипептидной цепи DART-B представляет собой следующее (**SEQ ID NO:7**):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGSGGGGDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Кодирующей цепь 2 DART-B полинуклеотид представляет собой **SEQ ID NO:8**:

Gacttcgtgatgacacagtcctcctgatagtcctggccgtgagtcctgggggagcggggtgactatgtcttgcaagagctcccagtcactgctgaacagcggaaatcagaaaaactatctgacctggtaccagcagaagccagggccagccccctaaactgctgatctattgggcttccaccagggaaatctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcacagattttaccctgacaatttctagtcctgcaggccgaggacgtggctgtgtactattgtcagaatgattacagctatccctacactttcggccaggggaccaagctggaaattaaaggaggcggatccggcggcggaggcgatatcaactgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctcagtgaaagatgtcctgcaagacttctggctacacctttactaggtacacgatgcactgggtaaacagaggcctggacaggggtctggaatggattggatacattaatcctagccgtggttataactaattacaatcagaagttcaaggacaaggccacattgactacagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagtcctattactgtgcaagatattatgatgatcattactgccttgactactggggccaaggcaccactctcacagtcctcctccggaggatgtggcggtggaagagtgggccgactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaagggtcgccgcacttaaggaaaagggtcgcagccctgaaagag

III. Модифицированные варианты характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A)

A. Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-A с ABD "w/ABD")

Согласно второму варианту осуществления согласно настоящему изобретению характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) будет содержать один или несколько альбуминсвязывающих доменов ("ABD") (DART-A с ABD "w/ABD") на одной или обеих полипептидных цепях диатела.

Как раскрыто в международной патентной публикации № WO 2012/018687, для улучшения *in vivo* фармакокинетических свойств диател диатела можно модифицировать так, чтобы они содержали полипептидную часть белка, связывающегося с сывороточными белками, на одном или нескольких концах диатела. Такая полипептидная часть белка, связывающегося с сывороточными белками, наиболее предпочтительно будет встроена на С-конце молекулы диатела. Особенно предпочтительная полипептидная часть белка, связывающегося с сывороточными белками, для этой цели представляет собой альбуминсвязывающий домен (ABD) из белка G стрептококка. Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus G148* является особенно предпочтительным.

Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus G148* состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильный трехспиральную структуру и характеризуется широкой альбуминсвязывающей специфичностью (Johansson, M.U. *et al.* (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules,*" *J. Biol. Chem.* 277(10):8114-8120). Альбумин представляет собой наиболее распространенный белок в плазме и характеризуется периодом полувыведения, составляющим 19 дней у людей. Альбумин содержит несколько низкомолекулярных сайтов связывания, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и, тем самым, продлевать их периоды полужизни в сыворотке.

Таким образом, первая полипептидная цепь такого характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела,

содержащего альбуминсвязывающий домен, содержит третьей линкер (линкер 3), который отделяет E-спираль (или K-спираль) такой полипептидной цепи от альбуминсвязывающего домена. Предпочтительная последовательность такого линкера 3 представляет собой **SEQ ID NO:31**: GGGG. Предпочтительный альбуминсвязывающий домен (**ABD**) характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:36**): LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP.

Таким образом, предпочтительная первая цепь характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:9**):

QAVVTQEPSTLVSPGGTIVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRA
 PWTPARFSGSLLGGKAALITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGS
 GGGGEVQLVQSGAELKKGASVKVSKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIP
 SNGATFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSHLLRASWFAYW
 GQGTLVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGSLAEAKVLAN
 RELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен, состоит из: **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**. Полинуклеотид, кодирующий такое характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 диатело, содержащее дериватив альбуминсвязывающего домена, представляет собой **SEQ ID NO:10**:

caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtccccaggcggaaactgtgacc
 ctgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtg
 cagcagaagccaggacaggcaccaagggcctgatcgggggtacaaacaaaagggt
 ccctggaccctgcacggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgact
 attaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagc
 aatctgtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgctgggaggggggtggatcc
 ggcgccggaggcgaggtgcagctggtgcagtcggggctgagctgaagaaacccgga
 gcttccgtgaaggtgtcttgcaagccagtggtacaccttcacagactactatatg
 aagtgggtcaggcaggctccaggacaggactggaatggatcggcgatatcattcct
 tccaacggggccactttctacaatcagaagtttaaaggcagggtgactattaccgtg
 gacaaatcaacaagcactgcttatatggagctgagctccctgcgctctgaagataca
 gccgtgactattgtgctcggtcacacctgctgagagccagctggtttgcttattgg
 ggacagggcacccctggtgacagtgcttccggaggatgtggcggtggagaagtggcc
 gactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggag
 gtcgcagccctggagaaaggcggcggtctctggccgaagcaaaagtgtggccaac
 cggaactggataaatatggcgtgagcgattattataagaacctgattgacaacgca
 aatccgcggaaggcgtgaaagcactgattgatgaaattctggccgcccctgcct

Вторая полипептидная цепь такого характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен, характеризуется последовательностью, описанной выше (SEQ ID NO:3), и кодируется полинуклеотидом, характеризующимся последовательностью SEQ ID NO:4.

В. Характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела, содержащие домен Fc IgG (DART-A с Fc “w/Fc”)

Согласно третьему варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрено характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело, состоящее из трех полипептидных цепей и содержащее домен Fc IgG (версия 1 и версия 2 DART-A с Fc “w/Fc”) (фигура 3А-3В).

Для образования такого домена Fc IgG первая и третья полипептидная цепь диатела содержат, в направлении от N-конца к С-концу, цистеинсодержащий пептид, (наиболее предпочтительно пептид 1, характеризующийся аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO:55): DKTHTCPPCP), некоторую часть или весь домен CH2 и/или некоторую часть или весь домен CH3 полного домена Fc иммуноглобулина и С-конец. Некоторая часть или весь домен CH2 и/или некоторая часть или весь домен CH3 ассоциируются с образованием домена Fc иммуноглобулина биспецифических моновалентных содержащих Fc домен диател согласно настоящему изобретению. Первая и вторая полипептидные цепи биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах цистеинсодержащего пептида полипептидных цепей.

Домены CH2 и/или CH3 первого и третьего полипептидов необязательно должны быть идентичными и предпочтительно модифицированы так, чтобы содействовать образованию комплекса между двумя полипептидами. Например, аминокислотная замена (предпочтительно замена на аминокислоту, содержащую объемную боковую группу, образующую ‘выступ’, например, триптофан) может быть введена в домен CH2 или CH3 так, чтобы стерическое влияние предотвращало взаимодействие с аналогично мутированным доменом и вынуждало мутированный

домен образовывать пару с доменом, в котором была сконструирована комплементарная, или обеспечивающая размещение мутация, т.е. 'впадина' (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций можно сконструировать в любой паре полипептидов, содержащих молекулу биспецифического моновалентного Fc - диатела, и, кроме того, сконструировать в любой части полипептидных цепей указанной пары. Способы белковой инженерии, чтобы способствовать гетеродимеризации вместо гомодимеризации, хорошо известны в настоящей области техники, в частности, в отношении инженерии иммуноглобулиноподобных молекул, и предусмотрены в настоящем документе (см., например, 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; каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Предпочтительно, что 'выступ' конструируют в доменах CH2-CH3 первой полипептидной цепи, а 'впадину' конструируют в доменах CH2-CH3 третьей полипептидной цепи. Таким образом, 'выступ' будет содействовать в предотвращении гомодимеризации первой полипептидной цепи посредством своих доменов CH2 и/или CH3. Поскольку третья полипептидная цепь предпочтительно содержит замену, обеспечивающую образование 'впадины', она будет гетеродимеризоваться с первой полипептидной цепью, а также гомодимеризоваться самим с собой. Предпочтительный выступ создается путем модификации домена Fc нативного домена Fc IgG так, чтобы она содержала модификацию T366W. Предпочтительная впадина создается путем модификации домена Fc нативного домена Fc IgG, чтобы она содержала модификацию T366S, L368A и Y407V. Для содействия в очищении гомодимера третьей полипептидной цепи от конечного биспецифического моновалентного Fc - диатела, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, сайт связывания с белком А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно подвергают мутации с помощью аминокислотной замены в положении 435 (H435R). Таким образом, гомодимер третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком А, тогда как биспецифическое моновалентное Fc - диатело будет сохранять свою способность связывать белок А через сайт связывания с белком А на первой полипептидной цепи.

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела, присутствующего в первой полипептидной цепи, представляет собой (**SEQ ID NO:56**):

APAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPR
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела, присутствующего в третьей полипептидной цепи, представляет собой (**SEQ ID NO:11**):

APAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPR
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

С. Конструкт версии 1 DART-A w/Fc

Чтобы проиллюстрировать такие Fc – диатела, согласно настоящему изобретению предусмотрен конструкт версии 1 DART-A w/Fc. Первый полипептид конструкта версии 1 DART-A w/Fc содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}), линкер 2, E-спиральный домен, линкер 5, пептид 1, полипептид, который содержит домены CH2 и CH3 домена Fc, и C-конец. Предпочтительный линкер 5 характеризуется последовательностью (**SEQ ID NO:32**): GGG. Предпочтительный полипептид, который содержит домены CH2 и CH3 домена Fc, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:37**):

APAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPR
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Таким образом, первый полипептид такого конструкта версии 1 DART-A w/Fc состоит из следующего : **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**.

Предпочтительная последовательность первого полипептида такого конструкта версии 1 DART-A w/Fc характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:13**):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLNQKQNYLTVYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSIQAEADVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKG

GGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGR
 IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
 YVSWFAYWGQGLVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDK
 THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK

Предпочтительный полинуклеотид, кодирующий такой полипептид, представляет собой (SEQ ID NO:14):

gacttcgtgatgacacagtcctcctgatagtcctggccgtgagtcctgggggagcgggtg
 actatgtcttgcaagagctcccagtcactgctgaacagcggaaatcagaaaaactat
 ctgacctggtaccagcagaagccagccagccccctaaactgctgatctattgggct
 tccaccagggaaatctggcgtgcccgacagattcagcggcagcggcagcggcacagat
 ttaccctgacaatttctagtcctgcaggccgaggacgtggctgtgtactattgtcag
 aatgattacagctatccctacactttcggccaggggaccaagctggaaattaaagga
 ggccgatccggcggcggagggcaggtgcagctggaggctctgggggaggcttggtc
 cagcctggagggtccttgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcaca
 tacgctatgaattgggtccgccaggctccagggaaagggctggagtggggttggaaag
 atcaggtccaagtacaacaattatgcaacactactatgccgactctgtgaaggataga
 ttcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctg
 aaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattct
 tacgtgtcttggtttgcttattggggacaggggacactggtgactgtgtcttccgga
 ggatgtggcgggtggagaagtggccgactggagaaagaggttgctgctttggagaag
 gaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaaggcggcggggacaaa
 actcacacatgccaccgtgcccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtcctc
 ctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcaca
 tgctgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagctg
 gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagc
 acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag
 gagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatc
 tccaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
 gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtgggtgcctgggtcaaaggcttctatccc
 agcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaaactacaagacc
 acgctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtg
 gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct
 ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

Вторая цепь такого конструктора версии 1 DART-A w/Fc будет содержать, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}), линкер 2, К-спиральный домен и С-конец. Таким образом, второй полипептид такого конструктора версии 1 DART-A w/Fc состоит из следующего: SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:26 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:35. Такой полипептид характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO:15):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQOKPGQAPRGLIGGTNKRA
 PWTPARFSGSLLGGKAALITGAQAEDEADYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGS
 GGGGEVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIP
 SNGATFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSHLLRASWFAYW
 GQGLTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Предпочтительный полинуклеотид, кодирующий такой полипептид, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:16**):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaaactgtgacc
 ctgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaaattgggtg
 cagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcgggggtacaaacaaaagggtc
 ccctggaccctgcacggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgact
 attaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagc
 aatctgtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgctgggaggggggtggatcc
 ggcgccggaggcgcaggtgcagctggtgcagtcggggctgagctgaagaaacccgga
 gcttccgtgaaggtgtcttgcaaagccagtggtacaccttcacagactactatag
 aagtgggtcaggcaggctccaggacagggactggaatggatcggcgatatcattcct
 tccaacggggccactttctacaatcagaagtttaaaggcagggtgactattaccgtg
 gacaaatcaacaagcactgcttatatggagctgagctccctgcgctctgaagataca
 gccgtgtactattgtgctcgggtcacacctgctgagagccagctgggttgcttattgg
 ggacagggcacccctgggtgacagtgcttccggaggatgtggcggtggaaaagtggcc
 gcactgaaggagaaagtgtgctgtttgaaagagaaggtcgcccacttaaggaaaag
 gtcgcagccctgaaagag

Третья полипептидная цепь такой версии 1 DART-A w/Fc будет содержать домены CH2 и CH3 домена Fc IgG. Предпочтительный полипептид состоит из пептида 1 (**SEQ ID NO:55**) и доменов CH2 и CH3 домена Fc (**SEQ ID NO:11**) и характеризуется последовательностью **SEQ ID NO:54**:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует такой полипептид, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:12**):

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcggggggaccgtca
 gtcttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgag
 gtcacatgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactgg
 tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtac
 aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat
 ggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaa
 accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagggtgtacaccctgccccca
 tccccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgagttgcgagtcacaaaggcttc
 tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagacaactac
 aagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctgctcagcaagctc
 accgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
 gaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

D. Конструкт версии 2 DART-A w/Fc

В качестве второго примера такого диатела DART-A w/Fc, согласно настоящему изобретению предусмотрено трехцепочечное диатело, “версия 2 диатела DART-A w/Fc” (фигура 3B).

Первый полипептид такого конструкта версии 2 DART-A w/Fc содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, пептидный линкер (пептид 1), полипептид, который содержит домены CH2 и CH3 домена Fc, соединенный (посредством линкера 4) с доменом VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}), линкер 2, К-спиральный домен и C-конец.

Предпочтительный полипептид, который содержит домены CH2 и CH3 домена Fc, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO:37):

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPR
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

“Линкер 4” предпочтительно будет содержать аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:57): APSSS. Предпочтительный “линкер 4” характеризуется последовательностью (SEQ ID NO:33): APSSSPME. Таким образом, первый полипептид такого конструкта версии 2DART-A w/Fc состоит из следующего: 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. Полипептид, характеризующийся такой последовательностью, представляет собой (SEQ ID NO:17):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKA
PSSSPMEDFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLSGNQKNYLTWYQQKPGQPP
KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQG
TKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGK
GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAAL
KE

Предпочтительный полинуклеотид, кодирующий такой полипептид, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO:18):

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcggggggaccgtcag
gtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgag
gtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgg
tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtac
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat
ggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaa
accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccca
tccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctgggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactac
aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctc
accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaagcc
ccttccagctcccctatggaagacttctgtgatgacacagtctcctgatagtctggcc
gtgagtctgggggagcgggtgactatgtcttgcaagagctcccagtcactgctgaac
agcggaaatcagaaaaactatctgacctggtaccagcagaagccaggccagccccct
aaactgctgatctattgggcttccaccaggggaatctggcgtgcccagacagattcagc
ggcagcggcagcggcacagattttaccctgacaatttctagtctgcaggccgaggac
gtggctgtgtactattgtcagaatgattacagctatccctacactttcggccagggg
accaagctggaaattaagggaggcggatccggcggcggaggcaggtgcagctggtg
gagtctgggggaggcttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcc
tctggattcaccttcagcacatacgctatgaattgggtccgccaggctccaggggaag
gggctggagtgggttggaaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactat
gccgactctgtgaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactg
tatctgcaaataaacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgaga
cacggtaacttcggcaattcttacgtgtcttgggttcttattggggacaggggaca
ctgggtgactgtgtcttccggaggatgtggcgggtggaaaagtggccgactgaaggag
aaagttgctgctttgaaagagaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgcagccctg
aaagag

Вторая полипептидная цепь такого конструктора версии 2 DART-A w/Fc содержит, в направлении от N-конца к C-концу, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1) и домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}). Указанная часть молекулы соединена (посредством линкера 2) с E-спиральным доменом. Таким образом, третий полипептид такого конструктора версии 2 DART-A w/Fc состоит из следующего: **SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:26 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:34**. Полипептид, характеризующийся такой последовательностью, представляет собой (**SEQ ID NO:1**), и предпочтительно кодируется полинуклеотидом, характеризующимся последовательностью **SEQ ID NO:2**.

Третья полипептидная цепь будет содержать домены CH2 и CH3 домена Fc IgG. Предпочтительный полипептид состоит из пептида 1 (**SEQ ID NO:55**) и доменов CH2 и CH3 домена Fc (**SEQ ID NO:11**) и характеризуется последовательностью **SEQ ID NO:54**.

Для оценки активности вышеупомянутых CD123 x CD3 биспецифических диател (DART-A, DART-A w/ABD, DART-A w/Fc, DART-B) получили контрольное биспецифическое диатело (контрольное DART). Контрольное DART способно одновременно связываться с FITC и CD3. Его две полипептидных цепи характеризуются следующими соответствующими последовательностями:

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

DVVMTQTPFSLPVSLSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVS
 NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKGG
 GSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI
 RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY
 VSWFAYWGQGTLLVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

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

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRA
 PWT PARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGS
 GGGGEVKLDETTGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRN
 KPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ
 GTSVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

IV. Фармацевтические композиции

Композиции согласно настоящему изобретению включают в себя композиции нерасфасованного лекарственного средства, пригодные в производстве фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т.е. композиций, которые являются подходящими для введения субъекту или пациенту), которые можно использовать в получении стандартных лекарственных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател согласно настоящему изобретению или комбинацию таких средств и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат профилактически или терапевтически эффективное количество характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению и второе терапевтическое антитело (например, опухолеспецифическое моноклональное

антитело), которое является специфическим в отношении конкретного антигена злокачественной опухоли, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно конкретному варианту осуществления термин “фармацевтически приемлемый” означает одобренный регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у людей. Термин “носитель” относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательное вещество или инертный носитель, с которым водят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая в себя масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и подобное. Вода представляет собой предпочтительный носитель, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и растворы глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и подобное. Композиция при необходимости также может содержать незначительные количества смачивающих средств или эмульгаторов, или рН буферных средств. Указанные композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, драже, капсул, порошков, составов замедленного высвобождения и подобное.

Как правило, ингредиенты композиций согласно настоящему изобретению поставляются либо отдельно, либо смешанными вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически запаянном контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного средства. Если композиция предназначена для введения с помощью инфузии, она может продаваться с инфузионным флаконом, содержащим стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Если композиция предназначена для введения с помощью инъекции, ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором может быть предоставлена с тем, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены в состав в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя без ограничения соли, образованные такими анионами, как анионы, происходящие из соляной, ортофосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные катионами, такими как катионы, происходящие из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен фармацевтический пакет или набор, содержащий одна или несколько контейнеров, заполненных характеризующимися оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическими диателами согласно настоящему изобретению отдельно или таким фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтический пакет или набор. Согласно настоящему изобретению также предусмотрен фармацевтический пакет или набор, содержащий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Необязательно такой(ие) контейнер(ы) может сопровождать уведомление в форме, предусмотренной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, причем указанное уведомление отражает разрешение соответствующим органом производства, применения или продажи для введению людям.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены наборы, которые можно использовать в описанных выше способах. Набор может содержать характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению. Набор может дополнительно содержать одно или несколько другие профилактических и/или терапевтических средств, пригодных для лечения злокачественной опухоли, в одном или нескольких контейнерах; и/или набор может дополнительно содержать одно или несколько цитотоксических антител, которые связываются с одним или несколькими антигенами злокачественной опухоли, связанными со злокачественной опухолью. Согласно определенным вариантам осуществления другое профилактическое или терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Согласно другим вариантам осуществления

профилактическое или терапевтическое средство представляет собой биологическое или гормональное терапевтическое средство.

V. Способы введения

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть предусмотрены для лечения, профилактики и уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества белка слияния или конъюгированной молекулы согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей белок слияния или конъюгированную молекулу согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительному аспекту такие композиции являются по существу очищенными (т.е. по существу не содержат веществ, которые ограничивают ее действие или производят нежелательные побочные эффекты). Согласно конкретному варианту осуществления субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, такое как не относящееся к приматам млекопитающее (например, корова, лошадь, кошка, собака, грызун и т.д.) или примат (например, обезьяна, такая как яванский макак, человек и т.д.). Согласно предпочтительному варианту осуществления субъект представляет собой человека.

Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения композиций согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или слитый белок, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu *et al.* (1987) "*Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System*," J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструкция из нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения молекулы согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения парентеральное введение (например, интрадермальное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозальное введение (например, интраназальный и пероральный пути). Согласно конкретному варианту осуществления характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным путем, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, путем поглощения через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки

(например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, пульмонарное введение также можно использовать, например, с помощью применения ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным средством. См., например, патенты США №№ 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540 и 4880078 и международные патентные публикации согласно РСТ №№ WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено, что характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению упакованы в герметически запаянный контейнер, такой как ампула или саше с указанием количества молекулы. Согласно одному варианту осуществления характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически запаянном контейнере и его можно развести, например, водой или солевым раствором до соответствующей концентрации для введения субъекту. Характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно поставляют в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметически запаянном контейнере в стандартной дозировке, составляющей по меньшей мере 5 мкг, более предпочтительно по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 15 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 100 мкг или по меньшей мере 200 мкг.

Лиофилизированные характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению необходимо хранить при температуре от 2 до 8°C в их оригинальном контейнере и молекулы необходимо вводить не позднее чем через 12 часов, предпочтительно не позднее чем через 6 часов, не позднее чем через 5 часов, не позднее чем через 3 часа или не позднее чем через 1 час после их разведения. Согласно альтернативному варианту осуществления характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению поставляют в жидкой форме в герметически запаянном контейнере с

указанием количества и концентрации молекулы, слитого белка или конъюгированной молекулы. Жидкую форму характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател согласно настоящему изобретению предпочтительно поставляют в герметически запаянном контейнере, в котором молекулы находятся в концентрации, составляющей по меньшей мере 1 мкг/мл, более предпочтительно по меньшей мере 2,5 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или по меньшей мере 100 мкг/мл.

Количество композиции согласно настоящему изобретению, которое будет эффективным в лечении, профилактике или уменьшении интенсивности одного или нескольких связанных с нарушением симптомов, можно определить с помощью стандартных клинических техник. Точная доза, применяемая в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности состояния, и должна определяться в соответствии с решением лечащего врача и всех соответствующих обстоятельств пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости от дозы из *in vitro* тестовых систем или тестовых систем - животных моделей.

Для предусмотренных настоящим изобретением характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател вводимую пациенту дозировку предпочтительно определяют на основании массы тела (кг) субъекта - реципиента. Вводимая дозировка, как правило, составляет от по меньшей мере приблизительно 0,3 нг/кг в день до приблизительно 0,9 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 1 нг/кг в день до приблизительно 3 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 3 нг/кг в день до приблизительно 9 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 10 нг/кг в день до приблизительно 30 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 30 нг/кг в день до приблизительно 90 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 100 нг/кг в день до приблизительно 300 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 200 нг/кг в день до приблизительно 600 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 300 нг/кг в день до приблизительно 900 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 400 нг/кг в день до приблизительно 800 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 500 нг/кг в день до приблизительно 1000 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 600 нг/кг в день до приблизительно 1000 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 700 нг/кг в день до приблизительно 1000 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 800 нг/кг в день до приблизительно 1000 нг/кг в день, от по меньшей мере приблизительно 900 нг/кг в

день до приблизительно 1000 нг/кг в день или по меньшей мере приблизительно 1000 нг/кг в день.

Согласно другому варианту осуществления пациенту вводят схему лечения, предусматривающую одну или несколько доз такого профилактически или терапевтически эффективного количества характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател, предусмотренных согласно настоящему изобретению, причем схему лечения вводят в течение 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней. Согласно определенным вариантам осуществления схема лечения предусматривает периодическое введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател, предусмотренных согласно настоящему изобретению (например, введение дозы в 1 день, 2 день, 3 день и 4 день данной недели и отсутствие введения доз профилактически или терапевтически эффективного количества характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател, предусмотренных согласно настоящему изобретению в 5 день, 6 день и 7 день этой же недели). Как правило, проводят 1, 2, 3, 4, 5 или больше курсов лечения. Каждый курс может проходить по одинаковой схеме или по различным схемам.

Согласно другому варианту осуществления вводимая доза увеличивается за первую четверть, первую половину или первые две трети или три четверти схемы(схем) (например, за первую, вторую или третью схему лечения из 4 курсов), пока не будет достигнуто дневное профилактически или терапевтически эффективное количество характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател.

В **таблице 1** представлены 5 примеров различных схем дозировок, описанных выше, для типичного курса лечения.

Таблица 1						
Схема	День	Дозировка диатела (нг диатела на кг массы тела субъекта в день)				
		1	1, 2, 3, 4	100	100	100
	5, 6, 7	нет	нет	нет	нет	нет
2	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	нет	нет	нет	нет	нет
3	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	нет	нет	нет	нет	нет

4	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	нет	нет	нет	нет	нет

Дозировку и частоту введения характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател согласно настоящему изобретению снизить или изменить путем усиления поглощения и проникновения характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател в ткани с помощью таких модификаций, как, например, липидизация.

Вводимую пациенту дозировку характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател согласно настоящему изобретению можно рассчитать для применения в качестве монотерапии. Альтернативно, характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению используют в комбинации другими терапевтическими композициями, и вводимая пациенту дозировка является меньше, чем при использовании указанных молекул в качестве монотерапии.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить местно в нуждающуюся в лечении область; этого можно достичь, например, без ограничения с помощью местной инфузии, инъекции или посредством имплантата, причем указанный имплантат изготовлен из пористого, непористого или желатинообразного материала, включая в себя такие мембраны, как мембраны Sialastic, или волокна. При введении молекулы согласно настоящему изобретению предпочтительно необходимо уделить внимание применению материалов, которые не абсорбируют молекулу.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть доставлены в везикуле, в частности липосоме (см. 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. 317-327; см., главным образом, там же).

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть доставлены в системе контролируемого или замедленного высвобождения. Любую технику, известную специалисту в настоящей области техники, можно использовать для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одно или несколько характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3

биспецифических диател согласно настоящему изобретению. См., например, патент США № 4526938; международные патентные публикации согласно 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; и Lam *et al.* (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно одному варианту осуществления насос можно использовать в системе контролируемого высвобождения (См. Langer, *panee*; 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; и Saudek *et al.* (1989) *"A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery,"* N. Engl. J. Med. 321:574-579). Согласно другому варианту осуществления полимерные материалы можно использовать для достижения контролируемого высвобождения молекул (см., например, 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); патенты США №№ 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; 5128326; международные патентные публикации согласно PCT №№ WO 99/15154 и WO 99/20253). Примеры полимеров, используемых в составах замедленного высвобождения, включают в себя без ограничения полимер 2-гидроксиэтилметакрилата, полимер метилметакрилата, полимер акриловой кислоты, сополимер этилена и винилацетата, полимер метакриловой кислоты, полигликолиды (PLG), полиангидриды, полимер N-винилпирролидона, полимер винилового спирта, полиакриламид, полиэтиленгликоль,

полилактиды (PLA), сополимер лактидов и гликолидов (PLGA) и полиортоэфир. систему контролируемого высвобождения можно разместить вблизи к терапевтической мишени (например, легким), таким образом, будет необходима только доля системной дозы (см., например, Goodson, в *MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, ранее*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Композиции, пригодные в качестве имплантатов контролируемого высвобождения, можно использовать согласно Dunn с соавт. (см. патент США № 5945155). Указанный конкретный способ основан на терапевтическом эффекте *in situ* контролируемого высвобождения биоактивного материала из полимерной системы. Имплантация, как правило, происходит в любом месте в организме пациента, нуждающегося в терапевтическом лечении. Можно использовать неполимерную систему замедленной доставки, при помощи которой неполимерный имплантат в организме субъекта используется в качестве системы доставки лекарственного средства. При имплантации в организм органический растворитель имплантата будет рассеиваться, диспергироваться или выщелачиваться из композиции в окружающую тканевую жидкость, и неполимерный материал будет постепенно коагулировать или осаждаться с образованием твердой, микропористой матрицы (см. патент США № 5888533).

Системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, *"New Methods Of Drug Delivery," Science* 249:1527-1533). Любую технику, известную специалисту в настоящей области техники, можно использовать для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одно или несколько терапевтических средств согласно настоящему изобретению. См., например, патент США №4526938; международные патентные публикации №№ WO 91/05548 и 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; и Lam *et al.* (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Если композиция согласно настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую характеризующееся оптимизированной

последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело согласно настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* для стимуляции экспрессии кодируемого ею характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела путем конструирования ее в виде части соответствующего нуклеиновокислотного экспрессионного вектора и введения ее так, чтобы она стала внутриклеточной, например, путем применения ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем прямой инъекции, или путем использования бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытия липидами, или рецепторами клеточной поверхности, или средствами трансфекции, или путем введения ее, соединенной с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot *et al.* (1991) “*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868) и т.д. Альтернативно, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и встроена в ДНК клетки - хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта с помощью терапевтически или профилактически эффективного количества характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател согласно настоящему изобретению может предусматривать однократное лечение или предпочтительно может включать в себя серию лечений. Согласно предпочтительному примеру субъект получает лечение с помощью характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател согласно настоящему изобретению один раз в неделю приблизительно 1 - 10 недель, предпочтительно 2 - 8 недель, более предпочтительно приблизительно 3 - 7 недель и даже более предпочтительно в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить один раз в день, два раза в день или три раза в день. Альтернативно, фармацевтические композиции можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, каждые шесть недель, один раз в два месяца, дважды в год или один раз в год. Кроме того, следует понимать, что эффективная дозировка молекул, используемых для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в течение курса конкретного лечения.

VI. Применения композиций согласно настоящему изобретению

Характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела согласно настоящему изобретению характеризуются способностью обеспечивать лечение любого заболевания или состояния, связанного с экспрессией CD123 или характеризующегося экспрессией CD123. Таким образом, без ограничений такие молекулы можно использовать в диагностике или лечении острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), включая в себя бластный криз ХМЛ и онкоген Абельсона, связанный с ХМЛ (транслокацию Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (МДС), острого В-лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), включая в себя ХЛЛ с синдромом Рихтера или трансформацией Рихтера, волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), новообразования из бластных плазмацитоидных дендритных клеток (ОБПДК), неходжкинских лимфом (НХЛ), включая в себя мантийноклеточную лимфому (МКЛ) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта (см. **пример 2**); аутоиммунной волчанки (СКВ), аллергии, бронхиальной астмы и ревматоидного артрита. Кроме того, биспецифические диатела согласно настоящему изобретению можно использовать в производстве лекарственных средств для лечения описанных выше состояний.

Представив описание настоящего изобретения в общих чертах, оно станет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые представлены для иллюстрации и не предусмотрено, что они ограничивают настоящее изобретение, если не указано иное.

Пример 1

Конструкция CD123 x CD3 биспецифических диател и контрольного белка

В **таблице 2** представлен перечень биспецифических диател, которые экспрессировали и очищали. Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) и характеризующееся неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-B) способны одновременно связываться с CD123 и CD3. Контрольное биспецифическое диатело (контрольное DART) способно одновременно связываться с FITC и CD3. Биспецифические диатела представляют собой гетеродимеры или гетеротримеры с перечисленными аминокислотными последовательностями. Способы образования биспецифических диател представлены в

международных патентных публикациях №№ WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 и WO 2012/162067.

Таблица 2		
Биспецифические диатела	Аминокислотные последовательности полипептидной цепи	Нуклеиновокислотные кодирующие последовательности
Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) (связывается с CD3 на эпитопе 1)	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:4
Характеризующееся неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-B) (связывается с CD3 на эпитопе 2)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:6 SEQ ID NO:8
Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-A w/ABD) (связывается с CD3 на эпитопе 1), содержит альбуминсвязывающий домен (ABD) для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:10 SEQ ID NO:4
Версия 1 характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела, содержащего домен Fc IgG (версия 1 DART-A w/Fc) (связывается с CD3 на эпитопе 1), содержит домен Fc для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:54 SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:16

Таблица 2		
Биспецифические диатела	Аминокислотные последовательности полипептидной цепи	Нуклеиновокислотные кодирующие последовательности
Версия 2 характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела, содержащего домен Fc IgG (версия 2 DART-A w/Fc) (связывается с CD3 на эпитопе 1), содержит домен Fc для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:54 SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:2
Контрольное биспецифическое диатело (контрольное DART) (связывается с CD3 на эпитопе 1) (связывается с нерелевантной мишенью - FITC)	SEQ ID NO:19 SEQ ID NO:20	

Пример 2

Мечение антителом клеток – мишеней для количественного FACS (QFACS)

В общем 10^6 клеток - мишеней собирали из культуры, ресуспендировали в 10% сыворотке АВ человека в буфере для FACS (PBS + 1% BSA+ 0,1% NaAzide) и инкубировали в течение 5 мин для блокирования рецепторов Fc. Мечение антителом микросфер с различными способностями связываться с антителом (Quantum™ Simply Cellular® (QSC), Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN) и клетки - мишени метили с помощью PE антитела к CD123 (BD Biosciences) согласно инструкциям производителя. Кратко, одну каплю каждой микросферы QSC добавляли в 5 мл полипропиленовую пробирку и меченное PE антитело к CD123 добавляли в концентрации 1 мкг/мл как к клеткам – мишеням, так и микросферам. Пробирки инкубировали в темноте в течение 30 минут при 4°C. Клетки и микросферы промывали путем добавления 2 мл буфера для FACS и центрифугирования при 2500 x G в течение 5 минут. Одну каплю популяции пустых микросфер добавляли после промывания. Микросферы анализировали вначале на проточном цитометре для установления специфических для анализа установок прибора (напряжения PMT и компенсация). С использованием таких же установок прибора регистрировали геометрическое среднее значений флуоресценции микросфер и клеток – мишеней. Стандартную кривую сайтов связывания с антителом на

популяциях микрофер получали из геометрического среднего значений флуоресценции популяций микрофер. Сайты связывания с антителом на клетках – мишенях рассчитывали на основании среднего геометрического значений флуоресценции клеток - мишеней с использованием стандартной кривой, полученной для микрофер в электронной таблице QuickCal (Bangs Laboratories).

Для определения подходящих клеточных линий - мишеней для оценки CD123 x CD3 биспецифических диател, уровни поверхностной экспрессии CD123 на линиях - мишенях Kasumi-3 (ОМЛ), Molm13 (ОМЛ), ТНР-1 (ОМЛ), TF-1 (эритролейкоз) и RS4-11 (ОЛЛ) оценивали с помощью количественного анализа FACS (QFACS). Абсолютные количества сайтов связывания с антителом CD123 на клеточной поверхности рассчитывали с использованием набора QFACS. Как показано в **таблице 3**, абсолютное количество сайтов связывания с антителом CD123 на клеточных составляли порядок Kasumi-3 (высокое) > Molm13 (среднее) > ТНР-1 (среднее) > TF-1 (умеренно низкое) > RS4-11 (низкое). Три клеточных линии с самыми высокими уровнями экспрессии представляли собой клеточные линии ОМЛ: Kasumi-3, MOLM13 и ТНР-1. Не относящиеся к ОМЛ клеточным линиям: TF-1 и RS4-11, характеризовались умеренно низкой / низкой экспрессией CD123, соответственно.

Таблица 3	
Клеточная линия - мишень	Поверхностная экспрессия CD123 (сайты связывания с антителом)
Kasumi-3	118620
Molm13	27311
ТНР-1	58316
TF-1	14163
RS4-11	957
A498	Отрицательная
HT29	Отрицательная

Пример 3

Анализ цитотоксичности CTL (анализ высвобождения LDH)

Прикрепленные опухолевые клетки - мишени открепляли с помощью 0,25% раствора трипсина-EDTA и собирали путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин. Суспензию клеточных линий - мишеней собирали из культуры, отмывали с помощью среды для анализа. Концентрацию и жизнеспособность клеток измеряли по вытеснению трипанового синего с использованием счетчика клеток Beckman Coulter Vi-Cell. Клетки - мишени разводили до 4×10^5 клеток/мл в среде для

анализа. 50 мкл разведенной клеточной суспензии добавляли в 96-луночный U-донный обработанный клеточной культурой планшет (№ по кат. BD Falcon 353077).

Устанавливали три набора контролей для измерения максимального высвобождения из мишени (**MR**), независимой от антитела Т-клеточной цитотоксичности (**AICC**) и спонтанного высвобождения из клетки - мишени (**SR**) следующим образом:

1) **MR**: 200 мкл среды для анализа без CD123 x CD3 биспецифических диател и 50 мкл клеток - мишеней; детергент добавляли в конце эксперимента для определения максимального высвобождения LDH.

2) **AICC**: 50 мкл среды для анализа без CD123 x CD3 биспецифических диател, 50 мкл клеток - мишеней и 100 мкл Т-клеток.

3) **SR**: 150 мкл среды без CD123 x CD3 биспецифических диател и 50 мкл клеток - мишеней.

CD123 x CD3 биспецифические диатела (DART-A, DART-A w/ABD и DART-B) и контроли изначально разводили до концентрации, составляющей 4 мкг/мл, и затем получали серийные разведения до конечной концентрации, составляющей 0,00004 нг/мл (т.е. 40 фмг/мл). 50 мкл разведений добавляли к планшету, содержащему 50 мкл клеток - мишеней/лунка.

Очищенные Т-клетки промывали один раз средой для анализа и ресуспендировали в среде для анализа с плотностью Т-клеток, составляющей 2×10^6 клеток/мл. 2×10^5 Т-клеток в 100 мкл добавляли к каждой лунке до конечного соотношения эффектора к клетке - мишени (E:T), составляющего 10:1. Планшеты инкубировали в течение приблизительно 18 ч при 37°C в 5% CO₂.

После инкубации 25 мкл 10х лизирующего раствора (Promega, № по кат. G182A) или 1 мг/мл дигитонина добавляли к контрольным лункам максимального высвобождения, перемешивали с помощью пипетки 3 раза и планшеты инкубировали в течение 10 мин до полного лизиса клеток - мишеней. Планшеты центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 минут и 50 мкл супернатанта переносили из каждой лунки аналитического планшета в плоскодонный планшет для ELISA и 50 мкл раствора субстрата LDH (Promega, № по кат. G1780) добавляли к каждой лунке. Планшеты инкубировали в течение 10-20 мин при комнатной температуре (RT) в темноте, затем добавляли 50 мкл стоп - раствора. Оптическую плотность (O.D.) измеряли при 490 нм в пределах 1 ч на планшет-ридере Victor2 Multilabel (Perkin Elmer, № по кат. 420-014).

Цитотоксичность в % рассчитывали, как описано ниже, и кривые ответа на дозу получали с использованием программного обеспечения GraphPad PRISM5®.

Лизис конкретных клеток рассчитывали из данных O.D. с использованием следующей формулы:

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

Перенаправленный цитолиз клеточных линий – мишеней с помощью различных уровней поверхностного CD123

CD123 x CD3 биспецифические диатела проявили выраженную способность к перенаправленному цитолизу с концентрациями, которые должны достигать 50% от максимальной активности (EC50s) в диапазоне суб-нг/мл, независимо от специфичности связывания с эпитопом CD3 (DART-A по сравнению с DART-B) в клеточных линиях – мишенях с высоким уровнем экспрессии CD123, Kasumi-3 (EC50=0,01 нг/мл) (**фигура 4, панель D**), средним уровнем экспрессии CD123, Molm13 (EC50=0,18 нг/мл) и ТНР-1 (EC50=0,24 нг/мл) (**фигура 4, панель С и Е**, соответственно) и умеренно низким или низким уровнем экспрессии CD123, TF-1 (EC50=0,46 нг/мл) и RS4-11 (EC50=0,5 нг/мл) (**фигура 4, панель В и А**, соответственно). Аналогично, опосредованный CD123 x CD3 биспецифическими молекулами перенаправленный цитолиз также наблюдали с многочисленными клеточными линиями - мишенями с Т-клетками из различных доноров и отсутствие активности в виде перенаправленного цитолиза наблюдали в клеточных линиях, которые не экспрессируют CD123. Результаты обобщенно представлены в **таблице 4**.

Клеточная линия - мишень	Поверхностная экспрессия CD123 (сайты связывания с антителом)	EC50 характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател (нг/мл) E:T=10:1	Макс. % цитолиза
Kasumi-3	118620	0,01	94
Molm13	27311	0,18	43
ТНР-1	58316	0,24	40
TF-1	14163	0,46	46
RS4-11	957	0,5	60
A498	Отрицательная	Нет активности	Нет активности

HT29	Отрицательная	Нет активности	Нет активности
------	---------------	----------------	----------------

В случае необходимости воспроизвести указанный пример, следует понимать, что специалист в настоящей области техники сможет в пределах целесообразных и приемлемых границах изменить описанный выше протокол подходящим образом для воспроизведения описанных результатов. Таким образом, не подразумевается, что проиллюстрированный протокол должен соблюдаться точно определенным образом.

Пример 4

Т-клеточная активация во время перенаправленного цитолиза с помощью характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател (DART-A, DART-A w/ABD и DART-A w/Fc)

Характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела проявили выраженную способность к перенаправленному цитолизу независимо от присутствия или отсутствия технология увеличения периода полужизни (DART-A по сравнению с DART-A w/ABD по сравнению с DART-A w/Fc) в клеточных линиях – мишенях с высокой экспрессией CD123, Kasumi-3, и средней экспрессией CD123, ТНР-1 (**фигура 5, панели А и В**, соответственно). Чтобы получить характеристики Т-клеточной активации в течение процесса опосредованного характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом перенаправленного цитолиза, Т-клетки из анализов перенаправленного цитолиза окрашивали в отношении маркера Т-клеточной активации CD25 и анализировали с помощью FACS. Как показано на **фигуре 5, панели D**, CD25 подвергался положительно регуляции в CD8 Т-клетках зависимым от дозы образом, указывая на то, что характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела индуцировали Т-клеточную активацию в процессе перенаправленного цитолиза. Напротив, при отсутствии клеток – мишеней не наблюдалась активация CD8 Т-клеток (**фигура 5, панель С**), что указывает на то, что характеризующиеся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифические диатела не активируют Т-клетки при отсутствии клеток - мишеней. Аналогично, CD8 Т-клетки не активировались при инкубации с клетками - мишенями и контрольным биспецифическим диателом (контрольным DART) (**фигура 5, панель D**), указывая на необходимость перекрестной сшивки Т-клетки и клетки – мишени с

характеризующимися оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическими диателами.

Пример 5

Внутриклеточное окрашивание в отношении гранзима В и перфорина

Для определения внутриклеточных содержаний гранзима В и перфорина в Т-клетках анализ CTL настраивали, как описано выше. Через приблизительно 18 ч клетки из аналитического планшета окрашивали антителами к CD4 и к CD8 путем инкубации в течение 30 минут при 4°C. После поверхностного окрашивания клетки инкубировали в 100 мкл буфера для фиксации и пермеабиллизации (BD BioSciences) в течение 20 мин при 4°C. Клетки промывали буфером для пермеабиллизации/отмывки (BD BioSciences) и инкубировали в 50 мкл смеси антител к гранзиму В и перфорину (полученной в 1X буфере для пермеабиллизации/отмывки) при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали с помощью 250 мкл буфера для пермеабиллизации/отмывки и ресуспендировали в буфере для пермеабиллизации/отмывки для получения данных FACS.

Положительная регуляция гранзима В и перфорина характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом (DART-A) в Т-клетках во время перенаправленного цитолиза

Для исследования возможного механизма опосредованной характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом (DART-A) цитотоксичности Т-клетками, внутриклеточные содержания гранзима В и перфорина измеряли в Т-клетках после перенаправленного цитолиза. Зависимую от дозы положительную регуляцию содержаний гранзима В и перфорина как в CD8, так и CD4 Т-клетках наблюдали после инкубации Т-клеток и клеток Kasumi-3 с DART-A (**фигура 6, панель А**). Интересно, что положительная регуляция была почти в два раза выше в CD8 Т-клетках по сравнению с CD4 Т-клетками (**фигура 6, панель А**). Если анализ проводили в присутствии ингибиторов гранзима В и перфорина, клеточный лизис не наблюдался. Положительная регуляция гранзима В или перфорина отсутствовала в CD8 или CD4 Т-клетках, если Т-клетки инкубировали с клетками - мишенями Kasumi-3 и контрольным биспецифическим диателом (контрольным DART) (**фигура 5, панель В**). Приведенные данные указывают на то, что опосредованный DART-A лизис клеток - мишеней может быть опосредован через механизмы с участием гранзима В и перфорина.

Пример 6

***In vivo* противоопухолевая активность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A)**

Выделение РВМС и Т-клеток из цельной крови человека

РВМС от здоровых доноров - людей выделяли из цельной крови с использованием центрифугирования в градиенте Фиколла. Кратко, цельную кровь разводили 1:1 стерильным PBS. 35 мл разведенной крови наносили на 15 мл Ficoll-Paque™ Plus в 50 мл пробирках и пробирки центрифугировали при 1400 об/мин в течение 20 мин с растормаживанием. Лейкоцитарную пленку между двумя фазами собирали в 50 мл пробирку с 45 мл PBS путем центрифугирования пробирок при 600 x g (1620 об/мин) в течение 5 мин. Супернатант удаляли и клеточный осадок отмывали один раз с помощью PBS и количество жизнеспособных клеток определяли путем вытеснения красителя трипанового синего. РВМС ресуспендировали до конечной концентрации, составляющей $2,5 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде (RPMI 1640, 10%FBS, 2 мМ глутамин, 10 мМ HEPES, 100 мкМ/100мкМ/мл пенициллина/стрептомицина (P/S)).

Выделение Т-клеток. Не подвергнутые воздействию Т-клетки выделяли путем отрицательной селекции из РВМС из цельной крови человека с использованием набора для выделения Т-клеток человека Dynabeads Untouched (Life Technologies) согласно инструкциям производителя. После выделения Т-клетки культивировали в течение ночи в среде RPMI с 10% FBS, 1% пенициллина/стрептомицина.

Модель опухоли

Т-клетки и опухолевые клетки человек (Molm13 или RS4-11) комбинировали в соотношении 1:5 (1×10^6 и 5×10^6 , соответственно) и суспендировали в 200 мкл стерильного солевого раствора и вводили с помощью подкожной инъекции (SC) в 0 день исследования (SD0). Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) или контрольное биспецифическое диатело (контрольное DART) вводили внутривенно (IV) посредством инъекций в хвостовую вену по 100 мкл, как представлено в **таблице 5** (MOLM13) и **таблице 6** (RS4-11).

Таблица 5			
Схема исследования для модели MOLM13			
Группа лечения	Доза (мг/кг)	Схема	Количество животных
Контроль - инертный носитель (клетки MOLM-13 отдельно имплантированные или + Т-клетки)	-	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

Таблица 6			
Схема исследования для модели RS4-11			
Группа лечения	Доза (мг/кг)	Схема	Количество животных
Контроль - инертный носитель (клетки RS4-11 отдельно имплантированные)	-	SD0, 1, 2, 3	8
Контроль - инертный носитель (RS4-11 + Т-клетки имплантированные)	-	SD0, 1, 2, 3	8
Контрольное 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

Сбор данных и статистический анализ:

Массы животных – Массы отдельных животных регистрировали два раза в неделю до завершения исследования, начиная с момента инъекции опухолевых клеток.

Состояние агонии/смертность – Проводили наблюдения за животными два раза в неделю в отношении общего состояния агонии и ежедневно в отношении смертности. Смертельные исходы животных оценивали как связанные с лекарственным средством или технические на основании факторов, включая в себя макроскопические

наблюдения и потеря массы тела; смертельные случаи у животных регистрировали ежедневно.

Объем опухоли - Объемы отдельных опухолей регистрировали дважды в неделю, начиная не позже одной недели после имплантации опухоли и продолжая до завершения исследования.

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{\text{длина (мм)} \times \text{ширина}^2}{2}$$

Животные, умерших вследствие технической или связанной с лекарственным средством смерти, исключали из расчетов данных.

Ингибирование роста опухоли - Значения ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали для каждой группы, содержащей получивших лечение животных, с использованием следующей формулы:

$$\text{Средний конечн. объем опухоли (подверг. лечению)-средний нач. объем опухоли (подверг. лечению)} \\ 1 - \frac{\text{Средний конечн. объем опухоли (контроль)-средний нач. объем опухоли (контроль)}}{\text{Средний конечн. объем опухоли (подверг. лечению)-средний нач. объем опухоли (подверг. лечению)}} \times 100$$

Животных, испытывающих частичную или полную ремиссию, или животных, умерших вследствие технической или связанной с лекарственным средством смерти, исключали из расчетов TGI. Критерии Национального института рака для активности соединения составляет TGI>58% (Corbett *et al.* (2004) *Anticancer Drug Development Guide*; Totowa, NJ: Humana 99-123).

Частичный/полный ответ опухоли – Отдельных мышей, характеризующихся наличием опухолей размером меньше чем 1 мм³ на 1 день, классифицировали как характеризующихся частичной ремиссией (PR) и значение регрессии опухоли в % (%TR) определяли с использованием следующей формулы:

$$1 - \frac{\text{Конечный объем опухоли (мм}^3\text{)}}{\text{Начальный объем опухоли (мм}^3\text{)}} \times 100\%$$

Отдельных мышей, у которых отсутствовали пальпируемые опухоли, классифицировали как подвергшихся полной ремиссии (CR).

Статистические данные в отношении объема опухоли– Статистический анализ проводили между получившими лечение и контрольными группами, сравнивая объемы опухолей. Для этих анализов использовали двухфакторные анализы дисперсии с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Все анализы проводили с использованием программного обеспечения GraphPad PRISM® (версии 5.02). Данные в отношении массы и опухоли от отдельных животных, умерших вследствие технической или связанной с лекарственным средством смерти, исключали из анализа.

Тем не менее, данные в отношении опухолей животных, которые продемонстрировали частичный или полный ответы, включали в указанные расчеты.

Результаты MOLM13

Клеточную линию ОМЛ, MOLM13, предварительно смешивали с активированными Т-клетками и имплантировали SC NOD/SCID гамма (NSG) нокаутным мышам (N = 8/группа) в день SD0, как подробно описано ниже. Опухоли MOLM13 в получившей лечение с помощью инертного носителя группе (клетки MOLM13 отдельно или вместе с Т-клетками) продемонстрировали профиль относительно агрессивного роста *in vivo* (фигура 7, панели А и В). В день SD8e средний объем опухолей получившей лечение с помощью инертного носителя группе составлял $129,8 \pm 29,5 \text{ мм}^3$ и ко дню SD15 опухоли достигли среднего объема, составляющего $786,4 \pm 156,7 \text{ мм}^3$. К концу эксперимента в день SD18 опухоли достигали среднего объема, составляющего $1398,8 \pm 236,9 \text{ мм}^3$.

Лечение с помощью DART-A начинали в тот же день, как была имплантирована смесь опухолевых клеток и Т-клеток [(SD0)] и продолжали далее с ежедневными инъекциями в течение дополнительных 7 дней для достижения в общем 8 ежедневных инъекций. Животных лечили с помощью DART-A при 9 уровнях дозы (0,5, 0,2, 0,1, 0,02 и 0,004 мг/кг и 20, 4, 0,8 и 0,16 мкг/кг). Результаты показаны на **фигуре 7, панели А** (0,5, 0,2, 0,1, 0,02 и 0,004 мг/кг) и **фигуре 7, панели В** (20, 4, 0,8 и 0,16 мкг/кг). В день исследования 11 рост опухолей MOLM13 значительно ингибировался при уровнях дозы, составляющих 0,16, 0,5, 0,2, 0,1, 0,02 и 0,004 мг/кг ($p < 0,001$). Более того, лечение мышей с опухолью MOLM13 при уровнях доз, составляющих 20 и 4 мкг/кг доза, приводило к 8/8 и 7/8 CR, соответственно. К концу эксперимента в день SD18 средний объем опухолей, обработанных с помощью DART-A в дозе, составляющей 0,8 – 20 мкг/кг, находился в диапазоне от $713,6,0 \pm 267,4$ до 0 мм^3 , причем все опухоли были значительно меньше, чем опухоли в получившей лечение с помощью инертного носителя контрольной группе. Значения TGI составляли 100, 94 и 49% для групп, получивших дозы 20, 4 и 0,8 мкг/кг, соответственно. По сравнению с получившей лечение с помощью инертного носителя группы с опухолевыми клетками MOLM13, группы, которые получили DART-A при уровне дозы, составляющем 20 и 4 мкг/кг, достигли статистического уровня значимости ко дню SD15, тогда как группа, получившая лечение с помощью 0,8 мкг/кг, достигла статистического уровня значимости ко дню SD18.

Результаты RS4-11

Клеточную линию ОЛЛ, RS4-11, предварительно смешивали с активированными Т-клетками и имплантировали SC NOD/SCID гамма (NSG) нокаутным мышам (N = 8/группа) в день SD0, как подробно описано ниже. Опухоли RS4-11 в получившей лечение с помощью инертного носителя группе (клетки RS4-11 отдельно или вместе с Т-клетками) продемонстрировали профиль относительно агрессивного роста *in vivo* (**фигура 8**).

Лечение с помощью DART-A начинали в тот же день, как была имплантирована смесь опухолевых клеток и Т-клеток [(SD0)] и продолжали далее с ежедневными инъекциями в течение дополнительных 3 дней для достижения в общем 4 ежедневных инъекций. Животных лечили с помощью DART-A при 5 уровнях доз (0,5, 0,2, 0,1, 0,02 и 0,004 мг/кг). Результаты показаны на **фигуре 8**.

Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) эффективно ингибировало рост как MOLM13 ОМЛ, так и RS4-11ОЛЛ опухолей, имплантированных SC NOD/SCID мышам в контексте модели Winn, если введение доз начинали в день имплантации и продолжали в течение 3 или больше последовательных дней. На основании критериев, установленных Национальным институтом рака, DART-A при уровне дозы, составляющем 0,1 мг/кг и выше (TGI >58), считается активным в модели RS4-11, и доза DART-A, составляющая 0,004 мг/кг и выше, была активной в модели MOLM13. Более низкие дозы DART-A, связанные с ингибированием роста опухолей в модели MOLM13 по сравнению с моделью RS4-11, согласуются с данными *in vitro*, демонстрирующими, что клетки MOLM13 характеризуются повышенным уровнем экспрессии CD123, чем клетки RS4-11, что коррелирует с повышенной чувствительностью к опосредованной DART-A цитотоксичностью *in vitro* в клетках MOLM13.

В случае необходимости воспроизвести указанный пример, следует понимать, что специалист в настоящей области техники сможет в пределах целесообразных и приемлемых границах изменить описанный выше протокол подходящим образом для воспроизведения описанных результатов. Таким образом, не подразумевается, что проиллюстрированный протокол должен соблюдаться точно определенным образом.

Пример 7**Поверхностная экспрессия CD123 на лейкозных бластных клетках и стволовых клетках в первичном образце ткани от пациента 1 с ОМЛ**

Для определения паттерна экспрессии CD123 в первичных образцах от пациента 1 с, криоконсервированные первичные образцы костного мозга и РВМС пациента с ОМЛ оценивали в отношении поверхностной экспрессии CD123 на лейкозных бластных клетках.

Образец костного мозга ОМЛ– клинический отчет

Возраст: 42

Пол: женский

Подтип ОМЛ: М2

Процентное отношение злокачественных клеток на основании морфологии: 67,5%

Иммунофенотипирование костного мозга:

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%

Экспрессия CD123 в лейкозных бластных клетках в мононуклеарах костного мозга (BM MNC)

В общем $0,5 \times 10^6$ мононуклеаров костного мозга (BM MNC) и мононуклеаров периферической крови (РВМС)) от пациента 1 с ОМЛ оценивали в отношении экспрессии CD123. Клеточную линию Kasumi-3 включали в качестве контроля. Лейкозные бластные клетки идентифицировали с использованием миелоидного маркера CD33. Как показано на **фигуре 9, панели А**, 87% клеток из костного мозга ОМЛ от пациента 1 экспрессировали CD123 и CD33. Уровни экспрессии CD123 были немного ниже, чем у экспрессирующей CD123 на высоком уровне клеточной линии ОМЛ, Kasumi-3 (**фигура 9, панель В**).

Пример 8

Анализ аутологического цитолиза CTL с использованием первичных образцов от пациента с ОМЛ

Криоконсервированный первичный образец ОМЛ (мононуклеары костного мозга (BMNC) и мононуклеары периферической крови (PBMC)) от пациента 1 с ОМЛ оттаивали в RPMI 1640 с 10% FBS и оставляли для восстановления в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Клетки промывали средой для анализа (RPMI 1640+10%FBS) и количество жизнеспособных клеток определяли по вытеснению трипанового синего. 150000 клеток / лунка в 150 мкл среды для анализа добавляли к 96-луночному U-донному планшету (BD Biosciences). Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) разводили до 0,1 и 0,01 нг/мл и 50 мкл каждого разведения добавляли к каждой лунке (конечный объем = 200 мкл). Контрольное биспецифическое диатело (контрольное DART) разводили до 0,1 нг/мл и 50 мкл каждого разведения добавляли к каждой лунке (конечный объем = 200 мкл). Отдельный аналитический планшет устанавливали для каждой временной точки (48, 72, 120 и 144 часа) и планшеты инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂. В каждую временную точку клетки окрашивали с помощью антител к CD4, CD8, CD25, CD45, CD33 и CD123. Меченые клетки анализировали в проточном цитометре FACS Calibur, оснащенный программным обеспечением для сбора данных CellQuest Pro, версии 5.2.1 (BD Biosciences). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Flowjo v9.3.3 (TreeStar, Inc). Т-клеточную экспансию измеряли путем гейтирования на популяциях CD4+ и CD8+ и активацию определяли путем измерения среднего значения интенсивности флуоресценции CD25 (MFI) на гейтированных в отношении CD4+ и CD8+ популяциях. Популяцию лейкозных бластных клеток идентифицировали с помощью гейтирования CD45+CD33+.

Аутологическая деплеция опухолевых клеток, Т-клеточная экспансия и активация с помощью характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) в первичных образцах от пациента 1 с ОМЛ

Для определения опосредованной характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом (DART-A) активности у пациента 1 с ОМЛ, образцы от пациента инкубировали с 0,1 нг/мл или 0,01 нг/мл DART-A и процентные отношения лейкозных бластных клеток и Т-клеток измеряли в

различные временные точки после лечения. Лейкозные бластные клетки идентифицировали путем CD45+/CD33+ гейтирования. Инкубация первичных образцов костного мозга при ОМЛ с DART-A приводила к деплеции популяции лейкозных клеток с течением времени (**фигура 10, панель А**), что сопровождалось сопутствующей экспансией остаточных Т-клеток (**фигура 10, панель В**) и индукцией маркеров Т-клеточной активации (**фигура 10, панель С**). В обработанных DART-A образцах Т-клетки подвергались экспансии от приблизительно 7 % до приблизительно 80% к 120 часам. Т-клеточная активация, измеряемая по экспрессии CD25 на CD4 и CD8 клетках, достигала пика через 72 ч и снижалась к временной точке 120 ч.

В случае необходимости воспроизвести указанный пример, следует понимать, что специалист в настоящей области техники сможет в пределах целесообразных и приемлемых границах изменить описанный выше протокол подходящим образом для воспроизведения описанных результатов. Таким образом, не подразумевается, что проиллюстрированный протокол должен соблюдаться точно определенным образом.

Пример 9

Поверхностная экспрессия CD123 на лейкозных бластных клетках и стволовых клетках в первичном образце ткани от пациента с ОЛЛ

Для определения паттерна экспрессии CD123 в первичных образцах от пациента с ОЛЛ, криоконсервированный первичный образец РВМС от пациента с ОЛЛ оценивали в отношении поверхностной экспрессии CD123 на лейкозных бластных клетках.

Экспрессия CD123 в лейкозных бластных клетках в мононуклеарах периферической крови (РВМС)

В общем $0,5 \times 10^6$ мононуклеаров периферической крови (РВМС) от здорового донора и пациента с ОЛЛ оценивали в отношении экспрессии CD123. Как показано на **фигуре 11, панелях Е-Н**, преобладающее большинство клеток из костного мозга ОЛЛ экспрессировали CD123. Напротив, как предполагалось, у нормального донора В-клетки являются отрицательными в отношении CD123 и рDC и моноциты являются положительными в отношении CD123 (**фигура 11, панель D**).

Т-клеточную популяцию идентифицировали в образце пациента с ОЛЛ по окрашиванию клеток в отношении CD4 и CD8. Как показано на **фигуре 12, панели В**, только небольшая фракция общих РВМС в образце пациента с ОЛЛ представляла

собой Т-клетки (приблизительно 0,5% представляли собой CD4 Т-клетки и приблизительно 0,4% представляли собой CD8 Т-клетки).

Пример 10

Анализ аутологического цитолиза CTL с использованием первичных образцов от пациента с ОЛЛ

Криоконсервированный первичный образец ОЛЛ (мононуклеары периферической крови (PBMC)) оттаивали в RPMI 1640 с 10% FBS и оставляли восстанавливаться в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Клетки промывали средой для анализа (RPMI 1640+10%FBS) и количество жизнеспособных клеток определяли по вытеснению трипанового синего. 150000 клеток / лунка в 150 мкл среды для анализа добавляли к 96-луночному U-донному планшету (BD Biosciences). Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) разводили до 10, 1 нг/мл и 50 мкл каждого разведения добавляли к каждой лунке (конечный объем = 200 мкл). Отдельный аналитический планшет устанавливали для каждой временной точки (48, 72, 120 и 144 часа) и планшеты инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂. В каждой временной точке клетки окрашивали с помощью антител к CD4, CD8, CD25, CD45, CD33 и CD123. Меченые клетки анализировали в проточном цитометре FACS Calibur, оснащенный программным обеспечением для сбора данных CellQuest Pro, версии 5.2.1 (BD Biosciences). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Flowjo v9.3.3 (TreeStar, Inc). Т-клеточную экспансию измеряли путем гейтирования на популяциях CD4⁺ и CD8⁺ и активацию определяли путем измерения MFI CD25 на гейтированных в отношении CD4⁺ и CD8⁺ популяциях. Популяцию лейкозных бластных клеток идентифицировали с помощью гейтирования CD45+CD33+.

Аутологическая деплеция опухолевых клеток, Т-клеточная экспансия и активация с помощью характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) в первичных образцах от пациентов с ОЛЛ

Для определения опосредованной характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом (DART-A) активности в первичных образцах от пациента с ОЛЛ образцы пациента инкубировали с 1 нг/мл DART-A и процентные отношения лейкозных бластных клеток и Т-клеток измеряли в различные временные точки после лечения. Лейкозные бластные клетки

идентифицировали по CD45⁺/CD33⁺ гейтированию. Инкубация первичных образцов костного мозга при ОМЛ с DART-A приводила к деплеции популяции лейкозных клеток с течением времени по сравнению с необработанным контролем или контрольным DART (**фигура 13, панель H** по сравнению с **панелями F и G**). Если Т-клетки подсчитывали (окрашивание в отношении CD8 и CD4) и активацию (окрашивание в отношении CD25) анализировали, Т-клетки подвергались экспансии и активировались в образце DART-A (**фигура 14, панели I и L**, соответственно) по сравнению с необработанными образцами или обработанными контрольным DART образцами (**фигура 14, панели H, G, K и J**, соответственно).

Пример 11

Поверхностная экспрессия CD123 на лейкозных бластных клетках и стволовых клетках в первичном образце ткани от пациента 2 с ОМЛ

Для определения паттерна экспрессии CD123 в первичных образцах пациента 2 с ОМЛ криоконсервированные первичные образцы костного мозга и PBMC пациента с ОМЛ оценивали в отношении поверхностной экспрессии CD123 на лейкозных бластных клетках.

Экспрессия CD123 в лейкозных бластных клетках в мононуклеарах костного мозга (BMNC)

В общем $0,5 \times 10^6$ мононуклеаров костного мозга (BM MNC) и мононуклеаров периферической крови (PBMC) от пациента 2 с ОМЛ оценивали для идентификации лейкозных бластных клеток. Лейкозные бластные клетки идентифицировали с использованием миелоидных маркеров CD33 и CD45. Как показано на **фигуре 15, панели B**, 94% клеток из костного мозга с ОМЛ представляли собой лейкозные бластные клетки. Т-клеточную популяцию идентифицировали по экспрессии CD3. Как показано на **фигуре 15, панели C**, приблизительно 15% клеток из образца костного мозга ОМЛ и PBMC представляли собой Т-клетки.

Пример 12

Анализ аутологического цитолиза CTL с использованием первичных образцов от пациента 2 с ОМЛ

Криоконсервированный первичный образец ОМЛ (мононуклеары костного мозга (BM MNC) и мононуклеары периферической крови (PBMC)) от пациента 2 с ОМЛ оттаивали в RPM I1640 с 10% FBS и оставляли восстанавливаться в течение ночи

при 37°C в 5% CO₂. Клетки промывали средой для анализа (RPMI 1640+10% FBS) и количество жизнеспособных клеток определяли по вытеснению трипанового синего. 150000 клеток / лунка в 150 мкл среды для анализа добавляли к 96-луночному U-донному планшету (BD Biosciences). Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) и контрольное биспецифическое диатело (контрольное DART) разводили до 0,1 и 0,01 нг/мл и 50 мкл каждого разведения добавляли к каждой лунке (конечный объем = 200 мкл). Отдельный аналитический планшет устанавливали для каждой временной точки (48, 72, 120 и 144 часа) и планшеты инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂. В каждой временной точке клетки окрашивали с помощью антител к CD4, CD8, CD25, CD45, CD33 и CD123. Меченые клетки анализировали в проточном цитометре FACS Calibur, оснащенный программным обеспечением для сбора данных CellQuest Pro, версии 5.2.1 (BD Biosciences). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Flowjo v9.3.3 (Treestar, Inc). Т-клеточную экспансию измеряли путем гейтирования на популяциях CD4⁺ и CD8⁺ и активацию определяли путем измерения MFI CD25 на гейтированных в отношении CD4⁺ и CD8⁺ популяциях. Популяцию лейкозных бластных клеток идентифицировали с помощью гейтирования CD45+CD33+.

Аутологическая деплеция опухолевых клеток, Т-клеточная экспансия и активация в первичных образцах от пациента 2 с ОМЛ

Для определения опосредованной характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом (DART-A) активности в первичных образцах от пациента 2 с ОМЛ образцы пациента инкубировали с 0,1 или 0,01 нг/мл DART-A и процентные отношения лейкозных бластных клеток и Т-клеток измеряли в различные временные точки после лечения. Инкубация первичных образцов костного мозга при ОМЛ с DART-A приводила к деплеции популяции лейкозных клеток с течением времени (**фигура 16, панель А**), что сопровождалось сопутствующей экспансией остаточных Т-клеток (как CD4, так и CD8) (**фигура 16, панель В и фигура 16, панель С**, соответственно). Для определения того, были ли Т-клетки активированы, клетки окрашивали в отношении CD25 или Ki-67, обоих маркеров Т-клеточной активации. Как показано на **фигуре 17, панелях А и В**, инкубация первичных образцов костного мозга при ОМЛ с DART-A приводила к Т-клеточной активации. Указанные данные представляли временную точку 144 ч.

Внутриклеточное окрашивание в отношении гранзима В и перфорина

Для определения внутриклеточных содержаний гранзима В и перфорина в Т-клетках проводили анализ CTL. Через приблизительно 18 ч клетки из аналитического планшета окрашивали антителами к CD4 и к CD8 путем инкубации в течение 30 минут при 4°C. После поверхностного окрашивания клетки инкубировали в 100 мкл буфера для фиксации и пермеабиллизации в течение 20 мин при 4°C. Клетки промывали буфером для пермеабиллизации/ и инкубировали в 50 мкл смеси антител к гранзиму В и перфоруину, полученной в 1X буфере для пермеабиллизации/отмывки, при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали с помощью 250 мкл буфера для пермеабиллизации/отмывки и ресуспендировали в буфере для пермеабиллизации/отмывки для получения данных FACS

Положительная регуляция гранзима В и перфорина характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом (DART-A) в Т-клетках во время перенаправленного цитолиза

Для исследования возможного механизма опосредованной характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическим диателом (DART-A) цитотоксичности Т-клетками, внутриклеточные содержания гранзима В и перфорина измеряли в Т-клетках после перенаправленного цитолиза. Если Т-клетки инкубировали с контрольным биспецифическим диателом (контрольным DART), положительную регуляцию гранзима В и перфорина не наблюдали. Положительную регуляцию содержаний гранзима В и перфорина как в CD8, так и CD4 Т-клетках наблюдали под действием характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) (**фигура 17, панели С и D**). Интересно, что положительная регуляция была почти в два раза выше в CD8 Т-клетках по сравнению с CD4 Т-клетками (**фигура 17, панель С и фигура 17, панель D**). Приведенные данные указывают на то, что опосредованный DART-A лизис клеток - мишеней опосредован через путь с участием гранзима В и перфорина.

Пример 13

Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело перекрестно реагирует с белками CD123 и CD3 нечеловекообразного примата

Для количественного определения степени связывания между характеризующимся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3

биспецифическим диателом (DART-A) и CD3 человека или яванского макака, проводили анализы BIACORE™. В анализах BIACORE™ измеряют константу скорости диссоциации, kd. Аффинность связывания (KD) между антителом и его мишенью представляет собой функцию кинетических констант для ассоциации (константа скорости ассоциации, ka) и диссоциации (константа скорости диссоциации, kd) согласно формуле: $KD = [kd]/[ka]$. В анализе BIACORE™ используется поверхностный плазмонный резонанс для измерения напрямую указанных кинетических параметров. Рекомбинантный CD3 человека или яванского макака напрямую иммобилизовали на подложку. Очищенный CD123 человека или яванского макака захватывали и иммобилизовали на подложку. Измеряли время продолжительности диссоциации и проводили бивалентную аппроксимацию данных. Константы связывания и аффинности получали с использованием 1:1 аппроксимации связывания. Результаты анализов BIACORE™, в которых сравнивали связывание с белками CD123 и CD3 человека по сравнению с белками CD123 и CD3 яванского макака, показаны на **фигуре 18**. Аффинности связывания с белками CD123 яванского макака (**Фигура 18D**) и CD3 яванского макака (**фигура 18B**) являются сопоставимыми с аффинностями связывания для белков CD123 человека (**Фигура 18C**) и CD3 человека (**фигура 18A**).

Пример 14

Аутологическая деплеция моноцитов *in vitro* с РВМС человека и яванского макака

РВМС из образцов цельной крови человека или яванского макака добавляли к U-донным планшетах с плотностью Т-клеток, составляющей 200000 клеток/лунка в 150 мкл среды для анализа. Разведения характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател (DART-A или DART-A w/ABD) получали в среде для анализа. 50 мкл каждого разведения DART-A или DART-A w/ABD добавляли к планшету, содержащему РВМС в лунках в двух параллелях. Планшеты инкубировали в течение ~ 18 - 24 ч при 37°C. Супернатанты использовали для определения цитотоксичности, как описано выше. Как показано на **фигуре 19** (**панели А и В**), деплецию клеток рDC наблюдали как в РВМС человека (**фигура 19, панель А**), так и РВМС яванского макака (**фигура 19, панель В**). Указанные результаты указывают на то, что циркулирующие в кровотоке рDC можно использовать

в качестве фармакодинамического маркера для доклинических токсикологических испытаний у яванских макаков.

В случае необходимости воспроизвести указанный пример, следует понимать, что специалист в настоящей области техники сможет в пределах целесообразных и приемлемых границах изменить описанный выше протокол подходящим образом для воспроизведения описанных результатов. Таким образом, не подразумевается, что проиллюстрированный протокол должен соблюдаться точно определенным образом.

Пример 15

Деплеция плазматоидных дендритных клеток у яванских макаков, получивших лечение с помощью характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A)

В качестве части токсикологического исследования по поиску диапазона доз яванским макакам вводили характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) в виде 4-дневных инфузий в дозах, составляющих 0,1, 1, 10, 30 100, 300 или 1000 нг/кг. Контрольное DART вводили в дозе 100 нг/кг. Для идентификации pDC и популяций моноцитов PBMC яванского макака, клетки метили с помощью антител к CD14-FITC. Моноциты идентифицировали как CD14⁺ популяцию и pDC идентифицировали как CD14⁻CD123⁺ популяцию. Как показано на **фигуре 20, панелях К и L**, pDC подвергались деплеции не позднее чем через 4 дня после инфузии при дозе не выше 10 нг/кг DART-A. Не наблюдали деплецию pDC у получивших лечение с помощью контрольного биспецифического диатела (контрольного DART) обезьян или получивших лечение с помощью инертного носителя вместе с наполнителем обезьян во временной точке - 4 дня (**фигура 20, панели G, H, C и D**, соответственно). Содержания цитокинов: интерферона-гамма, TNF-альфа, IL6, IL5, IL4 и IL2, определяли через 4 часа после инфузии. Наблюдалось небольшое повышение или отсутствие повышения содержания цитокинов у получивших лечение с помощью DART-A животных по сравнению с получившими лечение с помощью контрольного DART или получившими лечение с помощью инертного носителя животными.

На **фигуре 21** и **фигуре 22** представлены результаты анализа FACS для В-клеток (CD20⁺) (**фигура 21, панель А**), моноцитов (CD14⁺) (**фигура 21, панель В**), NK-клеток (CD159⁺CD16⁺) (**фигура 21, панель С**), pDC (CD123^{HL}, CD14⁻) (**фигура 21,**

панель D) и Т-клеток (в общем, CD4⁺ и CD8⁺) (**фигура 22, панель А, фигура 22, панель В и фигура 22, панель D**, соответственно).

Лечение обезьян с помощью контрольного DART не приводило к заметным эффектам на Т- или В-лимфоциты, НК-клетки, моноциты и рDC. Лечение обезьян с помощью DART-A в дозах, составляющих 10 нг/кг/день или выше, приводило к устранению рDC (**фигура 21, панель D**). Деплеция рDC была полной и длительной, возвращаясь к уровням до лечения через несколько недель после завершения введения доз. Содержания циркулирующих в кровотоке Т-лимфоцитов снижалось при введении DART-A, но возвращалось к уровням до лечения к концу каждого недельного цикла, что указывает на изменения в миграции, а не на настоящую деплецию. Как CD4, так и CD8 Т-лимфоциты характеризовались одинаковым паттерном. Маркер активации Т-лимфоцитов, CD69 (**фигура 22, панель С**), был лишь в небольшой степени положительным среди циркулирующих клеток и не изменялся вслед за введением дозы DART-A. Содержания В-лимфоцитов, моноцитов и НК-клеток колебались в течение курса введения доз DART-A с существенной изменчивостью, наблюдаемой среди обезьян. Тенденция в сторону повышенных содержаний циркулирующих В-лимфоцитов и моноцитов наблюдали у обеих обезьян при самых высоких дозах.

Итак, вышеприведенные результаты демонстрируют терапевтическую эффективность характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A). Характеризующееся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифическое диатело (DART-A) можно использовать в качестве терапевтического средства для лечения многочисленных заболеваний и состояний, включая в себя следующее: ОМЛ, АВЛ (ОЛЛ), ХЛЛ, МДС, рDCL, мантийноклеточная лимфома, волосатоклеточный лейкоз, ХЛЛ с трансформацией Рихтера, бластный криз при ХМЛ, ВЛЛ (подкласс является CD123+) (см. **пример 2**); системная красная волчанка (СКВ), аллергия (базофилы являются CD123+), бронхиальная астма и т.д.

Пример 16

Сравнительные свойства характеризующегося оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-A) и характеризующегося неоптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифического диатела (DART-B)

Неожиданное преимущество и свойства характеризующихся оптимизированной последовательностью CD123 x CD3 биспецифических диател

Как обсуждалось выше, DART-A и DART-B конструировали аналогичным образом, и первый полипептид обоих конструкторов содержат, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}), линкер 2, E-спиральный домен и C-конец. Аналогично, второй полипептид обоих конструкторов содержат, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}), линкер 2, K-спиральный домен и C-конец.

Как показано в примере 1, было обнаружено, что оба CD123 x CD3 биспецифических диатела способны одновременно связываться с CD3 и CD123. Кроме того, как раскрыто в **примере 3** и на **фигуре 4, панелях C и D**, два CD123 x CD3 биспецифические диатела проявили выраженную способность к перенаправленному цитолизу с концентрациями, которые должны достигать 50% от максимальной активности (EC_{50}) в диапазоне суб-нГ/мл, независимо от специфичности связывания с эпитопом CD3 (DART-A по сравнению с DART-B) в клеточных линиях – мишенях с высокой экспрессией CD123. Таким образом, небольшие вариации в конкретных последовательностях CD123 x CD3 биспецифических диател не полностью аннулируют биологическую активность.

Тем не менее, во всех исследованных клеточных линиях было обнаружено, что DART-A являлся более активным и более эффективным в перенаправленном цитолизе, чем DART-B (см., например, **фигуру 4, панели A, C и D**). Таким образом, DART-A проявило неожиданное преимущество по сравнению со сходным DART-B.

Пример 17

Фармакология DART-A у нечеловекообразного примата для лечения гематологических злокачественных опухолей

Альфа-цепь рецептора интерлейкина 3 (IL-3), CD123, избыточно экспрессируется на злокачественных клетках в широком диапазоне гематологических злокачественных опухолей (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) и связан с неблагоприятным 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). Более того, сообщалось, что CD123 экспрессируется лейкозными стволовыми клетками (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), что является перспективным признаком, которые позволяет нацеленно воздействовать на основную причину таких заболеваний. В соответствии с этим заключением, CD123 также принимает участие в аутокринной петле IL-3, что поддерживает возникновение и развитие лейкоза, как показано с помощью способности блокирующего CD123 моноклонального антитела снижать приживление лейкозных стволовых клеток и улучшать выживаемость в мышинной модели острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) (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). Тем не менее, в исследовании 1 фазы у пациентов с высоким риском ОМЛ моноклональное антитело не проявило противолейкозную активность (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 образом, необходимы альтернативные подходы в отношении нацеленного воздействия на CD123, включая в себя стратегии деплеции. Хотя CD123 экспрессируется подклассом нормальных гемопоэтических клеток-предшественников (НРС), гемопоэтические стволовые клетки (HSC) экспрессируют CD123 в небольшом количестве или не экспрессируют вообще

(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), указывая на то, что стратегии на основании деплеции клеток с CD123 обеспечивают восстановление посредством нормального гемопоэза.

Нацеливание собственных Т-лимфоцитов пациента на лейкозные клетки – мишени представляет собой перспективную иммунотерапевтическую стратегию для лечения гематологических злокачественных опухолей. Попытку применить терапевтический потенциал указанного подхода осуществили с использованием блинатумомаба (BiTE на основе биспецифического антитела, характеризующегося способностью связываться с CD3 и В-клеточным антигеном CD19) у пациентов с В-клеточными лимфомами и пре-В-клеточным острым лимфобластным 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).

Молекулы CD123 x CD3 биспецифического диатела согласно настоящему изобретению, такие как DART-A, содержат альтернативную биспецифическую, основанную на антителе модальность, которая обеспечивает улучшенную стабильность и более надежные свойства для выполнимости производства (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).

Чтобы продемонстрировать превосходство и эффективность молекул CD123 x CD3 биспецифического диатела согласно настоящему изобретению, подтверждали биологическую активность описанных выше DART-A в *in vitro* и доклинических моделях лейкоза, а также его фармакокинетику, фармакодинамику и безопасную фармакологию на яванских макаках (*Macaca fascicularis*) оценивали по отношению

либо к описанному выше контрольному DART (биспецифическому в отношении CD3 и флуоресцеина), либо “контрольного DART-2”, которое является биспецифическим в отношении CD123 и флуоресцеина).

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи “контрольного DART-2” (CD123VL — линкер — 4-4420VH — линкер — E-спираль; линкеры подчеркнуты) (SEQ ID NO:58):

```
DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MCKSSQSLN NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG GSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVKLDETGG GLVQPGRPMK LSCVASGFTF
SDYWMNWVRQ SPEKGLEWVA QIRNKPYNYE TYYSDSVKGR FTISRDDSKE
SVYLQMNLR VEDMGIYYCT GSYYGMDYWG QGTSVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALKE VAALEKEVAA LEK
```

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи “контрольного DART-2” (4420VL — линкер— CD123VH — линкер — K-спираль) (SEQ ID NO:59):

```
DVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVQSGAE LKPGASVKV SCKASGYTFT
DYMKWVRQA PGQGLEWIGD IIPSNQATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARSH LLRASWFAYW QGTLVTVSS GGCGGKVAAL
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE
```

Бифункциональный анализ ELISA

Планшет MaxiSorp ELISA (Nunc), на который в течение ночи наносили растворимый IL3R-альфа человека или яванского макака (0,5 мкг/мл) в бикарбонатном буфере, блокировали с помощью 0,5% BSA; 0,1% Tween-20 в PBS (PBST/BSA) в течение 30 минут при комнатной температуре. Наносили молекулы DART-A, после чего следовало последовательное добавление конъюгата CD3εδ-биотин человек и стрептавидин-HRP (Jackson ImmunoResearch). Активность HRP обнаруживали по превращению тетраметилбензидина (BioFX) в качестве субстрата в течение 5 мин; реакцию прерывали с помощью 40 мкл/лунка 1% H₂SO₄ и поглощение считывали при 450 нм.

Анализ поверхностного плазмонного резонанса

Способность DART-A связываться с белками CD3 или CD123 человека и яванского макака анализировали с использованием биосенсора BIAcore 3000 (GE, Healthcare), как описано у 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) и 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). Кратко, карбоксильные группы на сенсорном чипе CM5 активировали с помощью инъекции 0,2М N-этил-N-(3-диэтиламино-пропил) карбодиимида и 0,05М N-гидрокси-сукцинимида. Растворимый CD3 или CD123 (1 мкг/мл) впрыскивали на поверхность активированного CM5 в 10 мМ ацетата натрия, pH 5,0, при объемной скорости потока, составляющей 5 мкл/мин, после чего добавляли 1 М этаноламина для деактивации. Эксперименты по связыванию проводили в 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20. Регенерацию иммобилизованных рецепторных поверхностей проводили путем импульсной инъекции 10 мМ глицина, pH 1,5. Значения KD определяли по глобальной аппроксимации кривых связывания к 1:1 модели связывания Ленгмюра (программное обеспечение BIAevaluation v4.1).

Анализ цитолиза

Клеточные линии, используемые для анализов лизиса клеток, получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (Manassas, VA). PBMC выделяли из крови здоровых доноров с использованием набора Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare); Т-клетки очищали с помощью набора для отрицательной селекции (Life Technologies). Плотность CD123 на клеточной поверхности определяли с использованием Quantum Simply Cellular гранул (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Анализы цитотоксичности проводили, как 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). Кратко, клеточные линии - мишени (10^5 клетки/мл) обрабатывали серийными разведениями таких белков, как DART-A или контрольное DART, в присутствии Т-клеток в указанных соотношениях эффекторных клеток к клеткам - мишеням и инкубировали при 37°C в течение ночи. Лизис клеток определяли по высвобождению лактатдегидрогеназы (LDH, Promega) в супернатанте культуры. Для анализа цитолиза с помощью проточной цитометрии клетки - мишени метили с помощью CMТMR (Life Technologies) и цитолиз подвергали мониторингу с использованием проточного цитометра FACSCalibur. Данные анализировали с использованием программного обеспечения PRISM® 5 (GraphPad) и представляли в виде цитотоксичности в %.

Фармакология в отношении яванского макака

Эксперименты на нечеловекообразном примате проводили в Charles River Laboratories (Reno, NV), согласно руководствам местного институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC). Специально выведенным, ранее не подверженным экспериментам яванским макакам (*Macaca fascicularis*) китайского происхождения (возрастной диапазон 2,5-9 лет, диапазон по массам 2,7-5 кг) вводили инертный носитель или DART-A посредством внутривенной инфузии через порт-системы в бедренной и яремной вене с использованием программируемых инфузионных насосов с питанием от аккумуляторной батареи (CADD-Legacy®, SIMS Deltec, Inc., St. Paul, MN). Образцы периферической крови или костного мозга собирали в содержащие антикоагулянт пробирки в указанные временные точки. Анализы фенотипа клеточной поверхности проводили с помощью анализатора LSR Fortessa (BD Biosciences), оснащенного лазерами с длинами волн, составляющими 488 нм, 640 нм и 405 нм, и с помощью следующих антител: 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 и CD33-APC (BD Biosciences). Абсолютное количество клеток определяли с использованием TruCOUNT (BD Biosciences). Содержания цитокинов IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α и IFN- γ в сыворотке измеряли с использованием набора цитометрических гранул с моноклональными антителами к цитокину Th1/Th2 нечеловекообразного примата (BD Bioscience). Концентрацию DART-A в образцах сыворотки обезьяны измеряли с использованием сэндвич-иммуноанализа с электролюминесцентным обнаружением (MesoScale Diagnostics, MSD, Rockville, MD). Кратко, на аналитический планшет (MSD) наносили рекомбинантный IL-3 Ra человека (R&D System) и планшет блокировали с помощью 5 % BSA. Наносили калибровочные стандарты или разведенные исследуемые образцы, после чего добавляли биотинилированное моноклональное антитело, проявляющее специфическое связывание в отношении описанных выше E-спиральных (SEQ ID NO:34) и K-спиральных (SEQ ID NO:35) доменов молекулы. Добавляли меченный SULFO-TAG™ конъюгат стрептавидина (MSD) и образование комплексов анализировали в устройстве формирования изображений MSD SECTOR®. Концентрации DART-A определяли из стандартных кривых, созданных путем аппроксимации данных интенсивности светового излучения в пятипараметрической логистической модели.

Определение физико-химических характеристик очищенного DART-A продемонстрировало гомогенный гетеродимер с молекулярной массой, составляющей 58,9 кДа (**фигура 23; фигуры 24А-24В**), который является стабильным при 2–8°C в течение вплоть до 12 месяцев в PBS. Анализ SPR продемонстрировал почти идентичные аффинности связывания DART-A с соответствующими растворимыми антигенами CD3 и CD123 человека и яванского макака (**фигуры 25А-25D и таблица 7**). Кроме того, DART-A одновременно связывался с обоими антигенами в формате ELISA, в котором использовали CD123 человека или обезьяны для захвата и CD3 человека для обнаружения (**фигуры 26А-26В**), и продемонстрировало сходное связывание с Т-лимфоцитами человека и обезьяны (**фигуры 26С-26Е**). Данные в **таблице 7** представляют собой средние значения от 3 независимых экспериментов, каждый из которых проведен в двух параллелях.

Таблица 7 Равновесные константы диссоциации (K_D) для связывания DART-A с CD3 и CD123 человека и яванского макака			
Антигены	k_a (\pm SD) ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (\pm SD) (c^{-1})	K_D (\pm SD) (нМ)
CD3 ϵ/δ человека	$5,7 (\pm 0,6) \times 10^5$	$5,0 (\pm 0,9) \times 10^{-3}$	$9,0 \pm 2,3$
CD3 ϵ/δ яванского макака	$5,5 (\pm 0,5) \times 10^5$	$5,0 (\pm 0,9) \times 10^{-3}$	$9,2 \pm 2,3$
CD123-His человека	$1,6 (\pm 0,4) \times 10^6$	$1,9 (\pm 0,4) \times 10^{-4}$	$0,13 \pm 0,01$
CD123-His яванского макака	$1,5 (\pm 0,3) \times 10^6$	$4,0 (\pm 0,7) \times 10^{-4}$	$0,27 \pm 0,02$

DART-A опосредует перенаправленный цитолиз Т-лимфоцитами человека или яванского макака

DART-A опосредовал перенаправленный цитолиз клеток-мишеней эффекторными клетками человека или обезьяны против CD123+ лейкозных клеточных линий Kasumi-3 (**фигура 27А-27D**), который сопровождался индукцией маркеров активации. Не наблюдали какой-либо активности против CD123-отрицательных мишеней (U937 клетки) или с применением контрольного DART, что указывало на то, что Т-клеточная активация строго зависит от вовлечения клеток-мишеней и что моновалентное вовлечение CD3 с помощью DART-A было недостаточным для запуска Т-клеточной активации. Поскольку CD123 экспрессируется на подклассе нормальных

циркулирующих лейкоцитах, включая в себя pDC и моноциты (**фигура 27E**), эффект DART-A дополнительно исследовали в нормальных PBMC человека и обезьяны.

Эффект ступенчатого изменения наблюдали среди PBMC человека с зависимой от дозы быстрой деплецией CD14⁻CD123^{high} клеток (pDC и базофилов), наблюдаемой не позднее чем через 3 часа после начала лечения, при этом моноциты (CD14⁺ клетки) не подвергались воздействию в этой временной точке (**фигуры 27F-27G**). Деплеция CD14⁻CD123^{high} клеток увеличивалась с течением времени при всех концентрациях молекулы DART-A, тогда как количество моноцитов слегка снижалось к 6 часам и подвергалось деплеции через 18 часов и в концентрациях, выше чем 1 нг/мл. Инкубация PBMC обезьяны с DART-A приводила к сопоставимой зависимой от дозы деплеции CD14⁻CD123^{high} клеток (**фигура 27H**), дополнительно подтверждая релевантность этого вида для фармакологии DART-A (CD14⁺ клетки обезьяны экспрессируют CD123 в небольшой степени или не экспрессируют вообще, и они не подвергаются деплеции).

Фармакокинетика DART-A у яванских макак

Яванского макака выбирали в качестве приемлемой фармакологической модели для анализа DART-A на основании эквивалентного распределения обоих целевых антигенов в этом виде по сравнению с людьми на основании иммуногистохимии с предшественниками mAb, в соответствии с опубликованной информацией (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).

Исследование, проведенное согласно настоящему изобретению, включало в себя 6 групп лечения, состоящих из 8 яванских макак на группу (4 самца, 4 самки) (**таблица 8**). Все группы получали инертный носитель – контроль для первой инфузии; затем инертный носитель или DART-A вводили внутривенно в течение 4 еженедельных циклов. Животные группы 1 получали инертный носитель – контроль в течение всех 4 последующих инфузий, тогда как группы 2-5 получали еженедельно увеличивающиеся дозы DART-A в течение 4 дней в неделю в течение всех последующих инфузий. Животные группы 6 получали лечение с помощью 7-дневных непрерывных еженедельно увеличивающихся доз DART-A для всех инфузий. Схемы 4 дня введения/3 дня без введения и 7 дней введения разрабатывали для того, чтобы различать длительные и временные эффекты, связанные с введением DART-A. Двое самцов и 2 самок на каждую группу умерщвляли в конце фазы лечения (36 день), тогда

как оставшихся обезьян умерщвляли после 4-недельного восстановления (65 день). Подгруппа обезьян, у которых выработались антитела к лекарственному средству (ADA), направленные против гуманизированной Fv как CD3, так и CD123, и данные после возникновения ADA исключали из анализа РК. Всех обезьян подвергали воздействию DART-A в течение периода исследования.

Таблица 8							
№ инфузии	Дни исследования	Инертный носитель	Инфузия DART-A				
			(4 дня введения/3 дня без введения) нг/кг/день [нг/кг/4 дней]				(7 дня введения) нг/кг/день [нг/кг/7 дней]
			Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
1	1	Инертный носитель	Инертный носитель	Инертный носитель	Инертный носитель	Инертный носитель	Инертный носитель
2	8	Инертный носитель	100 [400]	100 [400]	100 [400]	100 [400]	100 [700]
3	15	Инертный носитель	100 [400]	300 [1200]	300 [1200]	300 [1200]	300 [2100]
4	22	Инертный носитель	100 [400]	300 [1200]	600 [2400]	600 [2400]	600 [4200]
5	29	Инертный носитель	100 [400]	300 [1200]	600 [2400]	1000 [4000]	1000 [7000]
Восстановление	36-65						

Двухкомpartmentную модель использовали для оценки параметров РК (таблица 9 и фигура 28). $T_{1/2\alpha}$ был коротким (4-5 мин), отражая быстрое связывание с циркулирующими мишенями; $T_{1/2\beta}$ также был быстрым, как ожидалось для молекулы такого размера, которая подвергается выведению через почки. Анализ образцов сыворотки, собранные в конце каждой инфузии от обезьян группы 6, показали зависимое от дозы увеличение C_{\max} DART-A. В таблице 9 инертный носитель

представлял собой PBS, pH 6,0, содержащий 0,1 мг/мл рекомбинантного альбумина человека, 0,1 мг/мл PS-80 и 0,24 % бензиловый спирт использовали для всех инфузий инертного носителя в течение первых 4 дней каждой недели инфузии с последующим введением этого же состава без бензилового спирта в течение оставшихся 3 дней каждой еженедельной инфузии. DART-A вводили в те же временные точки, что и непрерывную внутривенную инфузию раствора PBS, pH 6,0, содержащего 0,1 мг/мл рекомбинантного альбумина человека, 0,1 мг/мл PS-80, и 0,24 % бензилового спирта в необходимой концентрации.

Таблица 9		
Двухкомпарментный анализ параметров PK DART-A у яванских макак		
Показатель	300 нг/кг/день (среднее ± SD)	600 нг/кг/день (среднее ± SD)
C_{max} (нг/мл)	77,4 ± 9,4	113,8 ± 33,5
AUC (ч*нг/мл)	7465 ± 913	11188 ± 3282
V_{ss} (л/кг)	1,078 ± 0,511	2,098 ± 1,846
t_{1/2}, альфа (ч)	0,07 ± 0,018	0,067 ± 0,023
t_{1/2}, бета (ч)	13,79 ± 4,928	21,828 ± 18,779
MRT (ч)	6,73 ± 3,327	9,604 ± 8,891

Высвобождение цитокина у получивших лечение с помощью DART-A-яванских макак

Принимая во внимание свойства DART-A в отношении T-клеточной активации, предполагалось увеличение циркулирующих цитокинов, сопровождающее инфузию и, следовательно, использовали низкую начальную дозу в качестве стратегии “десенсибилизации” на основании предыдущих данных, полученных со сходными соединениями (см., например, 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; Bargou, R. *et al.* (2008) “*Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses Of A T Cell-Engaging Antibody,*” Science 321:974-977). Из исследованных цитокинов IL-6 продемонстрировал самые существенные изменения при инфузии, пусть даже и временные по природе, минимальной величины и с большими величинами изменчивости между животными и между группами (**фигуры 29А-29С**). Небольшие, временные изменения в IL-6 также

наблюдали после инфузий инертного носителя (все инфузии в группе 1 и все инфузии в 1 день), что указывает на чувствительность указанного цитокина к стрессу на манипуляции. Тем не менее, зависимые от DART-A увеличения (<80 пг/мл) IL-6 в сыворотке наблюдали у некоторых обезьян после первой инфузии DART-A (100 нг/кг/день), которые возвращались к исходному значению к 72 часам. Интересно, что величина высвобождения IL-6 снижалась с каждой последующей инфузией DART-A, даже если уровень дозы увеличивался вплоть до 1000 нг/кг/день. Также наблюдали минимальные и временные связанные с DART-A увеличения TNF- α в сыворотке (<10 пг/мл); как и в случае с IL-6, самую высокую величину высвобождения TNF- α наблюдали после первой инфузии. Не наблюдали каких-либо связанных с DART-A изменений в уровнях IL-5, IL-4, IL-2 или IFN- γ во время всего исследования по сравнению с контролями. Можно сделать вывод о том, что высвобождение цитокинов в ответ на лечение обезьян с помощью DART-A было минимальным, временным и представляло собой эффект на первую дозу, контролируемый посредством повышения дозы в пределах одного субъекта.

Опосредованная DART-A деплеция циркулирующих CD14/CD123⁺ лейкоцитов *in vivo*

Абсолютные содержания циркулирующих CD14-/CD123⁺ клеток измеряли во время исследования в качестве фармакодинамического конечного результата. Наряду с тем, что количество CD123⁺ клеток в контрольной группе 1 оставалось стабильным с течением времени, лечение с помощью DART-A было связано с обширной деплецией циркулирующих CD14-/CD123⁺ клеток (94-100% от начального значения перед исследованием), наблюдаемой, начиная с первой измеренной временной точкой (72 часа) после начала первой инфузии DART-A (100 нг/кг/день) у всех животных во всех группах активного лечения (**фигуры 30A-30C**). Деплеция была длительной, поскольку она продолжалась в течение 3-дневного еженедельного перерыва во введении дозы в группе 2-5, возвращаясь к исходным уровням только во время пролонгированного периода восстановления. Для устранения возможности маскирования DART-A или модулирования CD123 (маловероятный сценарий, дающий низкие уровни циркулирующего DART-A), количество рDC подсчитывали с помощью ортогонального маркера, CD303. В соответствии с данными относительно CD123, CD303⁺ рDC аналогично подвергались деплеции у обезьян, получивших лечение с помощью DART-A (**фигуры 30D-30F**).

Содержания циркулирующих Т-лимфоцитов, активация и анализ подклассов

В отличие от устойчивой деплеции циркулирующих CD123+ клеток, DART-A, вводимое по схеме 4 дня введения/3 дня без введения (группы 2-5), было связано с еженедельными колебаниями в содержаниях циркулирующих Т-клеток, при этом введение в виде непрерывных 7-дневных инфузий приводило к аналогичному снижению содержаний циркулирующих Т-клеток после первого введения, которое медленно восстанавливалось без колебания даже в течение периода введения доз (**фигуры 31А-31С**). Различие между двумя стратегиями введения доз указывает на то, что эффект DART-A на Т-лимфоциты согласуется с миграцией и/или скоплением клеток по краю участка воспаления, а не с деплецией. После прекращения введения доз, содержание Т-клеток неожиданно поднимались к уровням, приблизительно в 2 раза выше, чем исходные значения в течение длительности восстановительного периода. Инфузия DART-A была связана с зависимой от воздействия, прогрессирующей повышенной частотой встречаемости Т-клеток, экспрессирующих маркер поздней активации, PD-1, особенно на CD4+ клетках, при этом группа дозирования 6 проявляла самые высокие общие содержания (**фигуры 31D-31I и фигуры 32А-32F и фигуры 33А-33F**). Tim-3, маркер, связанный с истощением Т-клеток, не был обнаружен на CD4+ Т-клетках и только с низкой частотой среди CD8+ клеток (5,5-9,7%) и содержался у 20,5-35,5% CD8+/PD-1+ двойных-положительных клеток. Не наблюдалось какое-либо согласуемое изменение в маркере ранней Т-клеточной активации, CD69, и только небольшие изменения в экспрессии CD25 среди циркулирующих клеток.

Чтобы исключить истощение после *in vivo* воздействия, *ex vivo* цитотоксический потенциал эффекторных клеток, выделенных от яванских макаков, получающих многочисленные инфузии DART-A, сравнивали с этим параметром у ранее не подверженных экспериментам обезьян. Как показано на **фигуре 34**, РВМС, выделенные от получивших лечение с помощью DART-A обезьян, продемонстрировали цитотоксичность, сопоставимую с таковой у клеток, выделенных от ранее не подверженных экспериментам обезьян, указывая на то, что *in vivo* воздействие DART-A не оказывало отрицательного влияния на способность Т-клеток уничтожать клетки - мишени.

Воздействие DART-A увеличивало относительную частоту встречаемости центральных CD4 клеток памяти и эффекторных CD8+ клеток памяти за счет

соответствующей ранее не подверженной воздействиям Т-клеточной популяции (**фигуры 35A-35F** и **фигуры 32A-32F** и **фигуры 33A-33F**), указывая на то, что воздействие DART-A стимулировало экспансию и/или мобилизацию указанных клеток.

Эффекты на гемопоэз и предшественники костного мозга

DART-A хорошо переносился обезьянами во всех исследуемых дозах; тем не менее, обратимые снижения параметров эритроцитов наблюдали при самых высоких дозах (**фигуры 36A-36C**). Быстрый забор крови мог вносить в это свой потенциальный вклад, поскольку получившие лечение с помощью инертного носителя животные продемонстрировали слабое снижение количества эритроцитов. Ретикулоцитарный ответ наблюдали у всех животных; при самом высоком уровне воздействия (группа б), тем не менее, ответ оказался слегка менее выраженным для сходного снижения количества эритроцитов (**фигуры 36D-36F**). Морфологический анализ мазков костного мозга в течение исследования был без особенностей. Проточная цитометрия, тем не менее, выявила, что частота встречаемости CD123+ клеток в пределах отрицательных в отношении незрелых клеточных линий (Lin-) популяций костного мозга снижалась у получивших лечение с помощью DART-A животных в конце периода введения доз, возвращаясь к исходным значениям в конце восстановительного периода (**фигура 37A-37B**). HSC (определенные как 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 большую изменчивость между группами; получившие лечение с помощью DART-A обезьяны группы 4-6 показали некоторое видимое снижение по сравнению с соответствующими уровнями перед введением доз, тем не менее, никакого снижения не наблюдалось во всех получивших лечение группах по сравнению с получившими лечение с помощью инертного носителя животными. Эти данные указывают на то, что HSC являлись менее чувствительными к нацеленному воздействию с помощью DART-A и согласуются с наблюдаемой обратимостью отрицательных эффектов лечения DART-A на гемопоэз.

Как продемонстрировано выше, в отношении инфузий в течение 4 недель по еженедельной схеме 4 дня введения/3 дня без введения или по схеме 7 дней введения еженедельно с начальных доз, составляющих 100 нг/кг/день, которые увеличиваются поэтапно еженедельно до 300, 600 и 1000 нг/кг/день, введение DART-A яванским макакам переносилось хорошо. Деплецию циркулирующих CD123+ клеток, включая в себя pDC, наблюдали после начала первого введения и она продолжалась в течение

всего исследования при всех дозах и схемах. Также наблюдалось обратимое снижение предшественника CD123+ костного мозга. Высвобождение цитокином, как существенная угроза безопасности при нацеленных на CD3 видах терапии, оказалось корректируемым и согласуется с эффектом введения первой дозы. Незначительную обратимую анемию отмечали при самых высоких дозах, но не отмечали никаких других (связанных с целью воздействия или не связанных с целью воздействия) неблагоприятных эффектов.

Яванский макак представляет собой приемлемую животную модель для фармакологической оценки DART-A, принимая во внимание высокую степень гомологии между ортологами и способность DART-A связываться со сходной аффинностью с антигенами и опосредовать перенаправленный Т-клеточный цитолиз у обоих видов. Кроме того, оба антигена согласованно экспрессируются у обезьян и людей, включая в себя сходную экспрессию гемopoэтическими предшественниками и в цитоплазме эндотелия многочисленных тканей. Небольшие исключения представляют собой экспрессию в клетках Лейдига у людей, а не обезьян и низкое содержание или отсутствие CD123 в моноцитах обезьян по сравнению с людьми.

Первоочередная задача, связанная с терапевтическими стратегиями, в которые вовлечена Т-клеточная активация, включает в себя высвобождение цитокинов и не связанные с целью воздействия цитотоксические эффекты. Недавнее исследование с CD3 x CD123 биспецифическим иммунным конструктором слияния scFv с бивалентным распознаванием CD3 продемонстрировало противолейкозную активность *in vitro*, но вызвало неспецифическую активацию Т-клеток и секрецию 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). Моновалентная природа каждого из плечей связывания и в высокой степени гомогенная форма DART-A обеспечивает то, что Т-клеточная активация зависит исключительно от вовлечения клеток - мишеней: Т-клеточная активация не наблюдалась при отсутствии клеток - мишеней или при использовании молекулы контрольного DART, которая включала в себя только плечо нацеленного воздействия на CD3. Кроме того, высокие дозы (вплоть до 100 мкг/кг/день) молекулы контрольного DART не запускали высвобождение цитокинов у яванских макаков.

Начальная доза молекулы DART-A, составляющая 100 нг/кг/день, хорошо переносилась, при этом наблюдалось минимальное высвобождение цитокинов. Тем не менее, цитокиновая буря действительно начиналась при высокой начальной дозе (5

мкг/кг/день); тем не менее, такая доза могла быть достигнута безопасным образом посредством поэтапных еженедельных повышений дозы, указывая на то, что опосредованное DART-A высвобождение цитокинов, вероятно, является, главным образом, эффектом первой дозы. Деплеция CD123+ клеток - мишеней, тем самым устраняя источник лигирования с CD3, может объяснять эффект первой дозы: почти полную деплецию CD123+ клеток наблюдали в дозах, не превышающих 3-10 нг/кг/день, указывая на то, что в высвобождении цитокинов *in vivo* прослеживается смещенный дозозависимый эффект по сравнению с цитотоксичностью. Профили зависимости от дозы для цитотоксичности и высвобождения цитокинов Т-клетками человека также согласуются с представленным наблюдением.

Т-клеточная десенсибилизация, в которой может играть роль опосредованная DART-A положительная регуляция PD1, как оказывается, также вносит свой вклад в ограничение высвобождения цитокинов после первой инфузии DART-A. Недавние исследования показывают, что повышенная экспрессия PD-1 после индуцированной антигеном задержки Т-клеток в участках воспаления вносит свой вклад, посредством взаимодействий с PD-L1, в терминацию стоп-сигнала, таким образом, высвобождая и десенсибилизируя клетки (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). Противодействие PD-1 мощности сигнала TCR не является информативным: наряду с тем, что пролиферация и продукция цитокинов оказываются наиболее чувствительными к ингибированию PD-1, воздействие на цитотоксичность является минимальным (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). Закономерно, *ex vivo* цитотоксический потенциал Т-клеток от обезьян, на которых воздействовали многократными инфузиями DART-A, был сопоставим с таковым у Т-клеток от ранее не подверженных экспериментам обезьян, несмотря на повышенные содержания PD-1 у первых. Кроме того, положительная регуляция PD-1 не сопровождалась экспрессией TIM3, отличительного признака истощения Т-клеток, как показано для Т-клеток, подвергшихся длительной стимуляции антителами CD3 или хронических инфекций (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).

Деплеция циркулирующих CD123+ клеток у получивших лечение с помощью DART-A обезьян была быстрой и продолжалась в течение еженедельного перерыва во введении доз в схеме 4 дня введения/3 дня без введения, что согласуется с устранением клеток - мишеней. Напротив, временные колебания в количестве циркулирующих Т-клеток, вероятно, являлись результатом миграции из/в ткани и лимфоидные органы в зависимости от DART-A. Воздействие DART-A стимулирует экспансию и/или мобилизацию подвергнутых воздействию антигена Т-лимфоцитов, клеток, которые предпочтительно находятся в тканях и быстрее проявляют цитотоксическую эффекторную функцию (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).

Деплеция CD123+ нормальных клеток может предусматривать потенциальные риски. pDC и базофилы экспрессируют высокие содержания CD123 по сравнению с пониженными содержаниями в моноцитах и эозинофилах (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). Было показано, что pDC играет роль в контроле определенных вирусов в моделях инфекций на мышах или обезьянах, хотя они не оказывались критически важными для контроля иммунного ответа при гриппе (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). Моделях опухолей pDC могут стимулировать рост опухолей и метастазирование, тогда как деплеция pDC приводила к ингибированию опухоли (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). Временный, незначительный,

зависимый от дозы отек лица наблюдался у некоторых обезьян, получивших лечение с помощью DART-A; тем не менее, у этих обезьян не наблюдали повышенных содержаний гистамина или в случае, когда базофилы человека лизировали путем опосредованный DART-A Т-клеточный лизис. Деплеция моноцитов может предусматривать потенциальные риски инфекции; последствие pDC, деплеция базофилов или эозинофилов у людей, таким образом, должна подвергаться мониторингу.

Коммитированные гемопоэтические предшественники, которые экспрессируют CD123, такие как общий миелоидный предшественник (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), могут быть подвергнуты нацеленному воздействию со стороны DART-A, что является возможным объяснением незначительной анемии, наблюдаемой после введения DART-A в самой высокой дозе. Вероятно, эритропоэтический ретикулоцитарный ответ действует при всех уровнях дозы DART-A; тем не менее, в отношении адекватных снижений параметров эритроцитов, животные, подвергаемые воздействию самых высоких доз DART-A (группа 6, 7-дневная инфузия), показали сниженный ретикулоцитарный ответ, указывая на возможную цитотоксическую активность на предшественников (например, CMP). Эффект был обратимым после прекращения лечения с помощью DART-A, что согласуется с репопуляцией из сохраненных HSC с низким содержанием или отсутствием CD123.

Альтернативные подходы для деплеции CD123+ клеток включают в себя специфическое в отношении CD123 моноклональное антитело второго поколения с усиленной областью 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), связанный с IL-3 дифтерийный 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), индуцированные цитокинами (ЦИК) клетки-киллеры, экспрессирующие специфические к CD123 химерные антигенные рецепторы (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) и CD123 CAR Т-клетки (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-клетки проявили выраженный цитолиз лейкозных бластных клеток *in vitro* и противолейкозную активность в ксеногенной модели диссеминированного ОМЛ (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). В недавнем исследовании сообщалось об абляции нормального гемопоэза у NSG мышей с пересаженными CD34+ клетками человека после переноса CD123 CAR Т-клеток (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), хотя другие авторы не наблюдали подобных эффектов *in vitro* или *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 обсуждаемых выше экспериментах наблюдали деплецию CD123+ популяций предшественников костного мозга, но она была обратимой во время восстановительного периода; кроме того, деплеция этой небольшой популяции не приводила к изменениям в насыщенности клетками костного мозга или в соотношении эритроидных клеток к миелоидным (Е:М) при всех исследованных уровнях доз DART-A. Эти различия подчеркивают потенциальные преимущества DART-A по сравнению с клеточными видами терапии, поскольку это обеспечивает титруемую систему, которая основана на аутологических Т-клетках в отличие от “сверхэффективных” *ex vivo* трансдуцированных клеток, которые труднее контролировать. CD123 избыточно экспрессируется в некоторых гематологических злокачественных опухолях, включая в себя ОМЛ, волосатоклеточный лейкоз, новообразования из бластных плазмацитоидных дендритных клеток (ОБПДК), пре-В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) и хронический лимфоцитарный лейкоз, болезнь Ходжкина с наличием клеток Рид-Штернберга, а также при

миелодиспластическом синдроме и системном мастоцитозе (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). Прогнозируемая фармакодинамическая активность и контролируемый профиль безопасности, наблюдаемый у нечеловекообразных приматов дополнительно подтверждает клиническую применимость и эффективность DART-A в качестве иммунотерапии для указанных нарушений.

В заключение следует отметить, что DART-A представляет собой молекулу на основе антитела, вовлекающую субъединицу CD3 ϵ TCR для перенаправления Т-лимфоцитов против клеток, экспрессирующих CD123, антиген, подвергаемый положительной регуляции при некоторых гематологических злокачественных опухолях. DART-A связывается обоими антигенами как человека, так и яванского макака со сходными аффинностями и перенаправляет Т-клетки обоих видов на уничтожение CD123+ клеток. Обезьяны, которым вводили инфузии 4 или 7 дней в неделю с еженедельно повышающимися дозами DART-A, продемонстрировали деплецию циркулирующих CD123+ клеток через 72 ч после начала лечения, которая продолжалась в течение 4 недель лечения, независимо от схем введения доз. Снижение циркулирующих Т-клеток также происходило, но восстанавливалось до исходного значения до следующей инфузии у обезьян, получающих лечение по схеме, предусматривающей 4 дня введения дозы, что согласуется с опосредованной DART-A мобилизацией. Введение DART-A увеличивало циркулирующие PD1+, но не TIM-3+, Т-клетки; кроме того, *ex vivo* анализ Т-клеток от получивших лечение обезьян выявил неизмененных перенаправленных лизис клеток - мишеней, указывая на отсутствие истощения. Токсичность была ограничена минимальным временным высвобождением цитокинов после первой инфузии DART-A, но не после следующих введений, даже если доза повышалась, и минимальным снижением количества эритроцитов с сопутствующим снижением CD123+ предшественников костного мозга. Клиническое

испытание DART-A при гематологических злокачественных опухолях является обоснованным.

Все упомянутые в настоящем описании изобретения публикации и патенты включены в настоящий документ в той же степени, как если бы было предусмотрено, что каждая отдельная публикация или патентная заявка специально и индивидуально включена посредством ссылки во всей своей полноте. Наряду с тем, что настоящее изобретение было описано с использованием конкретных его вариантов осуществления, следует понимать, что возможны дополнительные модификации, и предусмотрено, что настоящая заявка охватывает любые изменения, применения или адаптации настоящего изобретения, следуя в целом принципам настоящего изобретения и включая в себя такие отклонения от настоящего раскрытия, которые согласуются с известной или общепринятой практикой в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение, и которые могут быть применены к основным признакам, изложенным выше в настоящем документе.

Перечень последовательностей

<110> МАКРОДЖЕНИКС, ИНК.
 Bonvini, Ezio
 Johnson, Leslie
 Huang, Ling
 Moore, Paul
 Chichili, Gurunadh
 Alderson, Ralph

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬСЯ С CD123 И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<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 version 3.5

<210> 1
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> First Polypeptide Chain of 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> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-A

<400> 2
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
 cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 ggggggtggc caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat ccggcgggcg aggcgaggtg 360
 cagctggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc 420
 aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga 480
 cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt cttccaacg gggccacttt ctacaatcag 540
 aagtttaaag gcaggggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag 600
 ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg 660
 agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga 720
 tgtggcggtg gagaagtggc cgactggag aaagagggtt ctgctttgga gaaggaggtc 780
 gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg gagaaa 816

<210> 3
<211> 280
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of 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> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic Acid Molecule Encoding Second Polypeptide Chain of 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 agctggtgga gtctggggga ggcttgggcc agcctggagg gtcacctgaga 420
ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agcacatagc ctatgaattg ggtccgccag 480
gctccagggg aggggctgga gtggggttga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca 540
acctactatg ccgactctgt gaaggataga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac 600
tactgtatc 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> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of 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					235					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> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-B

<400> 6

gacattcagc	tgaccagtc	tccagcaatc	atgtctgcat	ctccagggga	gaaggtcacc	60
atgacctgca	gagccagttc	aagtgtaagt	tacatgaact	ggtagcagca	gaagtcaggc	120
acctccccca	aaagatggat	ttatgacaca	tccaaagtgg	cttctggagt	cccttatcgc	180
ttcagtggca	gtgggtctgg	gacctcatac	tctctcacia	tcagcagcat	ggaggctgaa	240
gatgctgcca	cttattactg	ccaacagtgg	agtagtaacc	cgctcacggt	cggtgctggg	300
accaagctgg	agctgaaagg	aggcggatcc	ggcggcggag	gccaggtgca	gctggtgcag	360
tccggggctg	agctgaagaa	accggagct	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 caccctggtg acagtgtctt cgggaggatg tggcggtgga 720
 gaagtggccg cactggagaa agaggttgct gctttggaga aggaggtcgc tgcacttgaa 780
 aaggaggtcg cagccctgga gaaa 804

<210> 7
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Second Polypeptide Chain of 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> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic Acid Molecule Encoding Second Polypeptide Chain of DART-B

<400> 8
gacttcgtga tgacacagtc tcctgatagt ctggccgtga gtctggggga gcgggtgact 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 gagggcggatc cggcggcgga 360
ggcgatatca aactgcagca gtcaggggct gaactggcaa gacctggggc ctcagtgaag 420
atgtcctgca agacttctgg ctacaccttt actaggtaca cgatgcactg ggtaaaacag 480
aggcctggac agggctctgga atggattgga tacattaatc ctagccgtgg ttataactaat 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 tttgaaagag 780
aaggctgccc cacttaagga aaaggctgca gccctgaaag ag 822

<210> 9
<211> 322
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CD123 x CD3 Diabody Polypeptide Chain Having Albumin Binding Site

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide Encoding CD123 x CD3 Diabody Polypeptide Chain Having Albumin Binding Site

<400> 10

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaatg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc 180
 cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaagggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 ggggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat cgggcggcgg aggcgaggtg 360
 cagctgggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc 420
 aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga 480
 cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt cttccaacg gggccacttt ctacaatcag 540
 aagtttaaag gcaggggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag 600
 ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg 660
 agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga 720
 tgtggcggtg gagaagtggc cgcactggag aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc 780
 gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg gagaaaggcg gcggtctct 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> CH2-CH3 Domains of a Modified Human Antibody Fc Region

<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 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val 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 Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 12
<211> 681
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic Acid Molecule Encoding Peptide 1 and the CH2 and CH3
Domains of an IgG Fc region

<400> 12
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcggggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaaagc 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> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of DART-A w/Fc Version 1 Construct

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-A
w/Fc Version 1 Construct

<400> 14

gacttcgtga tgacacagtc tctgatagtc ctggccgtga gtctggggga gcgggtgact 60
 atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa atcagaaaaa ctatctgacc 120
 tggtagcagc agaagccagg ccagcccctt aaactgctga tctattgggc ttccaccagg 180
 gaatctggcg tgcccagacg attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca 240
 atttctagtc tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat 300
 ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc cggcggcgga 360
 ggcgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggctc agcctggagg gtccttgaga 420
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agcacatacg ctatgaattg ggtccgccag 480
 gctccagggg aggggctgga gtggggttga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca 540
 acctactatg ccgactctgt gaaggataga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac 600

tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggccgtgta ttactgtgtg 660
 agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tcttggtttg cttattgggg acaggggaca 720
 ctggtgactg tgtcttccgg aggatgtggc ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag 780
 gttgctgctt tggagaagga ggtcgtgca cttgaaaagg aggtcgcagc cctggagaaa 840
 ggcggcgggg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgcgggggga 900
 ccgtcagtct tcctcttccc ccaaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccggaccocct 960
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1020
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1080
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1140
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1200
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1260
 atgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1320
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1380
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1440
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1500
 cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa 1530

<210> 15

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Polypeptide Chain of DART-A w/Fc Version 1 Construct

<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
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
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> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic Acid Molecule Encoding Second Polypeptide Chain of DART-A
 w/Fc Version 1 Construct

<400> 16
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
 cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 ggggggtggc caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat ccggcgggcg aggcgaggtg 360
 cagctgggtc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc 420
 aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga 480
 cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt cttccaacg gggccacttt ctacaatcag 540
 aagtttaaag gcagggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag 600
 ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg 660
 agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga 720
 tgtggcgggtg gaaaagtggc cgcactgaag gagaaagttg ctgctttgaa agagaaggtc 780

gccgcactta aggaaaaggt cgcagccctg aaagag

816

<210> 17

<211> 515

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of DART-A w/Fc Version 2 Construct

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-A
w/Fc Version 2 Construct

<400> 18

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtaggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgtagggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggtct ccaacaaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420
 aaccagggtca gcctgtgggtg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 540
 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
 ctctccctgt ctccgggtaa agccccctcc agctccccta tggaagactt cgtgatgaca 720
 cagtctcctg atagtctggc cgtgagtctg ggggagcggg tgactatgtc ttgcaagagc 780
 tcccagtcac tgctgaacag cggaaatcag aaaaactatc tgacctggta ccagcagaag 840
 ccaggccagc ccctaaact gctgatctat tgggcttcca ccagggaatc tggcgtgccc 900
 gacagattca gcggcagcgg cagcggcaca gattttacc tgacaatttc tagtctgcag 960
 gccgaggacg tggctgtgta ctattgtcag aatgattaca gctatcccta cactttcggc 1020
 caggggacca agctggaaat taaaggaggc ggatccggcg gcggaggcga ggtgcagctg 1080
 gtggagtctg ggggaggctt ggtccagcct ggaggggtccc tgagactctc ctgtgcagcc 1140
 tctggattca cttcagcac atacgctatg aattgggtcc gccaggctcc agggaagggg 1200
 ctggagtggg ttggaaggat caggtccaag tacaacaatt atgcaaccta ctatgocgac 1260
 tctgtgaagg atagattcac catctcaaga gatgattcaa agaactcact gtatctgcaa 1320
 atgaacagcc tgaaaaccga ggacacggcc gtgtattact gtgtgagaca cggtaacttc 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> First Polypeptide Chain of Control 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> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Polypeptide Chain of Control 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> Artificial Sequence

<220>

<223> Light Chain CD3-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CD3-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain CD3-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CD3-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain CD123-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain CD123-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain CD123-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CD123-Binding Domain of 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> Linker 1 Polypeptide

<400> 29

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 2 Polypeptide

<400> 30

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 3 Polypeptide

<400> 31

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 32

<400> 32
000

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 4 Polypeptide

<400> 33

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 34
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> E-Coil Domain

<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> Artificial Sequence

<220>
<223> K-Coil Domain

<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> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred Albumin Binding Domain

<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 Domains of Human Fc Region

<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 of Light Chain Variable Domain of Anti-CD3 Antibody

<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 of Light Chain Variable Domain of Anti-CD3 Antibody

<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 of Light Chain Variable Domain of Anti-CD3 Antibody

<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 of Heavy Chain Variable Domain of Anti-CD3 Antibody

<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 of Heavy Chain Variable Domain of Anti-CD3 Antibody

<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 of Heavy Chain Variable Domain of Anti-CD3 Antibody

<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 of Light Chain Variable Domain of Anti-CD123 Antibody

<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 of Light Chain Variable Domain of Anti-CD123 Antibody

<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 of Light Chain Variable Domain of Anti-CD123 Antibody

<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 of Heavy Chain Variable Domain of Anti-CD123 Antibody

<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 of Heavy Chain Variable Domain of Anti-CD123 Antibody

<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 of Heavy Chain Variable Domain of Anti-CD123 Antibody

<400> 49

Ser His Leu Leu Arg Ala Ser

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heterodimerization Domain

<400> 50

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heterodimerization Domain

<400> 51

Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heterodimerization Domain

<400> 52

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heterodimerization Domain

<400> 53

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 54

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of DART-A w/Fc Version 1 Construct

<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> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide 1

<400> 55

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

<210> 56
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred CH2 and CH3 Domains of Fc Region

<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> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 4 Polypeptide

<400> 57

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 58
<211> 273
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino Acid Sequence of First Polypeptide Chain of "Control
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
 225 230 235 240
 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino Acid Sequence of Second Polypeptide Chain of "Control
 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 ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Характеризующееся оптимизированной последовательностью диатело, способное специфически связываться с эпитопом CD123 и с эпитопом CD3, причем диатело содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, ковалентно связанные друг с другом, причем:

А. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к С-концу:

i. домен 1, содержащий

(1) субдомен (1А), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:21**); и

(2) субдомен (1В), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VH_{CD123}) (**SEQ ID NO:26**),

причем указанные субдомены 1А и 1В отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:29**);

ii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:30**); и

В. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к С-концу:

i. домен 1, содержащий

(1) субдомен (1А), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD123 (VL_{CD123}) (**SEQ ID NO:25**); и

(2) субдомен (1В), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:22**),

причем указанные субдомены 1А и 1В отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:29**);

ii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой K-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**) или E-спиральный домен

(**SEQ ID NO:34**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:30**); и причем указанный домен 2 указанной первой и указанной второй полипептидных цепей не представляют собой оба Е-спиральных домена или оба К-спиральных домена;

и при этом:

- (a) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (b) указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи и указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD123.

2. Диатело по п. 1, в котором указанная первая полипептидная цепь дополнительно содержит альбуминсвязывающий домен (**SEQ ID NO:36**), соединенный с указанным доменом 2 посредством пептидного линкера (**SEQ ID NO:31**).

3. Диатело по п. 1, в котором указанная вторая полипептидная цепь дополнительно содержит домен 3, содержащий домен CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина (**SEQ ID NO:37**), причем указанный домен 3 соединен с указанным доменом 1А посредством пептидного линкера (**SEQ ID NO:33**).

4. Диатело по п. 1, в котором указанная вторая полипептидная цепь дополнительно содержит домен 3, содержащий домен CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина (**SEQ ID NO:37**), причем указанный домен 3 соединен с указанным доменом 2 посредством пептидного линкера (**SEQ ID NO:32**).

5. Диатело по любому из пп. 1 - 4, в котором указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи представляет собой К-спиральный домен (**SEQ ID NO:35**), и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи представляет собой Е-спиральный домен (**SEQ ID NO:34**).

6. Диатело по любому из пп. 1 - 4, в котором указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи представляет собой E-спиральный домен (SEQ ID NO:34), и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи представляет собой K-спиральный домен (SEQ ID NO:35).

7. Диатело по любому из предыдущих пунктов, причем диатело способно перекрестно реагировать с белками CD123 и CD3 как человека, так и примата.

8. Биспецифическое диатело, способное специфически связываться с эпитопом CD123 и с эпитопом CD3, причем диатело содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, ковалентно связанные друг с другом, причем указанное биспецифическое диатело содержит следующее:

А. первая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:1**; и

В. вторая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:3**;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом дисульфидной связью.

9. Диатело по любому из предыдущих пунктов для применения в качестве фармацевтического средства.

10. Диатело по п. 8 для применения в лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией CD123 или характеризующегося экспрессией CD123.

11. Диатело по п. 10, причем указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, представляет собой злокачественную опухоль.

12. Диатело по п. 11, причем указанная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из следующего: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), включая бластный криз ХМЛ и онкоген Абельсона, связанный с ХМЛ (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластический синдром (МДС), острый В-лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз

(ХЛЛ), включая ХЛЛ с синдромом Рихтера или трансформацией Рихтера, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток (ОБПДК), нехождкинские лимфомы (НХЛ), включая мантийноклеточную лимфому (МКЛ) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфома Ходжкина, системный мастоцитоз и лимфома Беркитта.

13. Диатело по п. 10, причем указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, представляет собой воспалительное состояние.

14. Диатело по п. 11, причем указанное воспалительное состояние выбрано из группы, состоящей из следующего: системная красная волчанка (СКВ), аллергия и бронхиальная астма, ревматоидный артрит.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая диатело по любому из пп. 1 - 8 и физиологически приемлемый носитель.

16. Применение фармацевтической композиции по п. 15 в лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией CD123 или характеризующегося экспрессией CD123.

17. Применение по п. 16, при котором указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, представляет собой злокачественную опухоль.

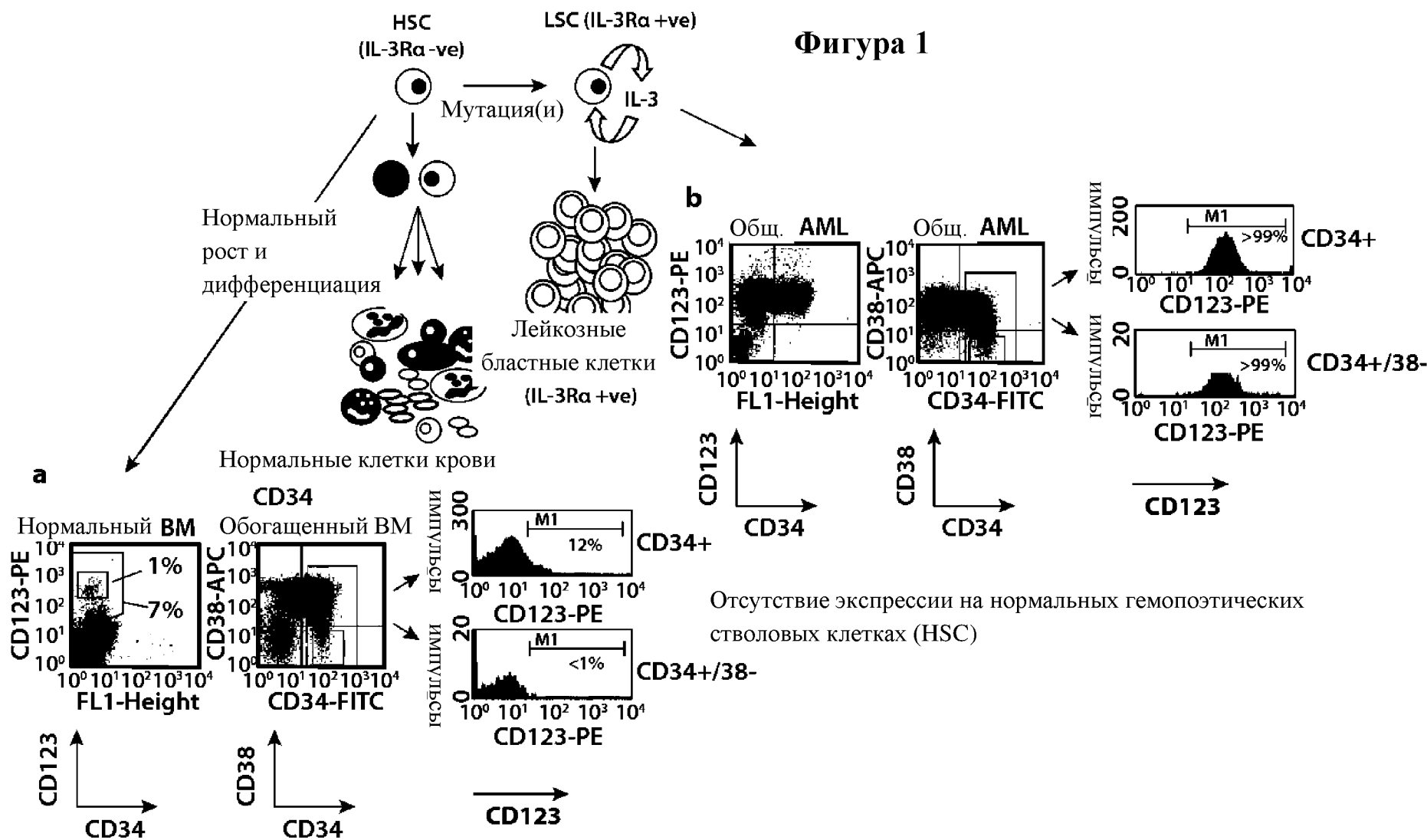
18. Применение по п. 17, при котором указанная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из следующего: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), включая бластный криз ХМЛ и онкоген Абельсона, связанный с ХМЛ (транслокация Vcr-ABL), миелодиспластический синдром (МДС), острый В-лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), включая ХЛЛ с синдромом Рихтера или трансформацией Рихтера, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток (ОБПДК), нехождкинские лимфомы (НХЛ), включая мантийноклеточную лимфому (МКЛ) и мелкоклеточную

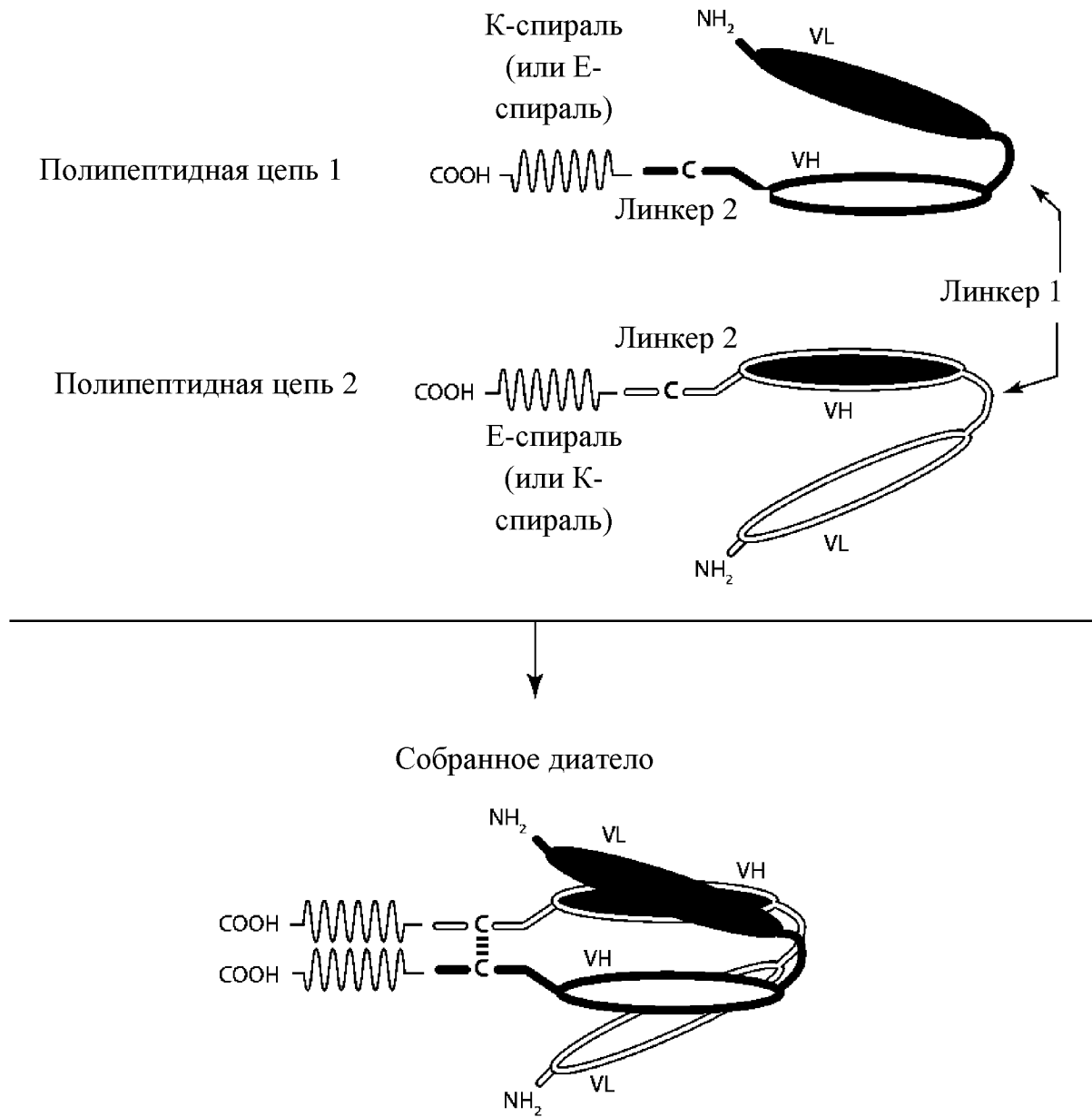
лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфома Ходжкина, системный мастоцитоз и лимфома Беркитта.

19. Применение по п. 16, при котором указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией CD123 или характеризующееся экспрессией CD123, представляет собой воспалительное состояние.

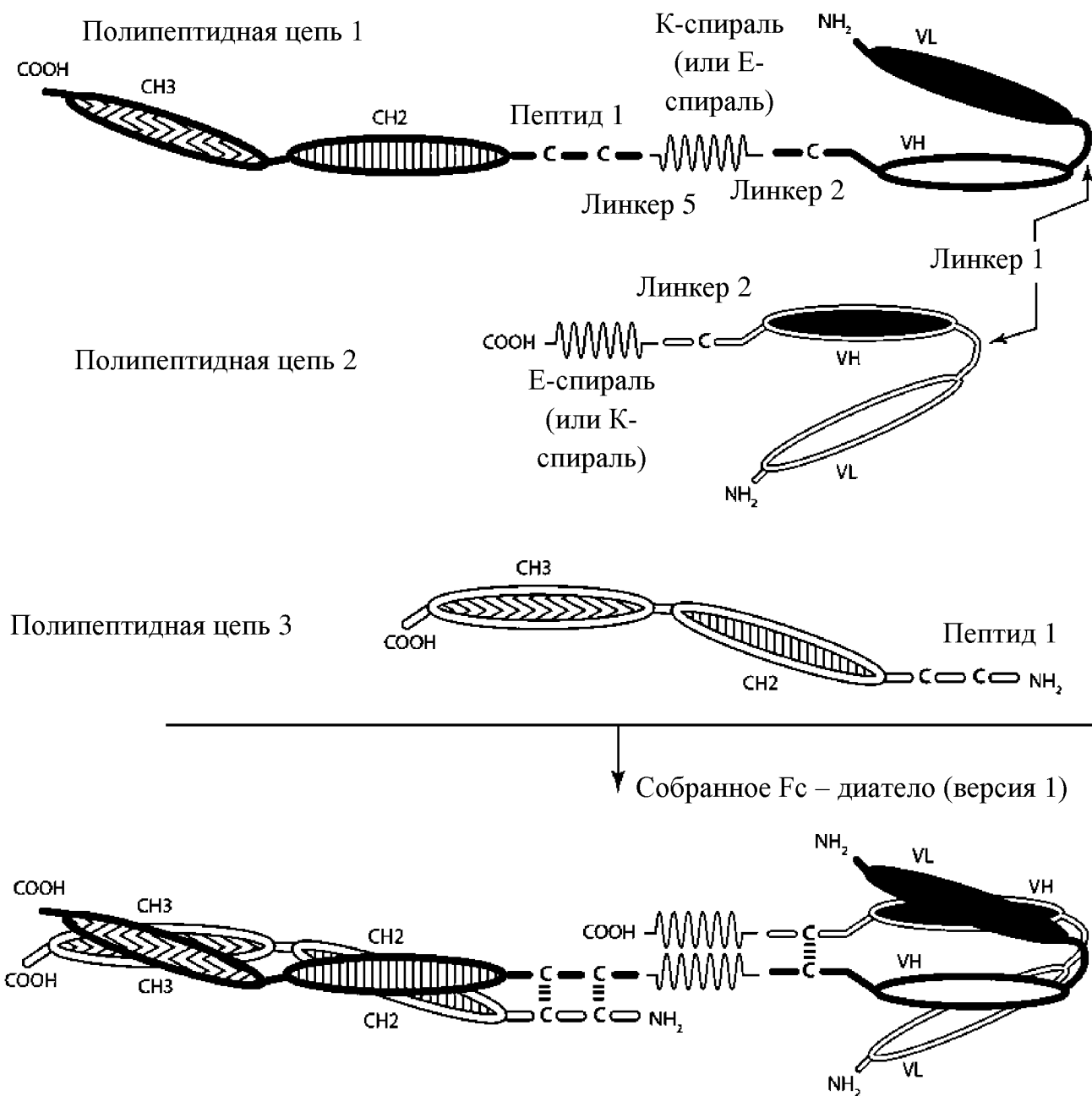
20. Применение по п. 19, при котором указанное воспалительное состояние выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ), аллергии и бронхиальной астмы.

Фигура 1

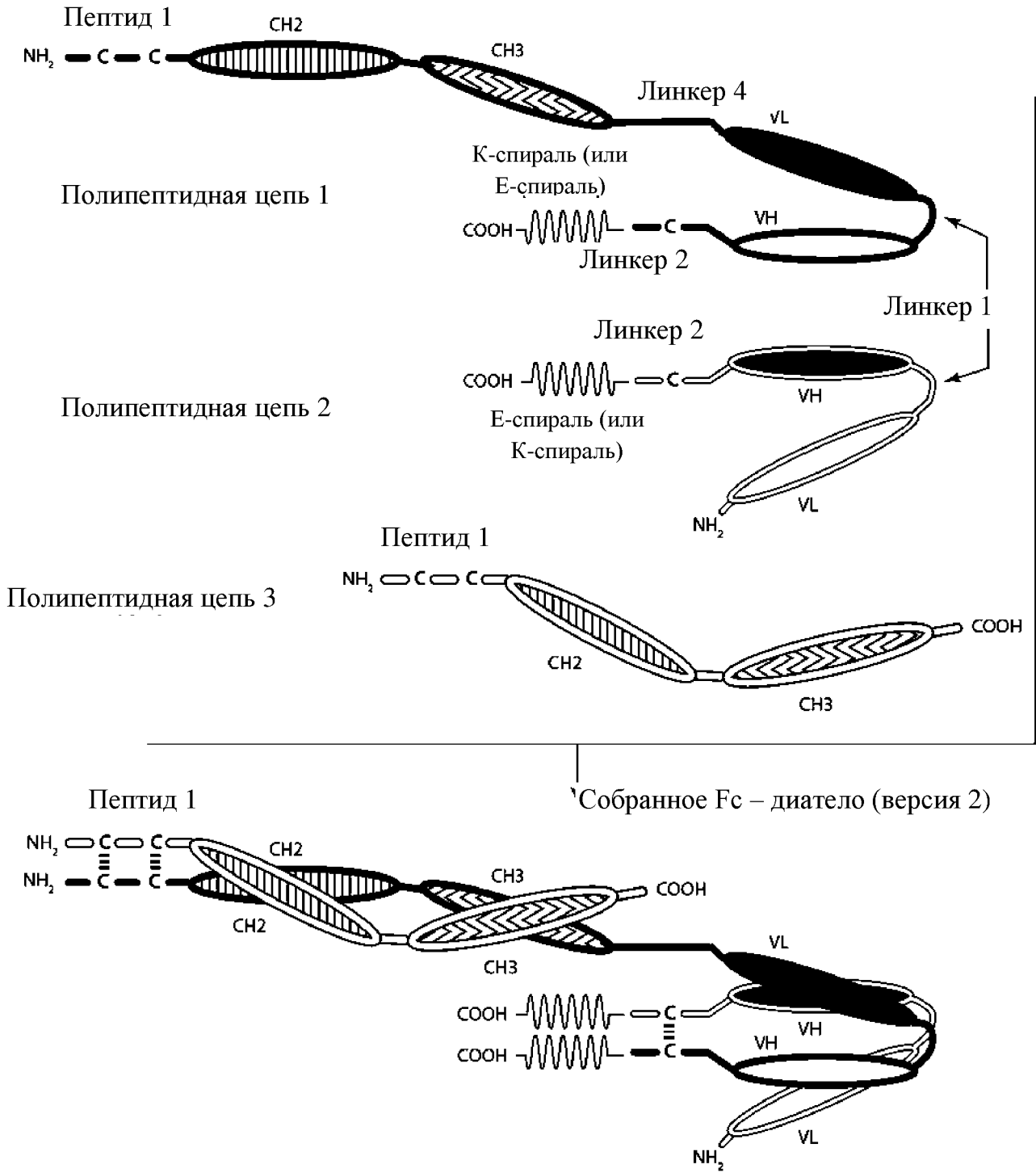




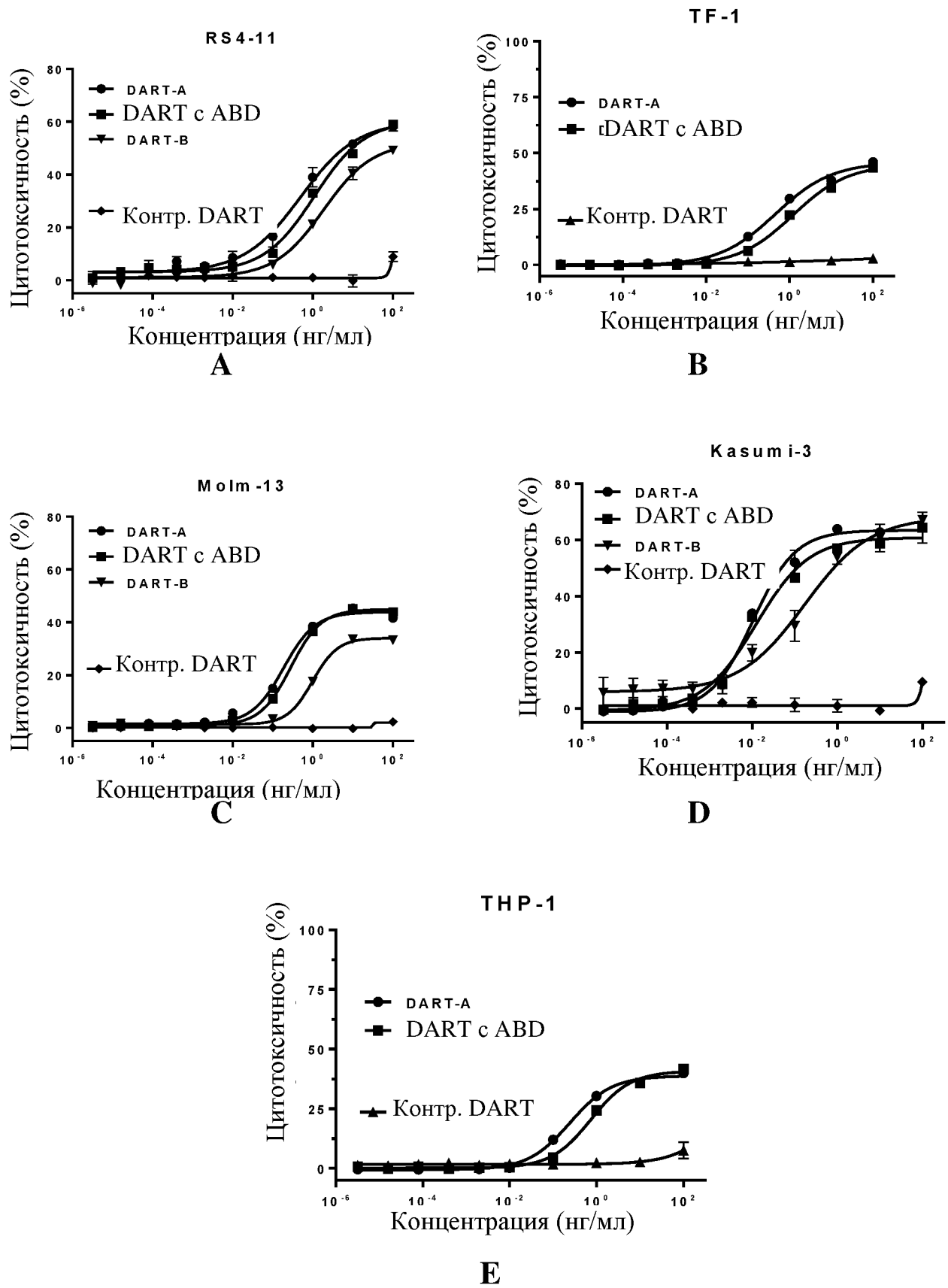
Фигура 2



Фигура 3А

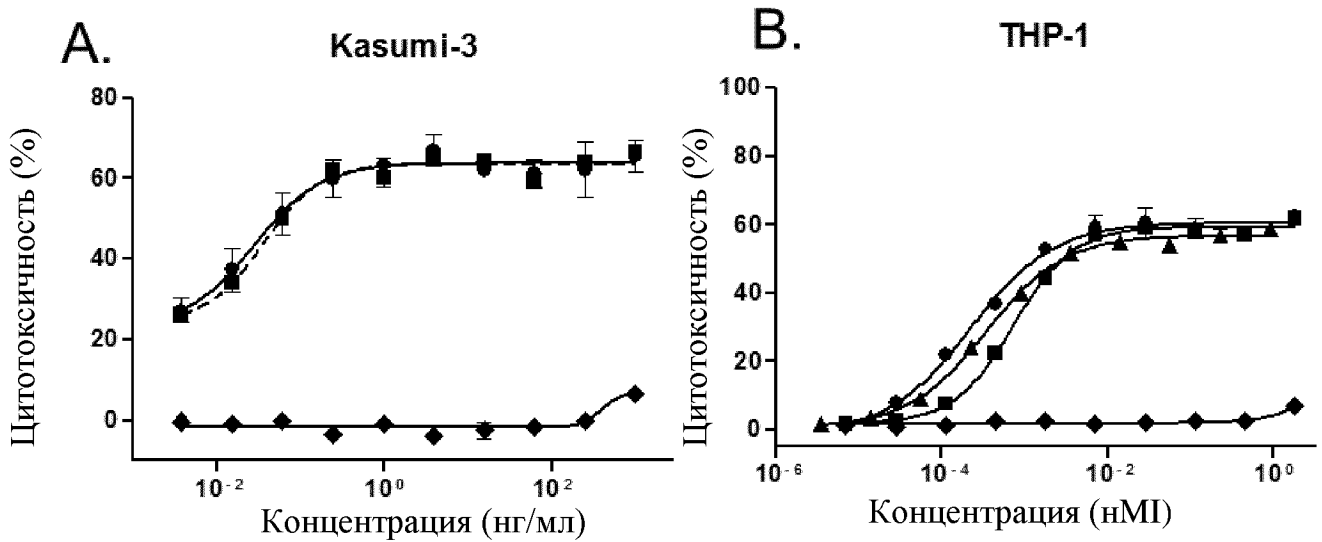


Фигура 3В

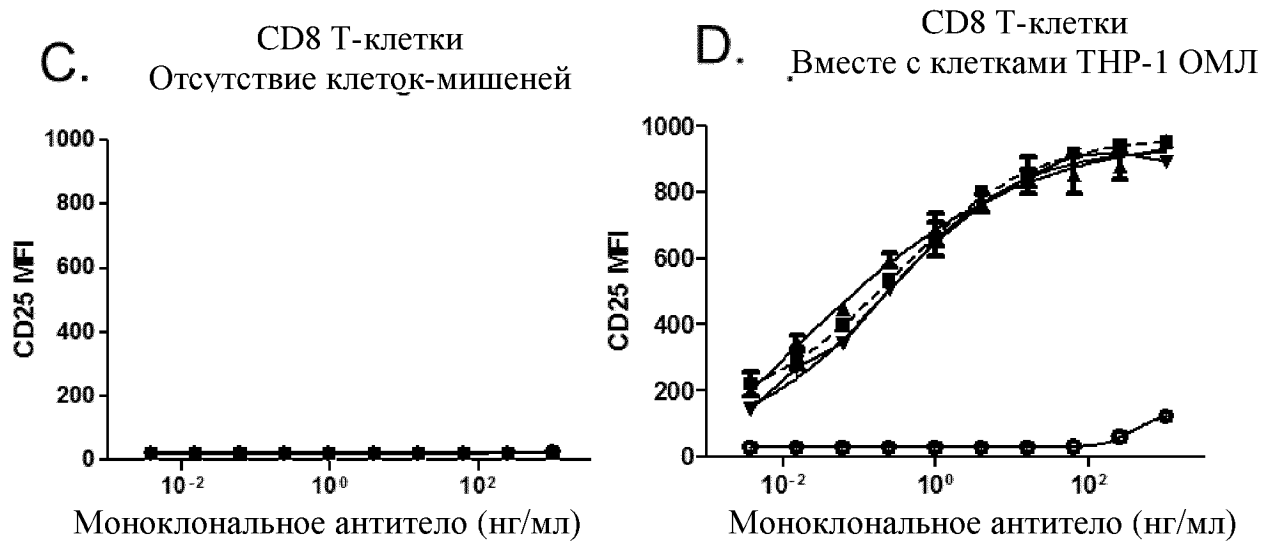


Фигура 4

Выраженная активность CTL в отношении клеток ОМЛ

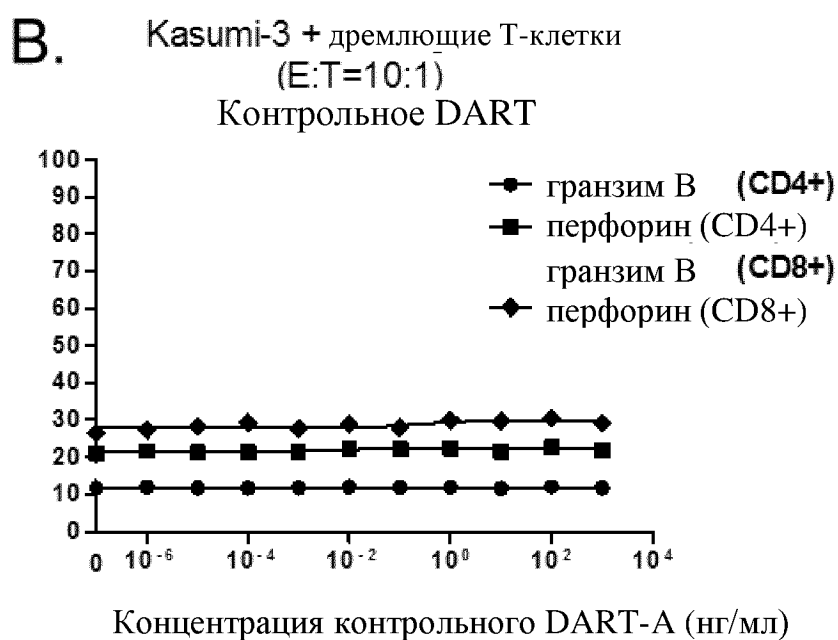
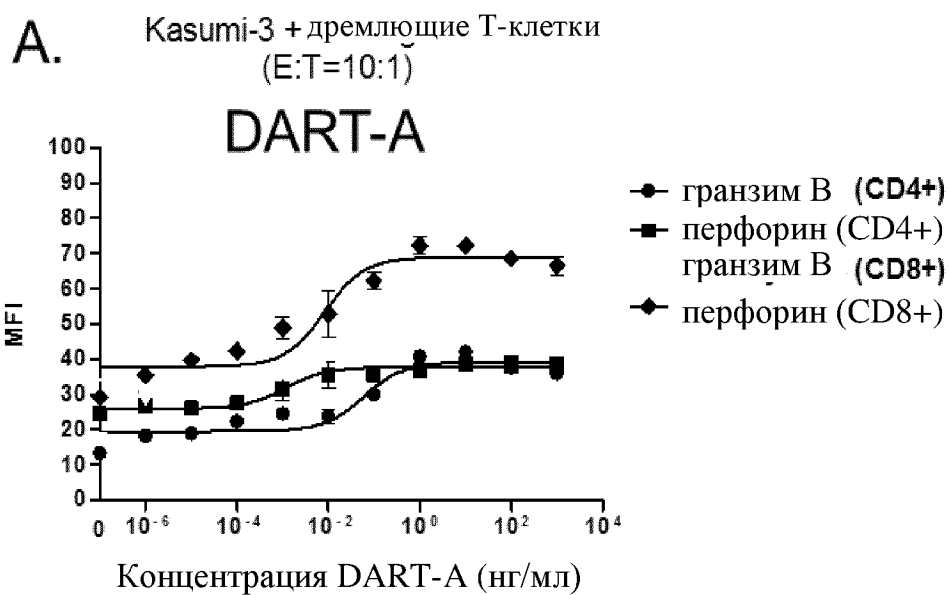


Отсутствие Т-клеточной активации при отсутствии совместного вовлечения



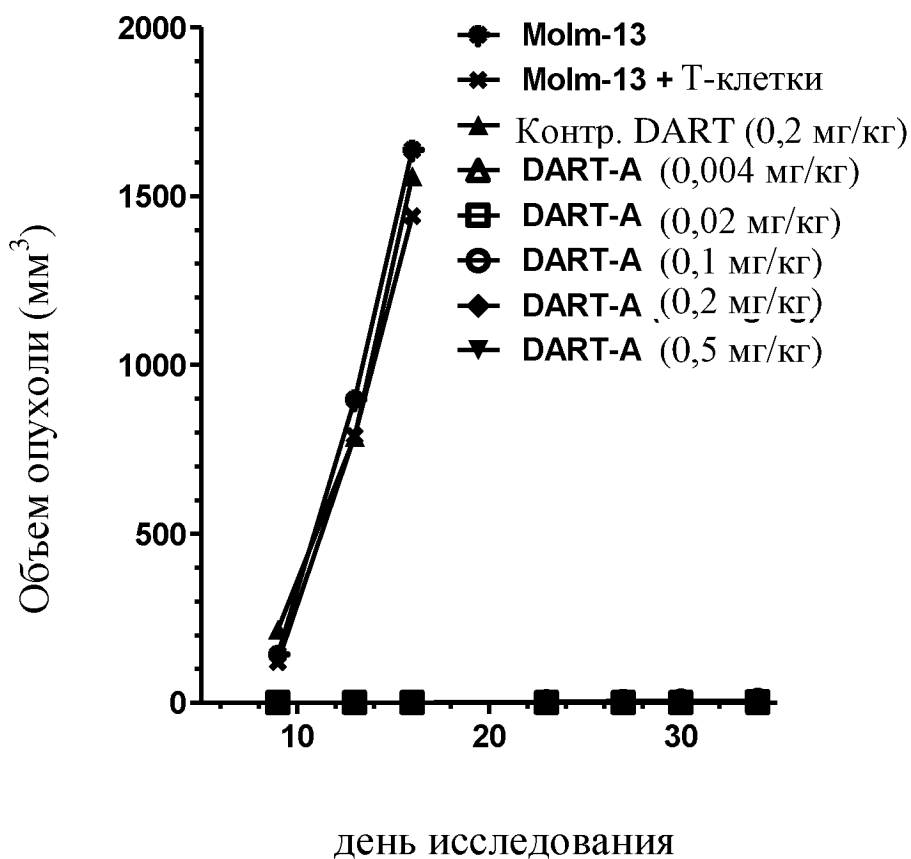
- ◆ DART-A
- DART-A w/ABD
- ▲ DART-A w/Fc
- ◆ Контр. DART

Фигура 5

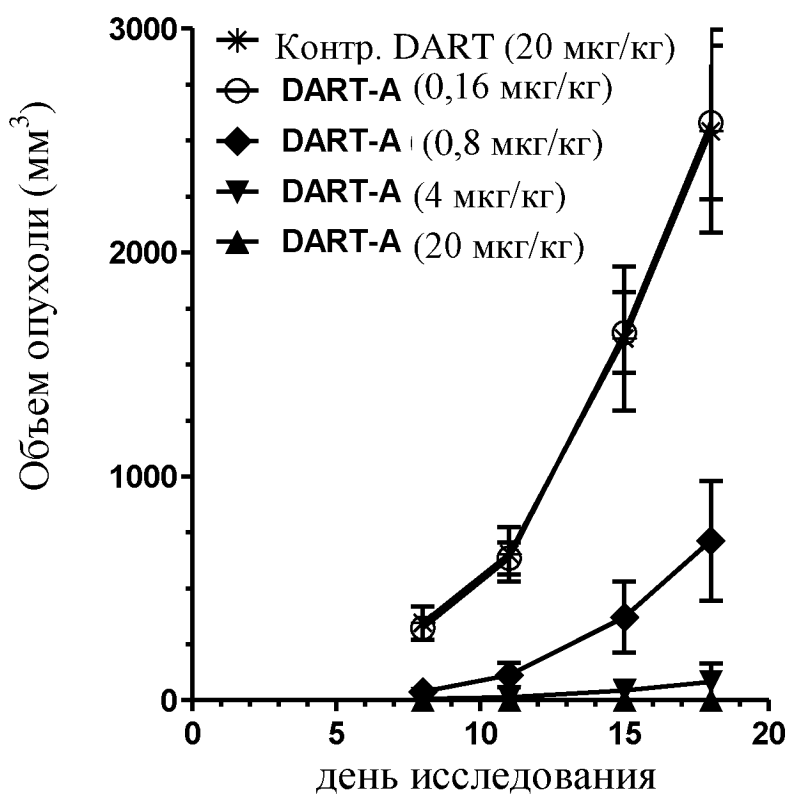


Фигура 6

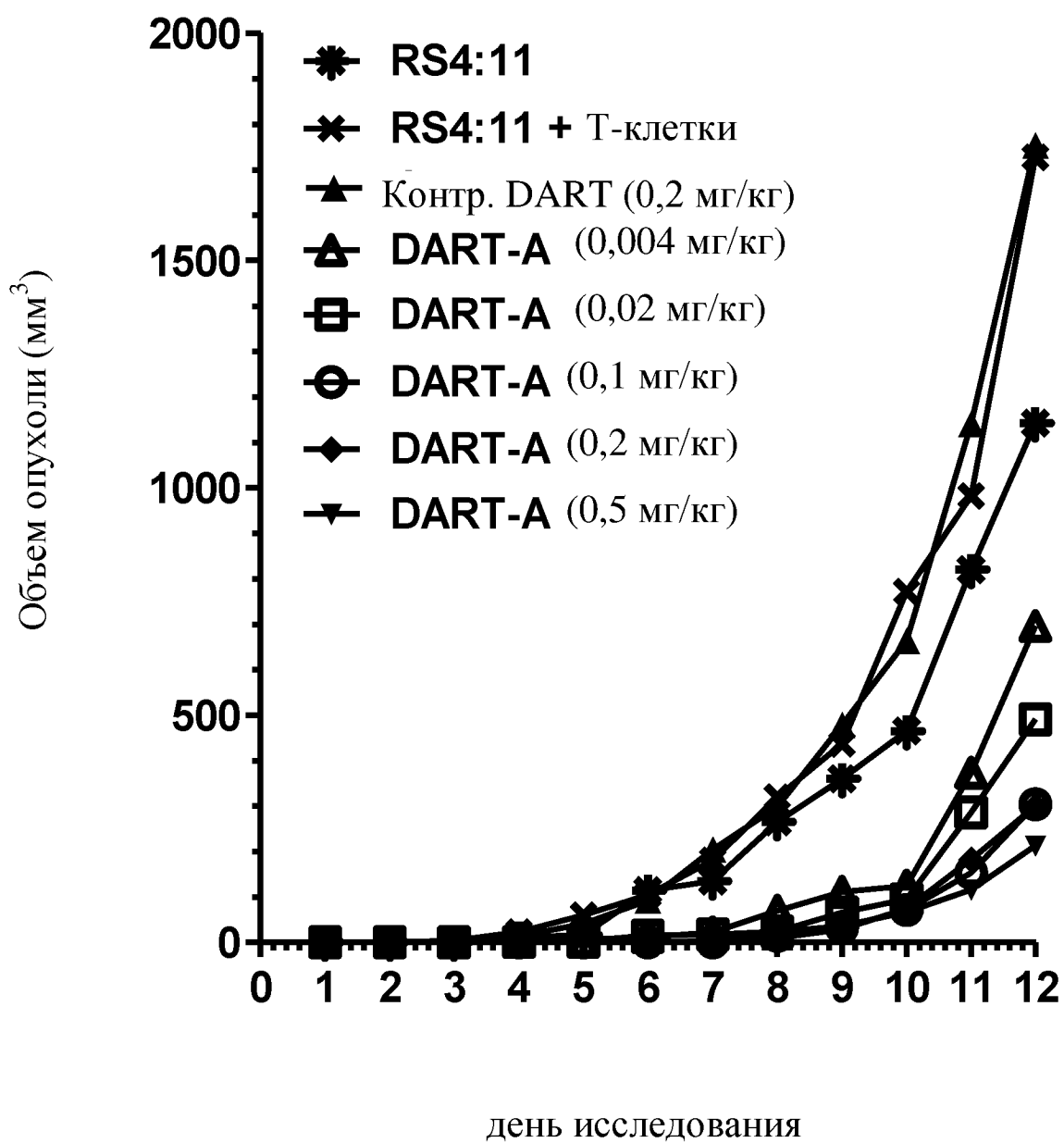
А.



В.

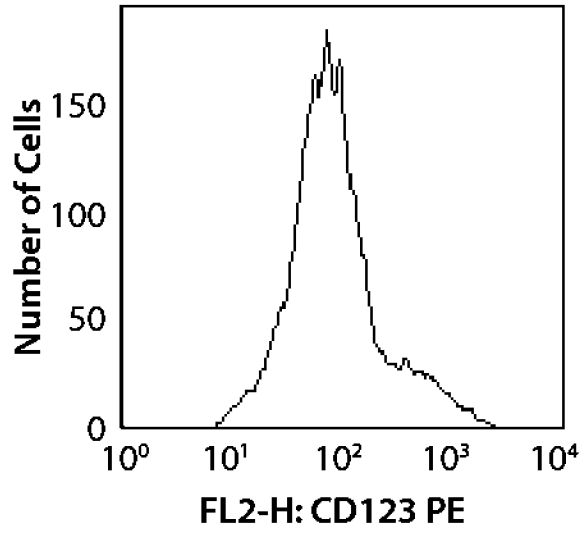
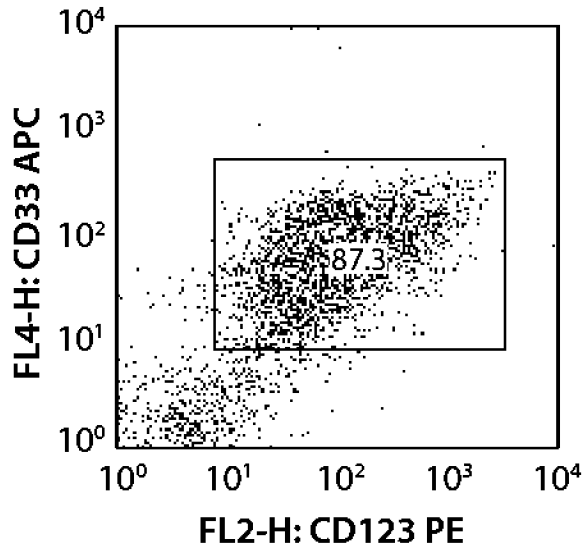


Фигура 7

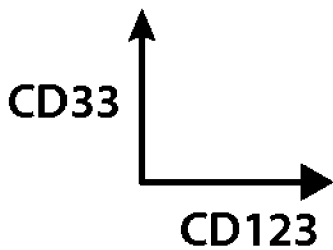
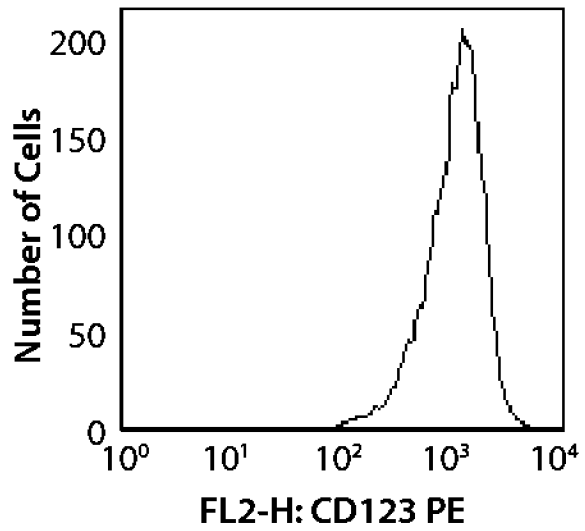
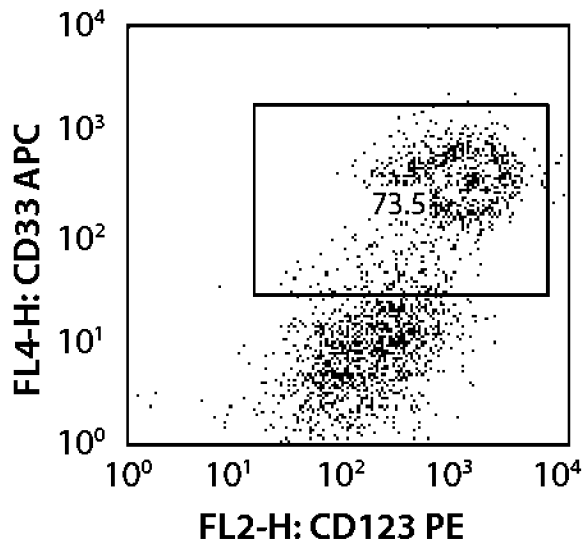


Фигура 8

A **AML BM MNC**



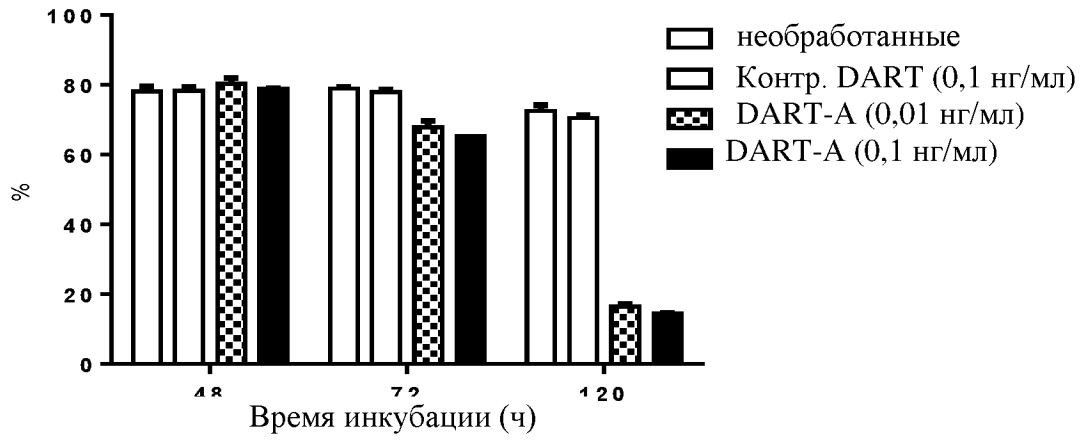
B **Kasumi-3**



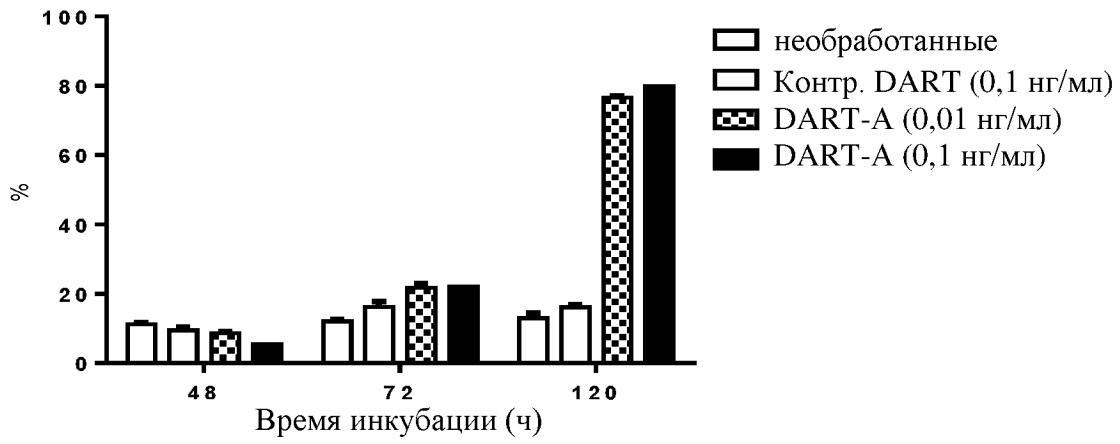
Фигура 9

A

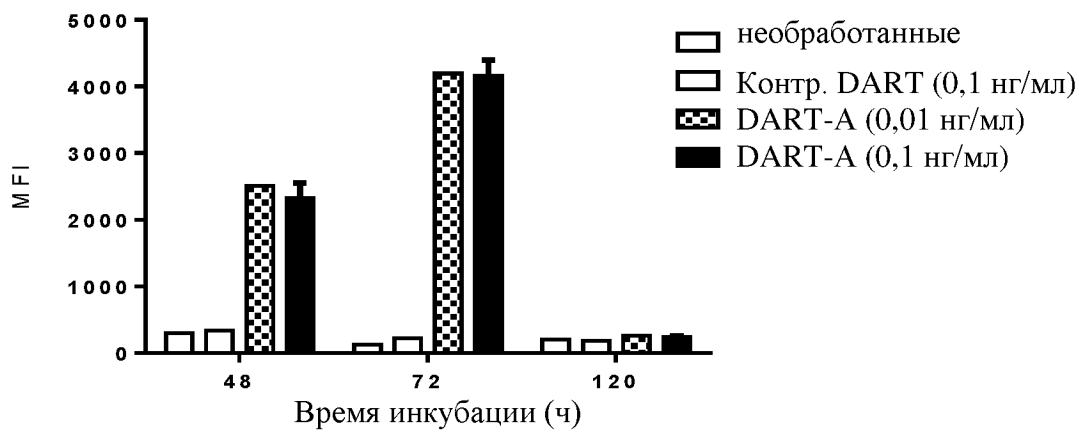
Лейкозные бластные клетки

**B**

Т-клетки

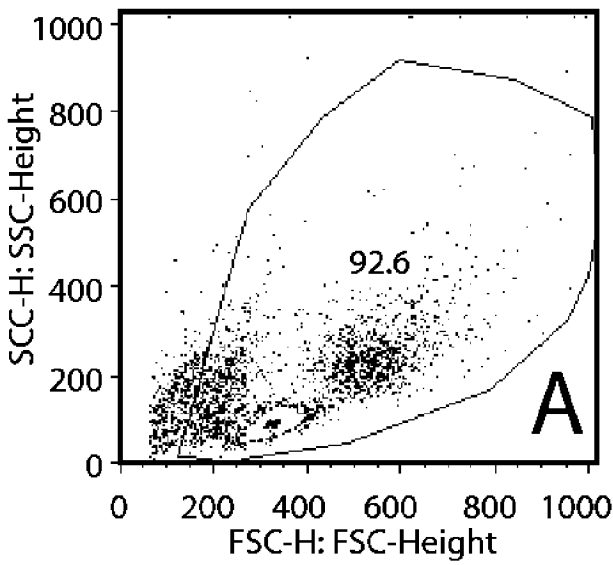
**C**

CD25 MFI

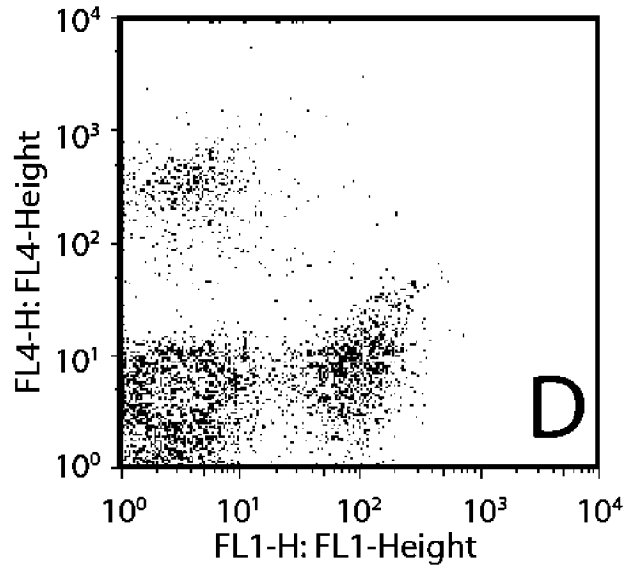


Фигура 10

Нормальные РВМС

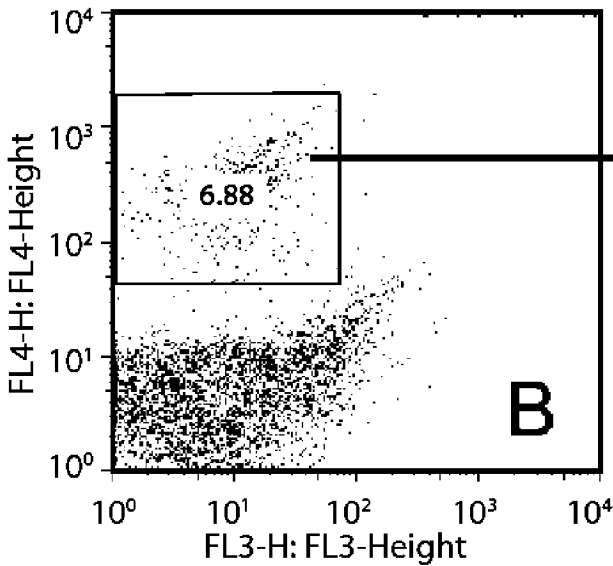


негейтированные
контроль ALL P1
число событий 10000



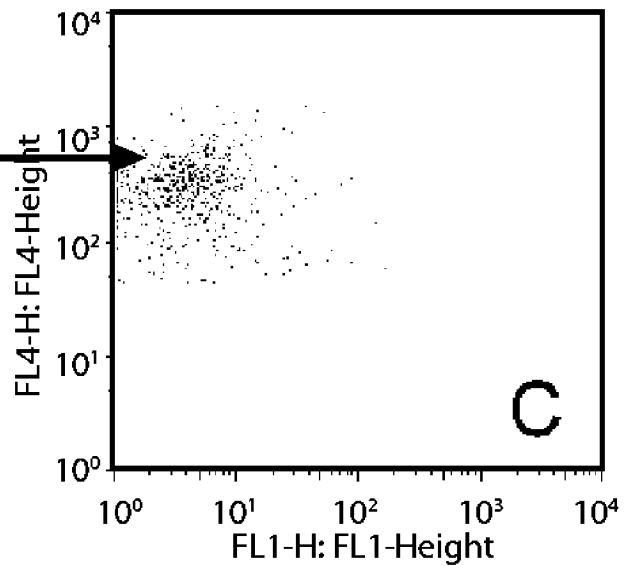
FSC-H, SSC-H покласс
контроль ALL P1
число событий 9262

CD19-APC
CD123-FITC



FSC-H, SSC-H покласс
контроль ALL P1
число событий 9262

CD19-APC
CD34-PerCP-CY5

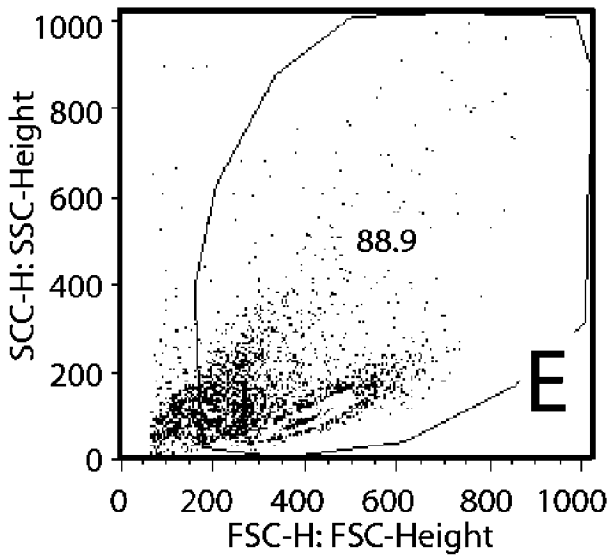


FL3-H, FL4-H покласс
контроль ALL P1
число событий 637

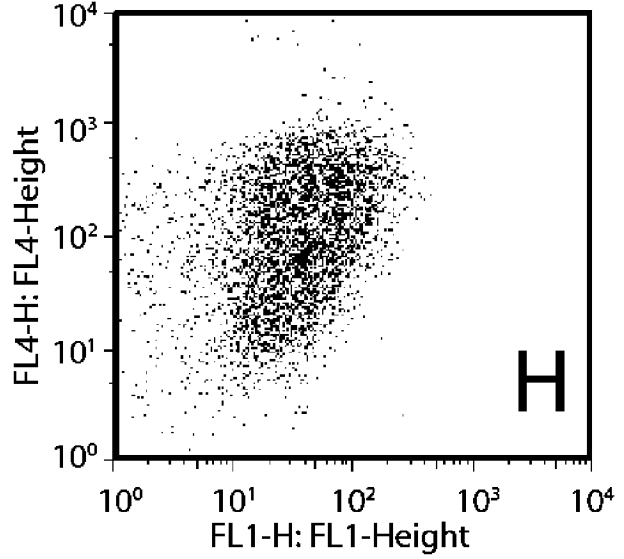
CD19-APC
CD123-FITC

Фигура 11

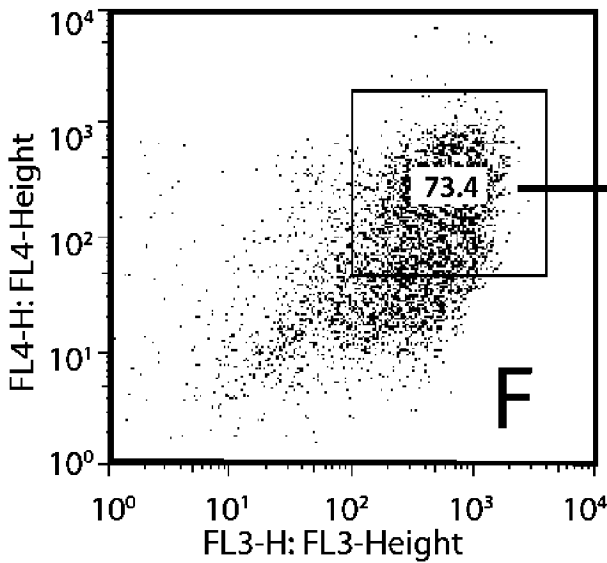
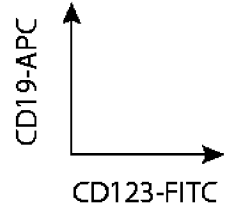
ALL PBMC



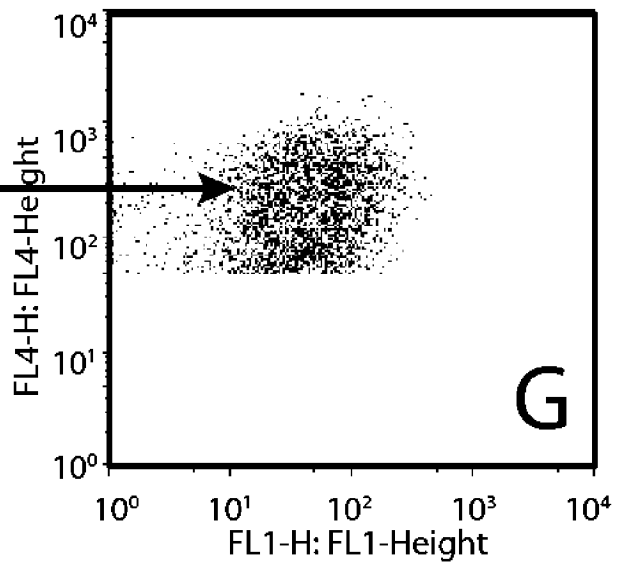
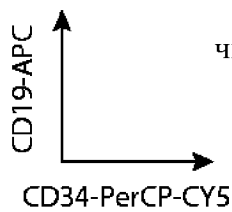
негейтированные
2470 ALL P1
число событий 10000



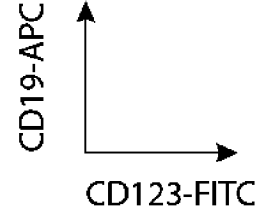
FSC-H, SSC-H :покласс
2470 ALL P1
число событий 8893



FSC-H, SSC-H :покласс
2470 ALL P1
число событий 8893

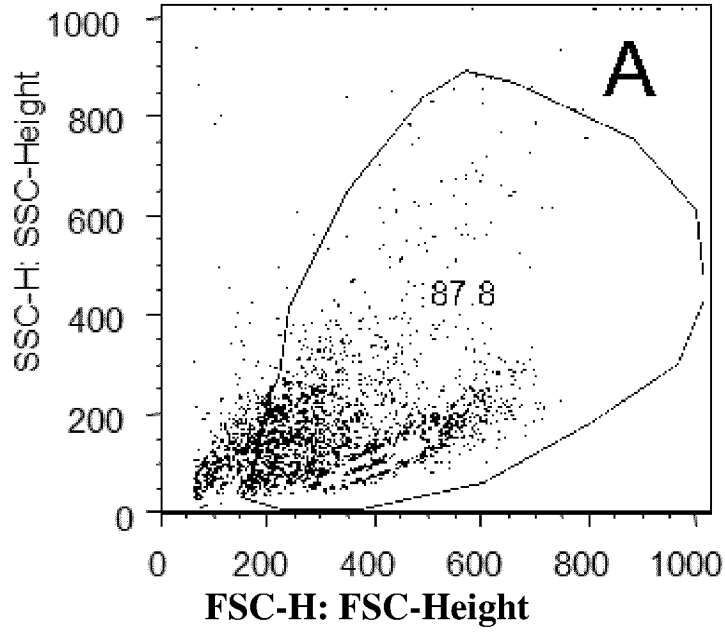


FL4-H, FL3-H :покласс
2470 ALL P1
число событий 6528

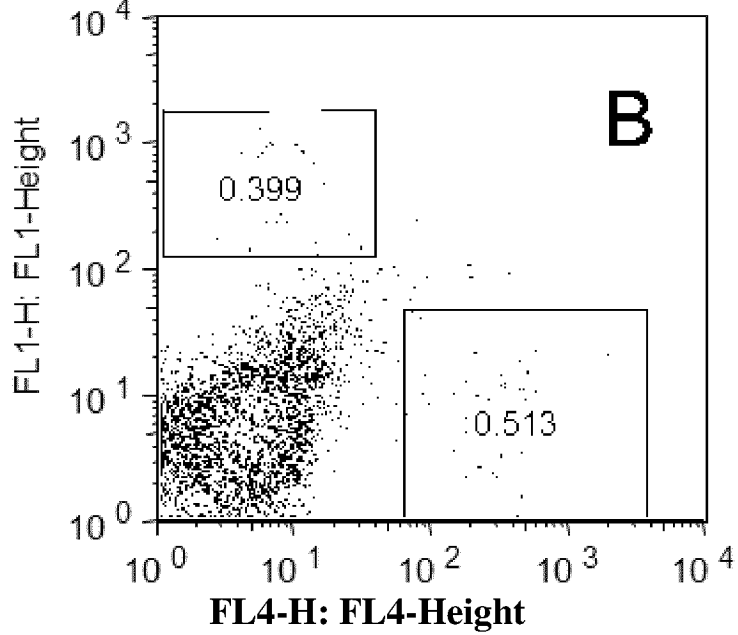


Фигура 11 (продолжение)

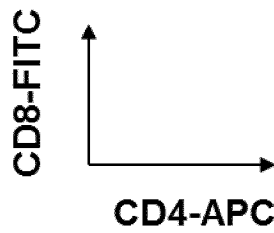
РВМС при ALL



негейтированные
2470 ALL Т-клетки
число событий :: 10000



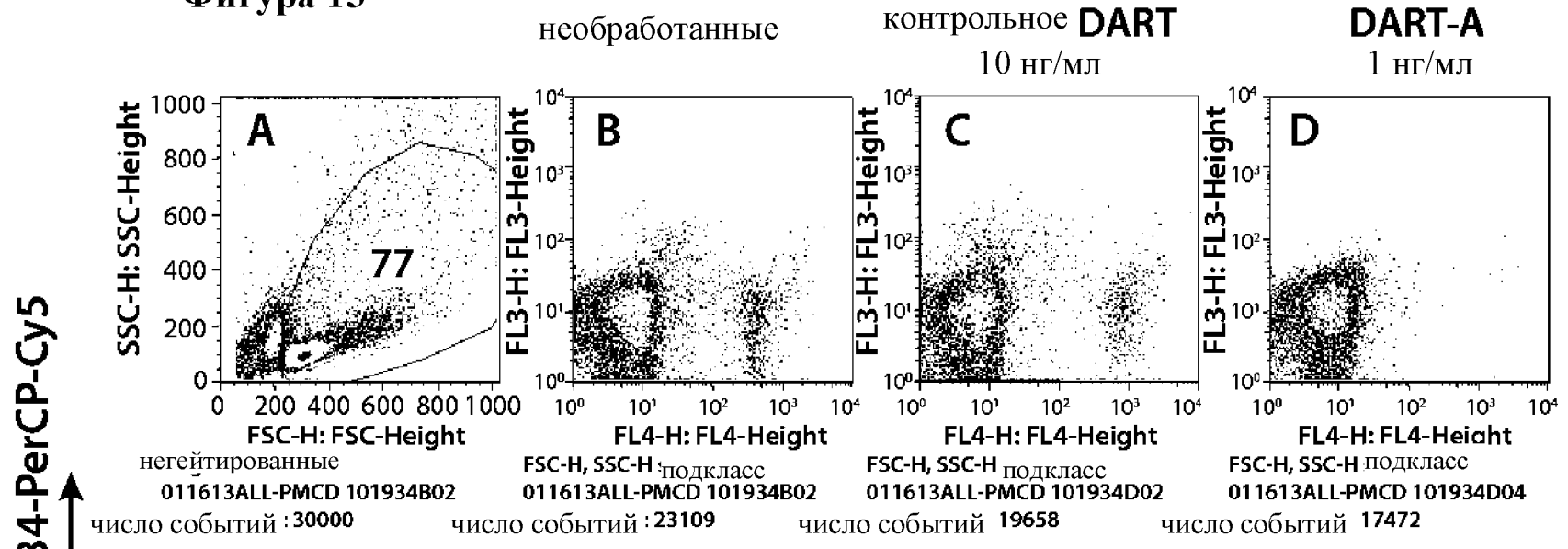
FSC-H, SSC-H подкласс
2470 ALL Т-клетки
число событий :: 8777



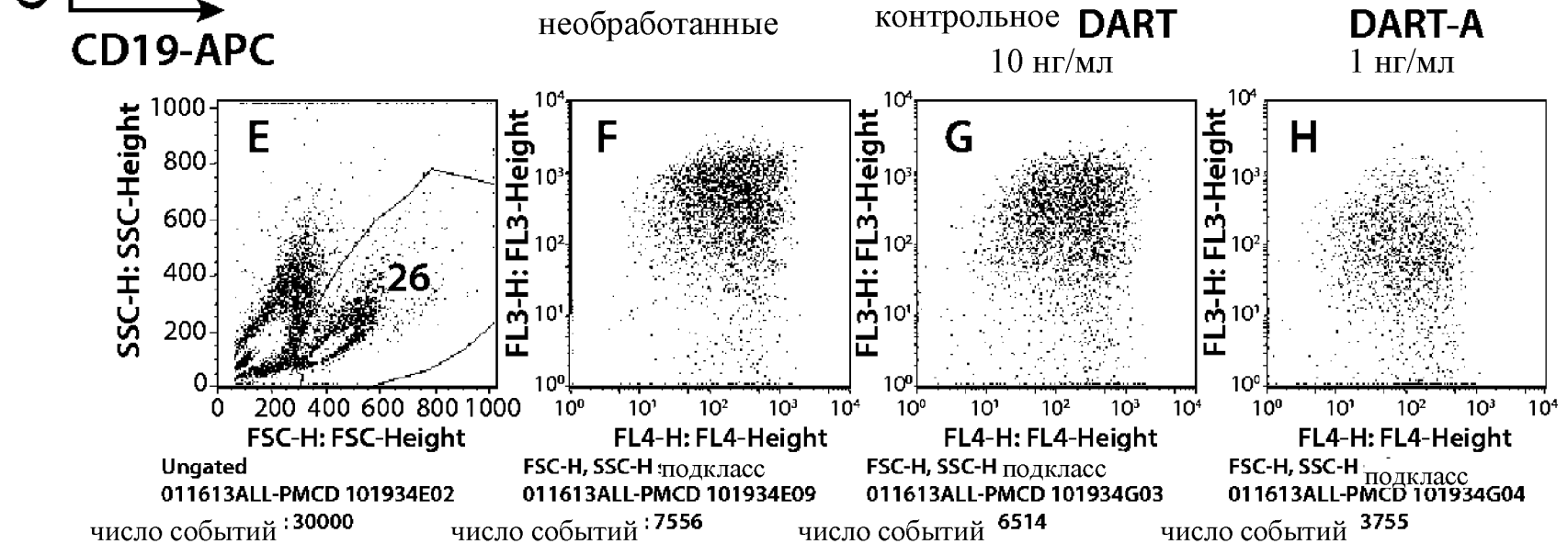
Фигура 12

Фигура 13

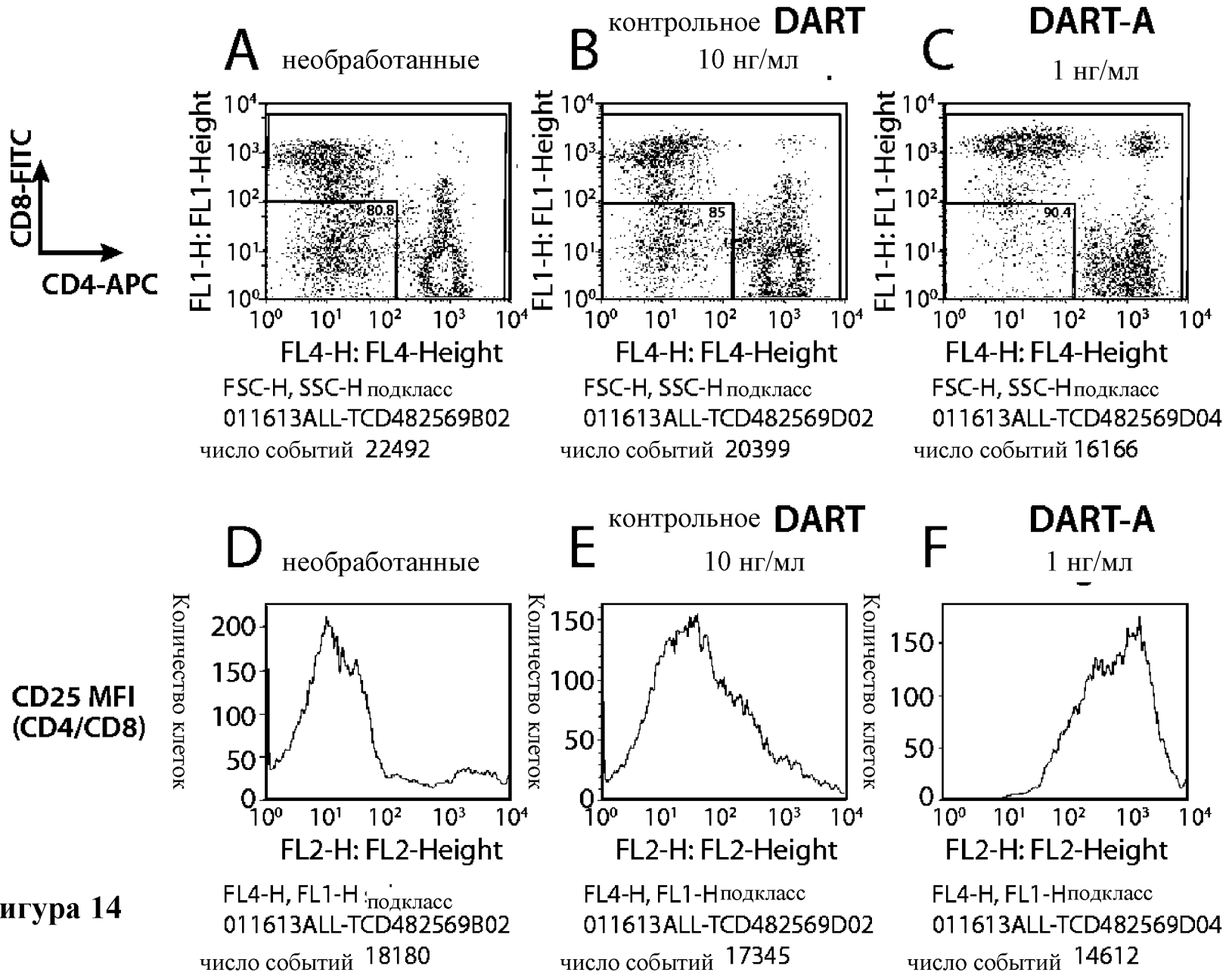
Нормальные PBMC



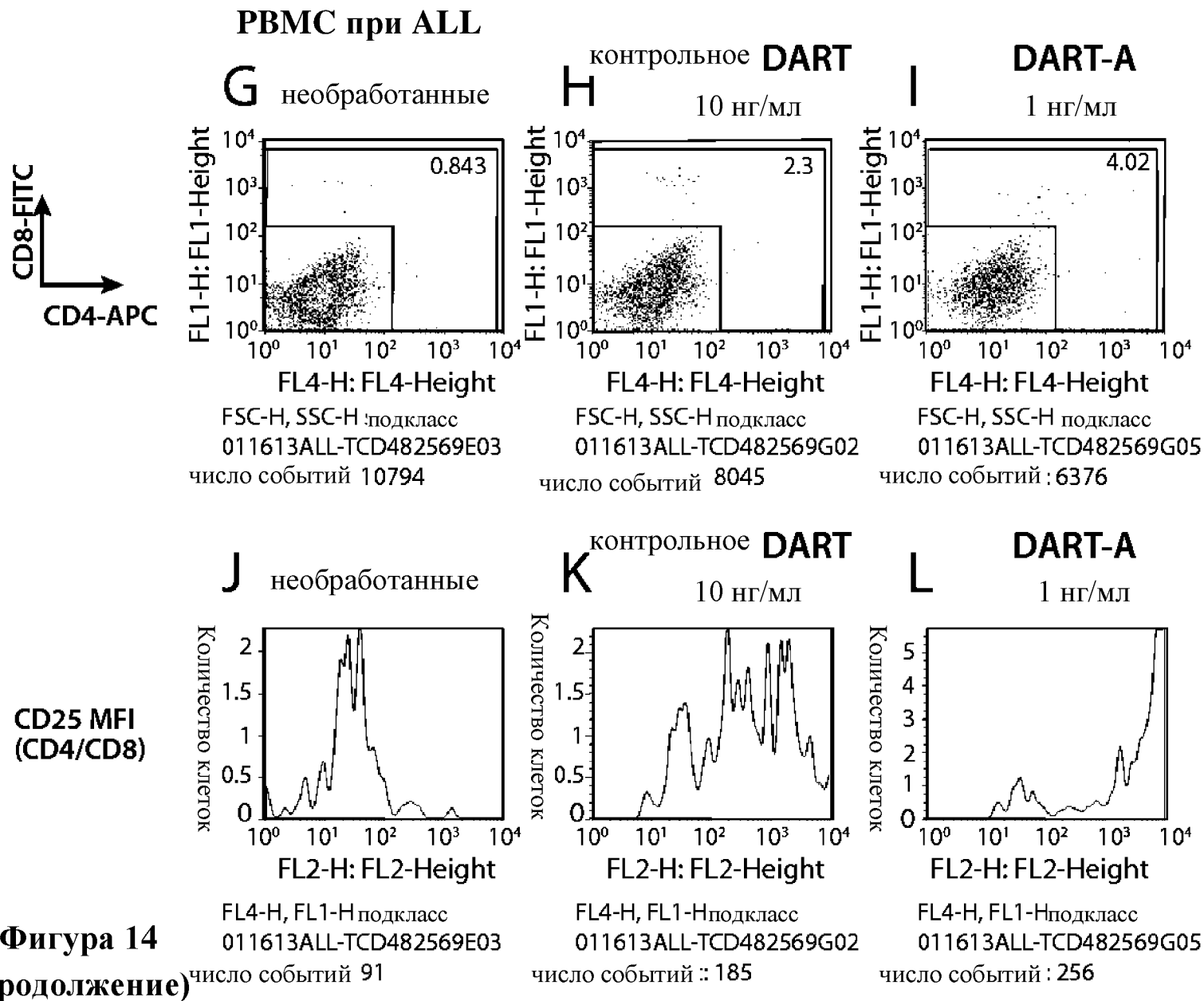
PBMC при ALL



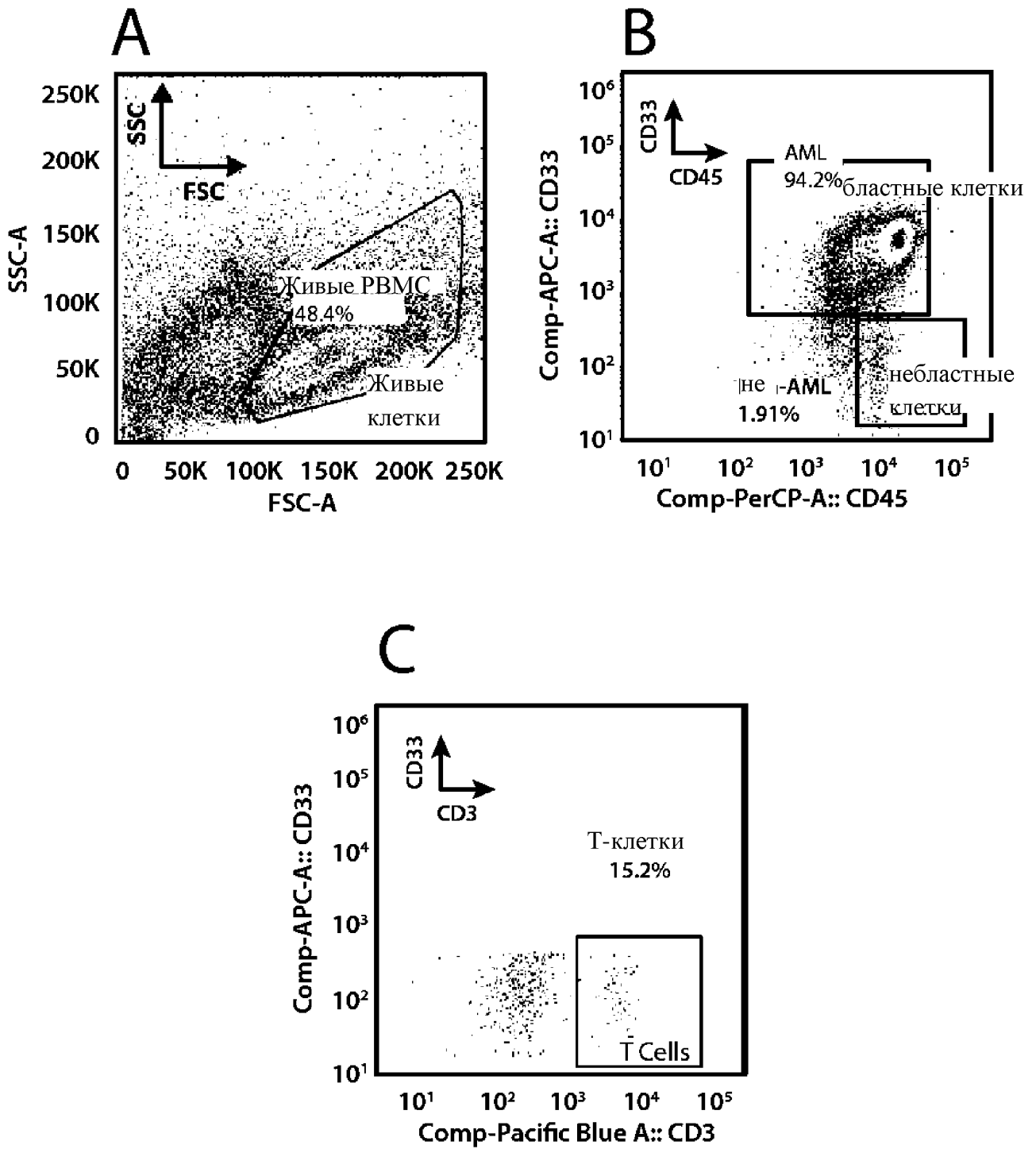
Нормальные РВМС



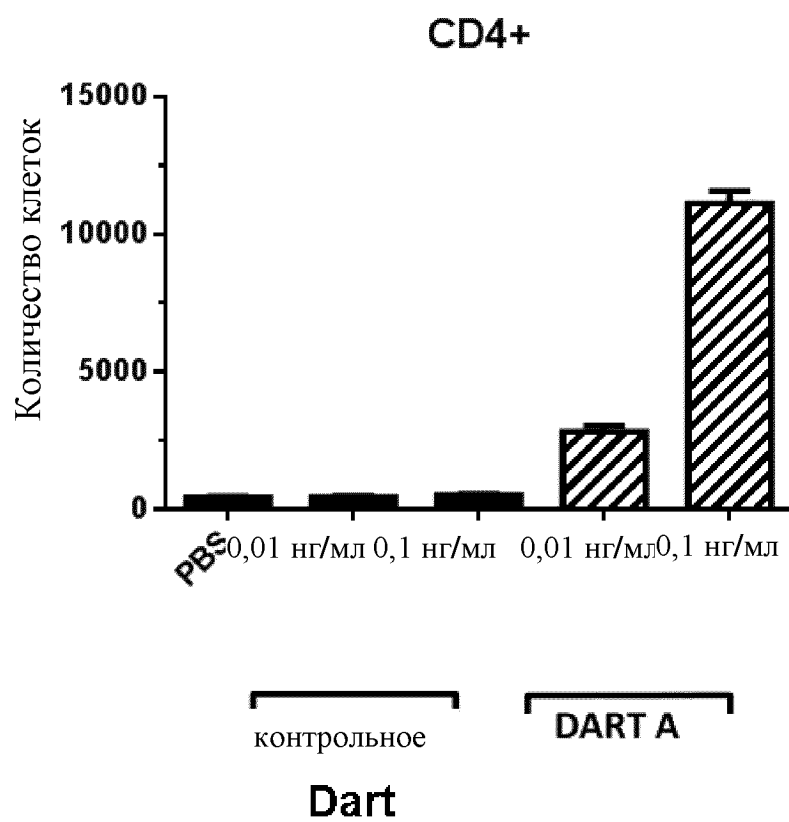
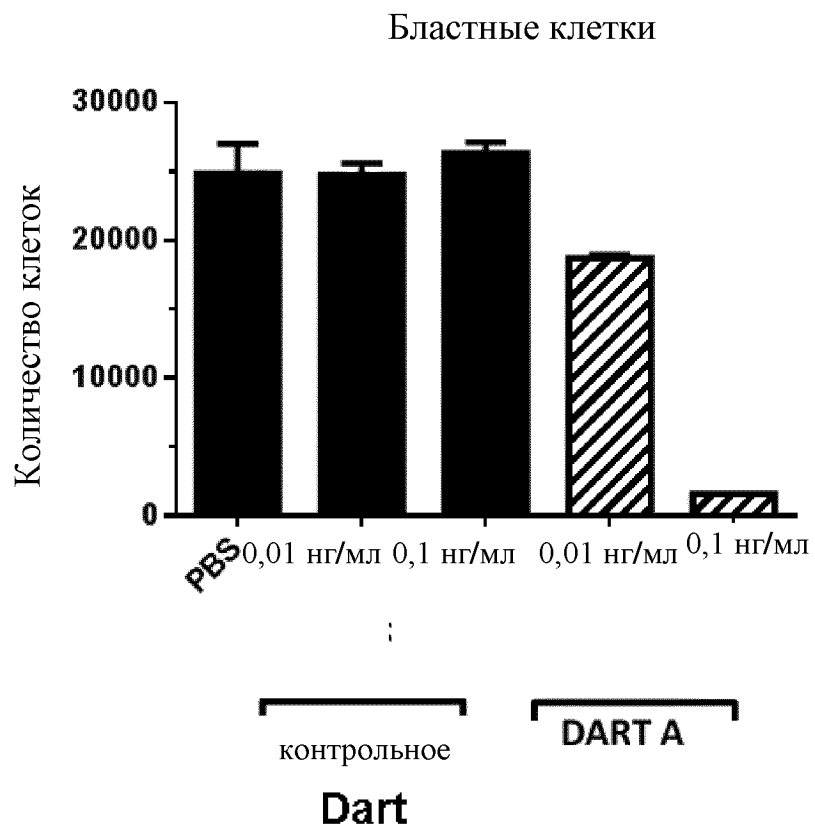
Фигура 14



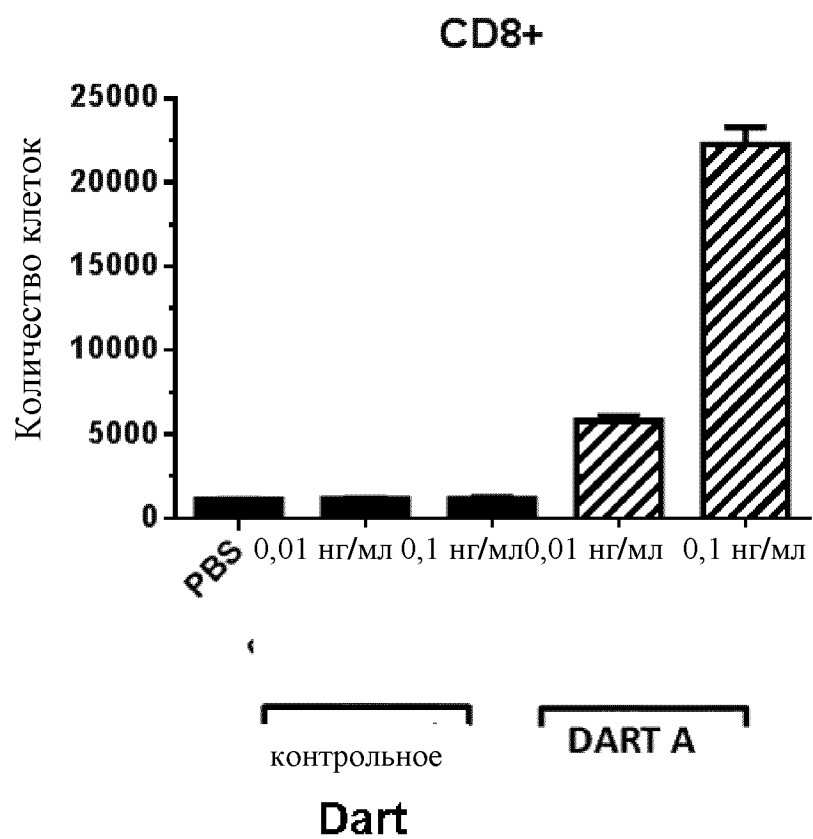
Фигура 14
(продолжение)



Фигура 15

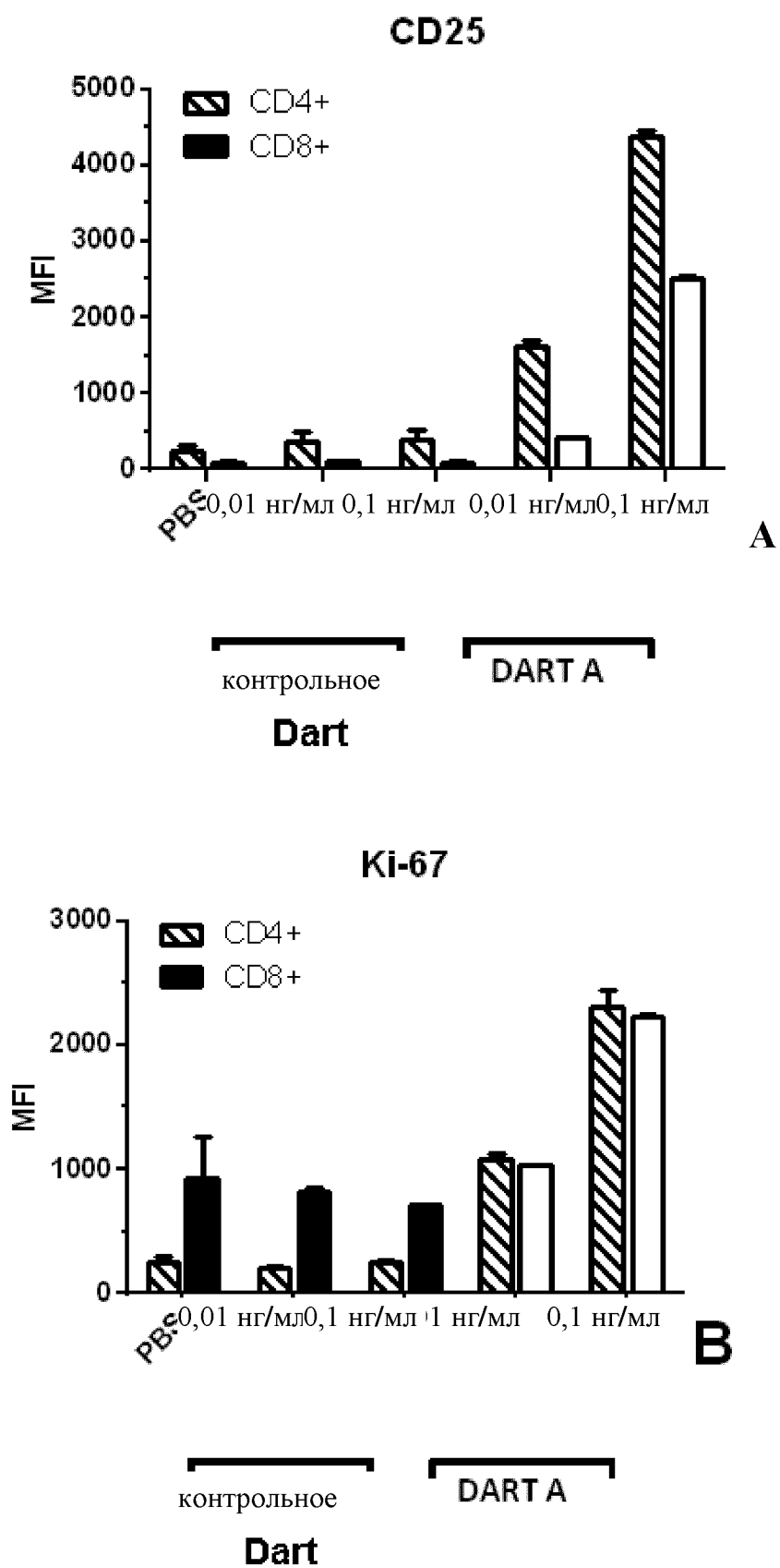


Фигура 16

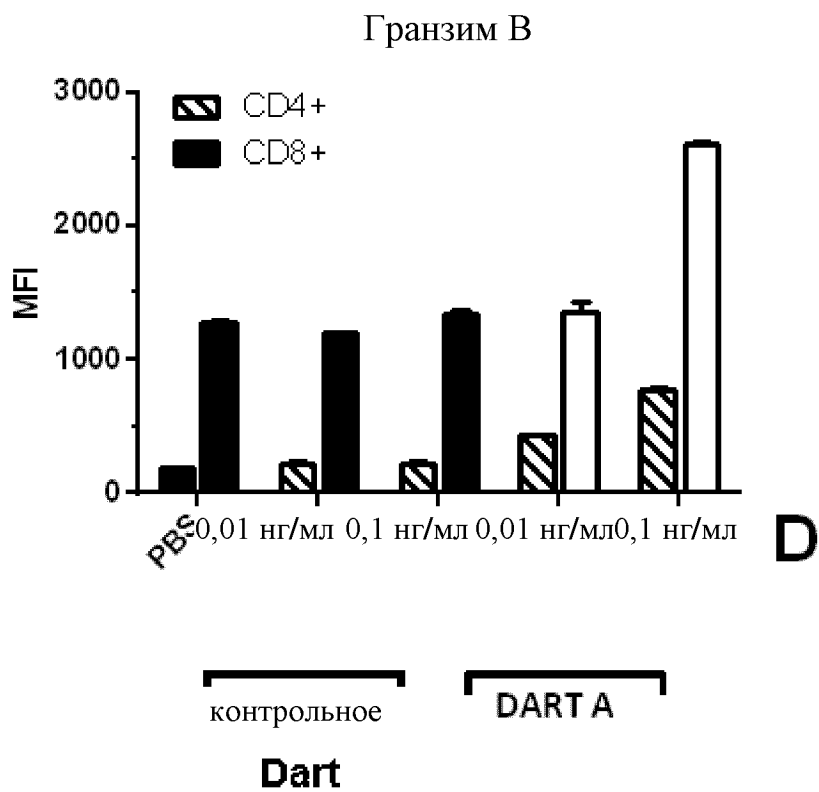
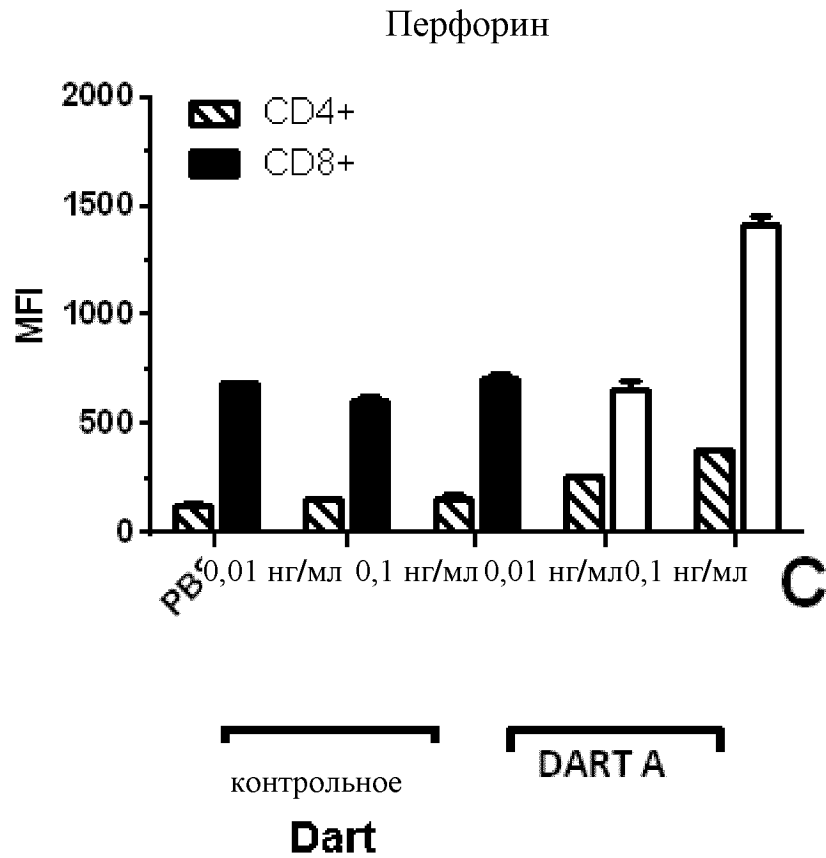


С

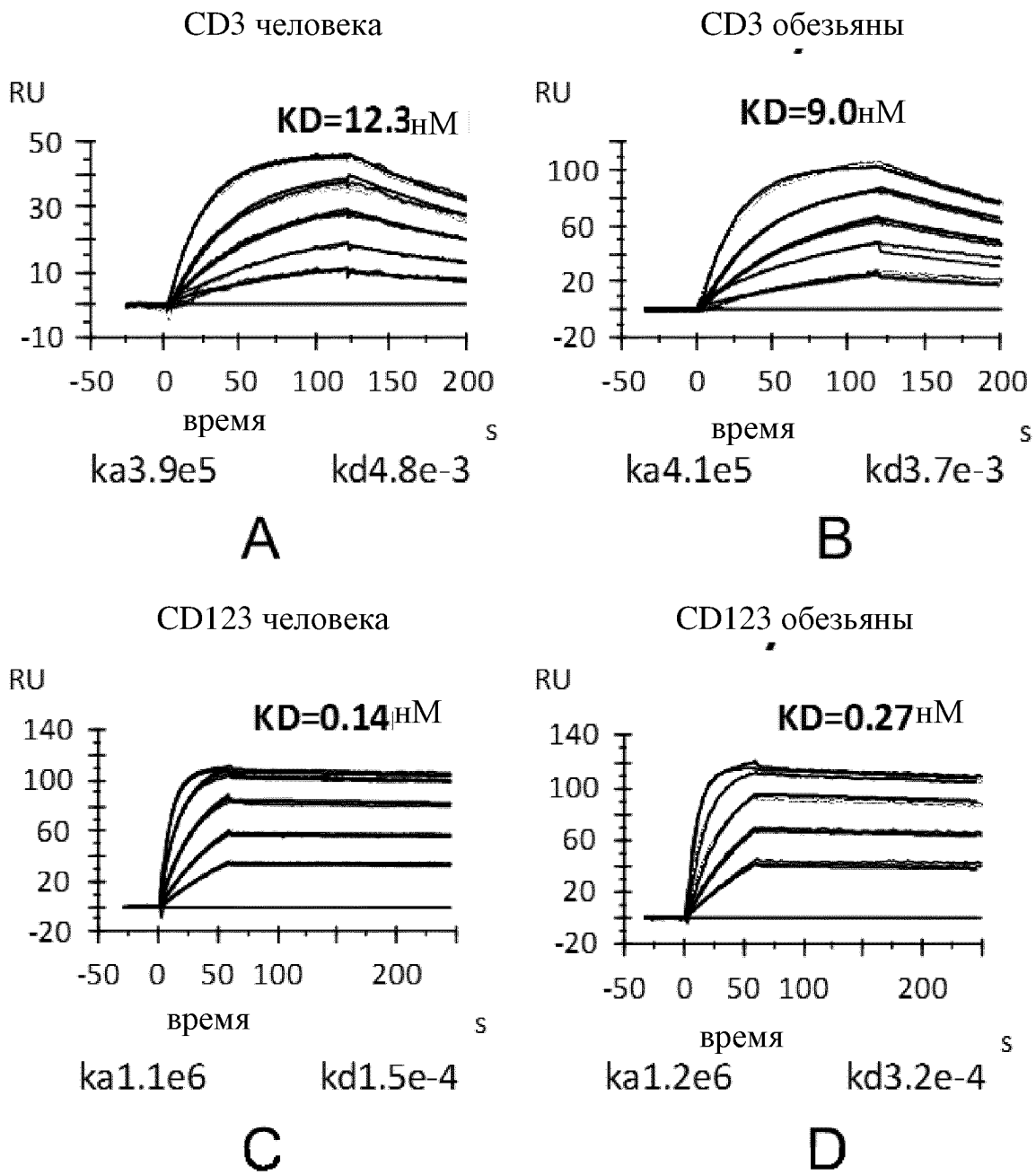
Фигура 16 (продолжение)



Фигура 17

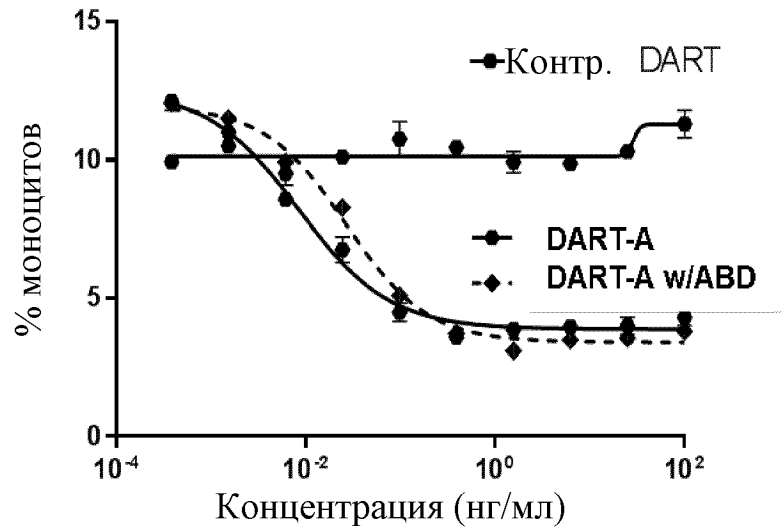


Фигура 17 (продолжение)

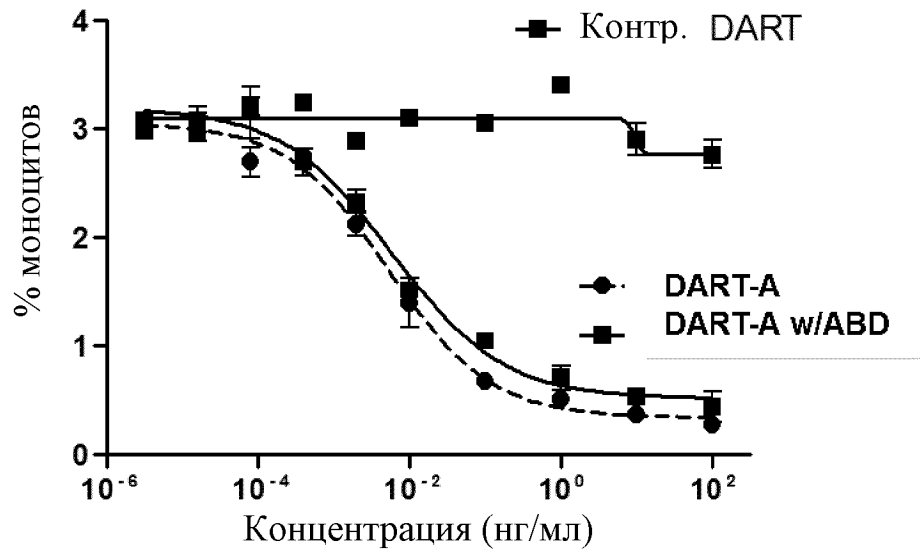


Фигура 18

А. Аутологическая деплеция моноцитов РВМС человека

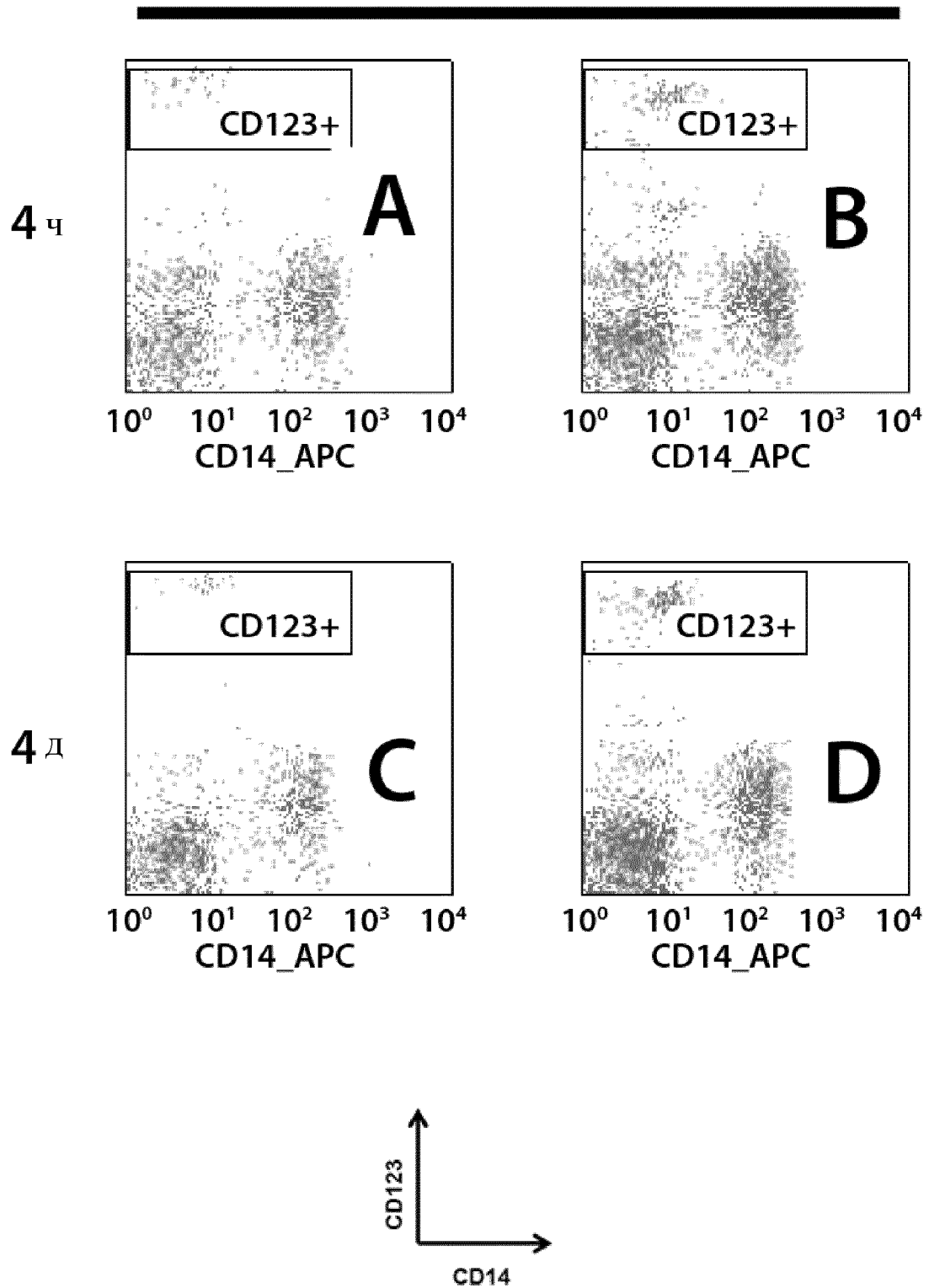


В. Аутологическая деплеция моноцитов РВМС яванского макака



Фигура 19

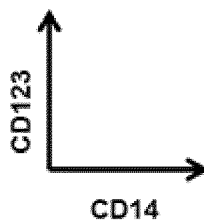
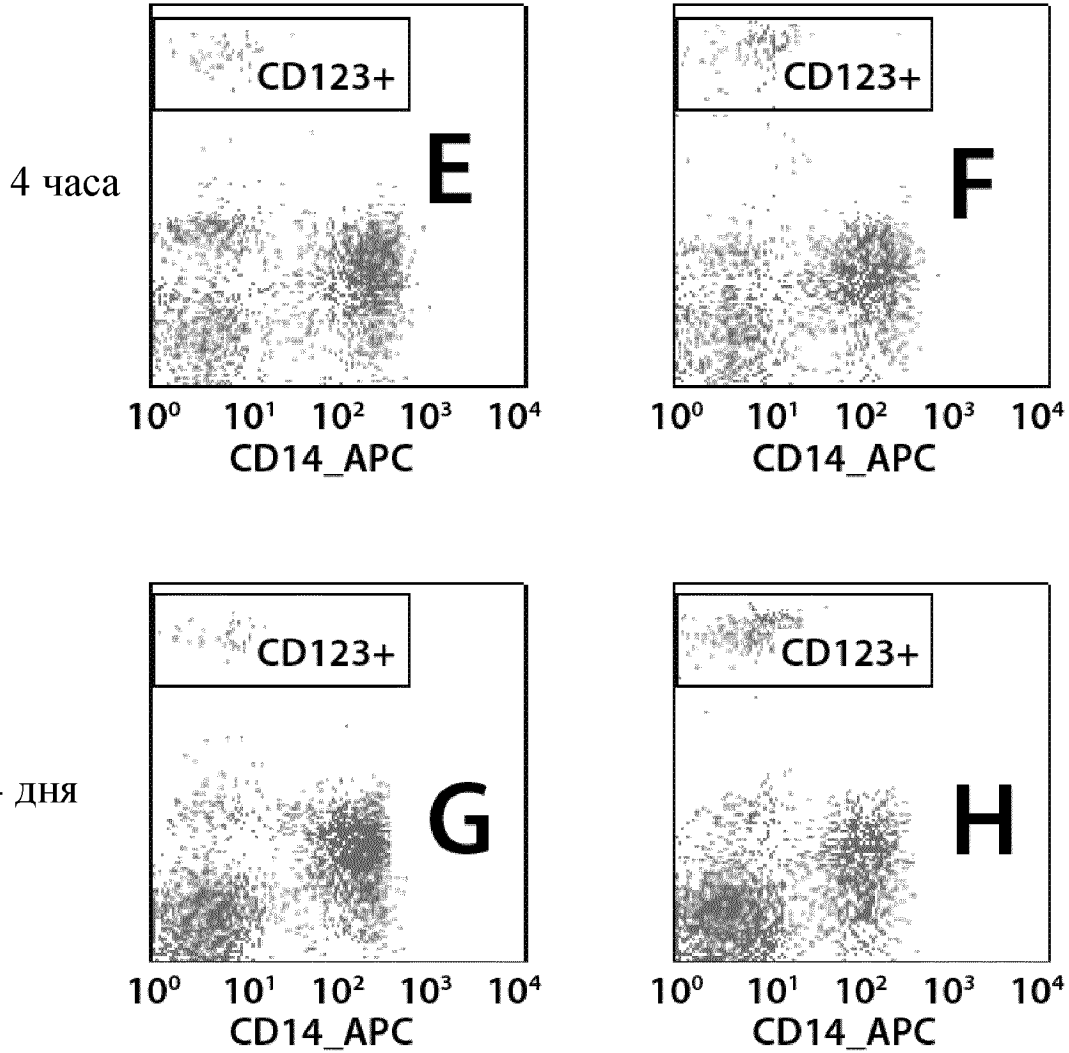
Инертный носитель + наполнитель



Фигура 20

Контрольное **DART**

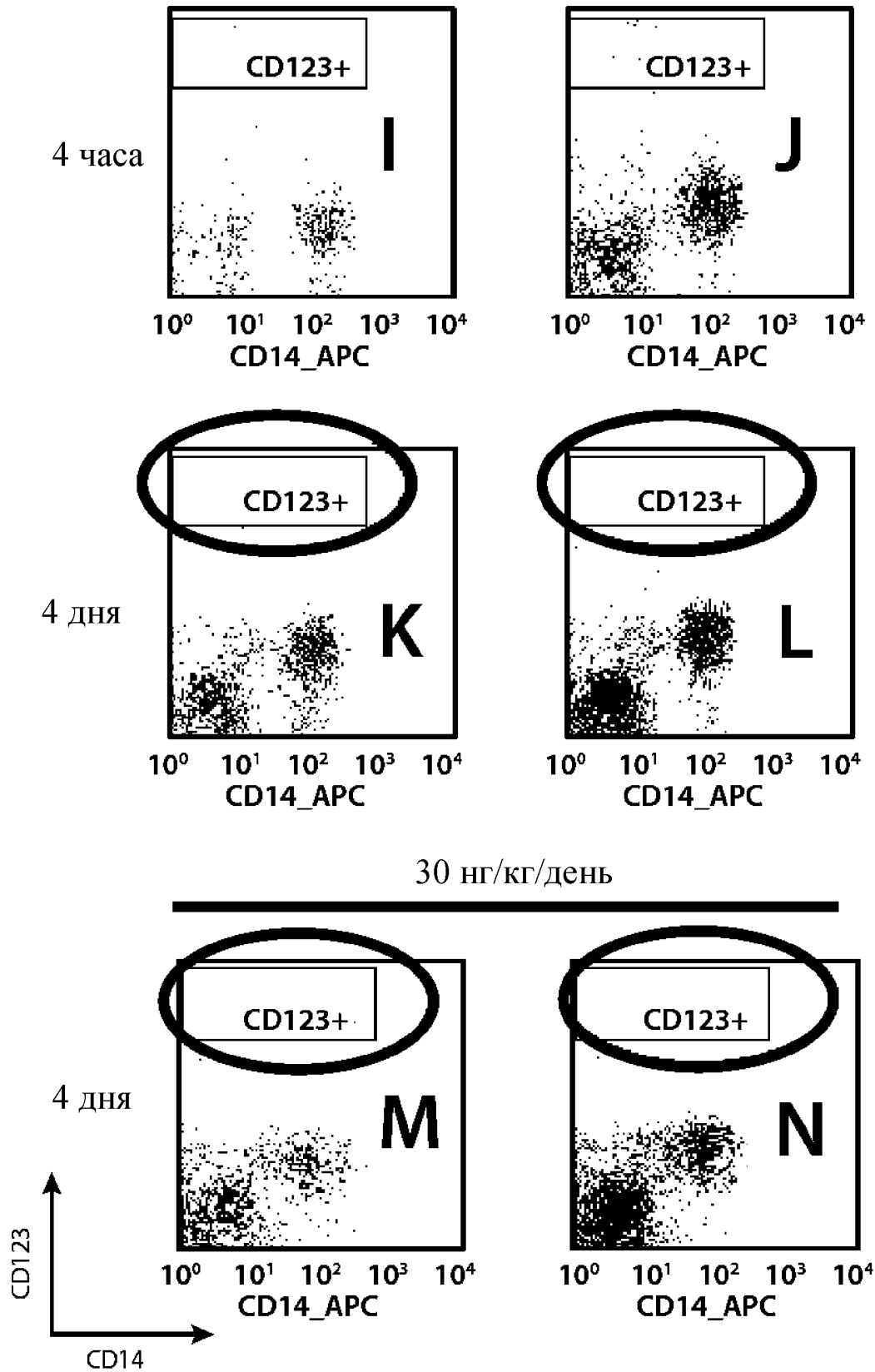
100 мкг/кг/день



Фигура 20 (продолжение)

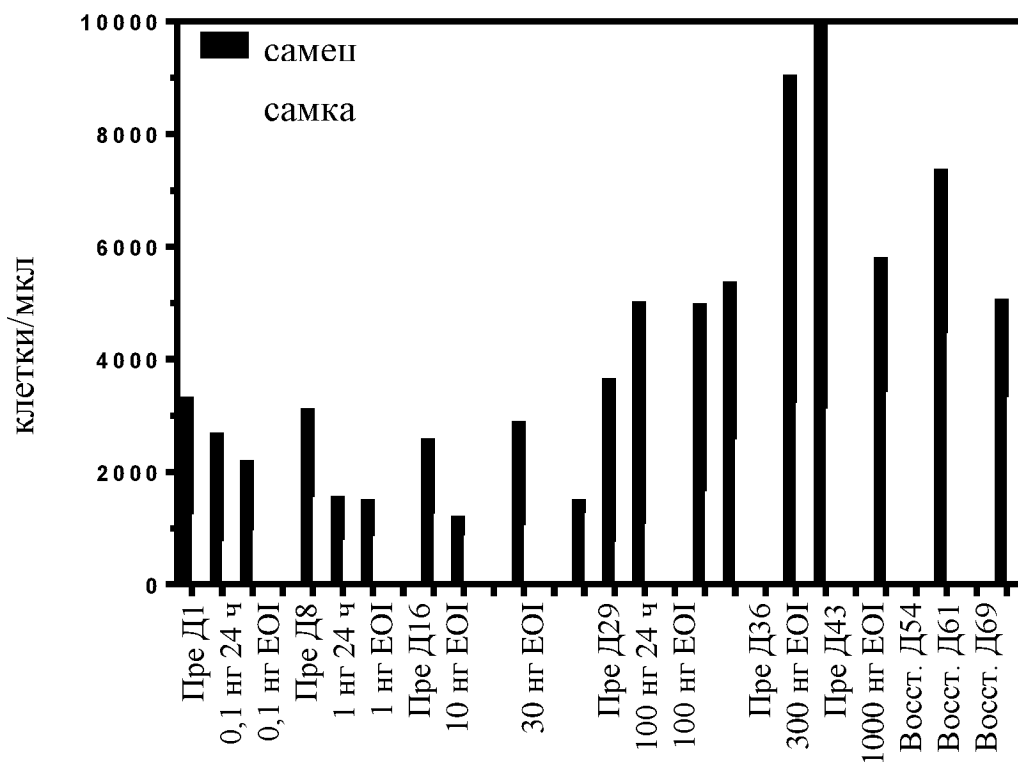
DART-A

10 нг/кг/день



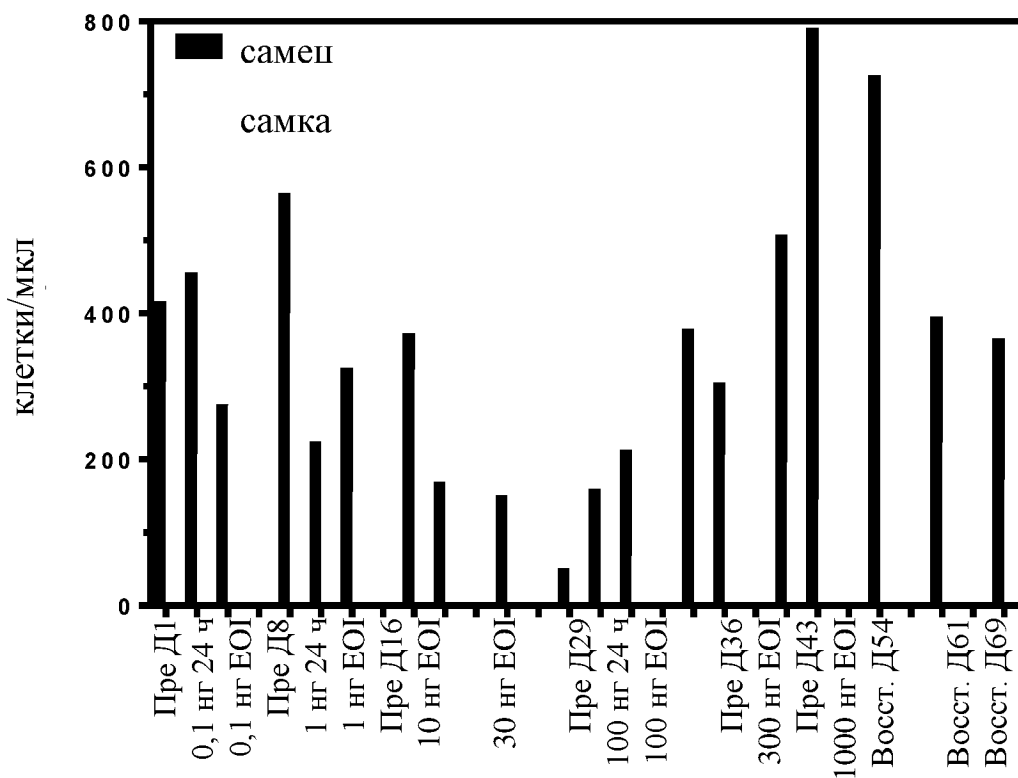
Фигура 20 (продолжение)

В-клетки, CD 20+



А

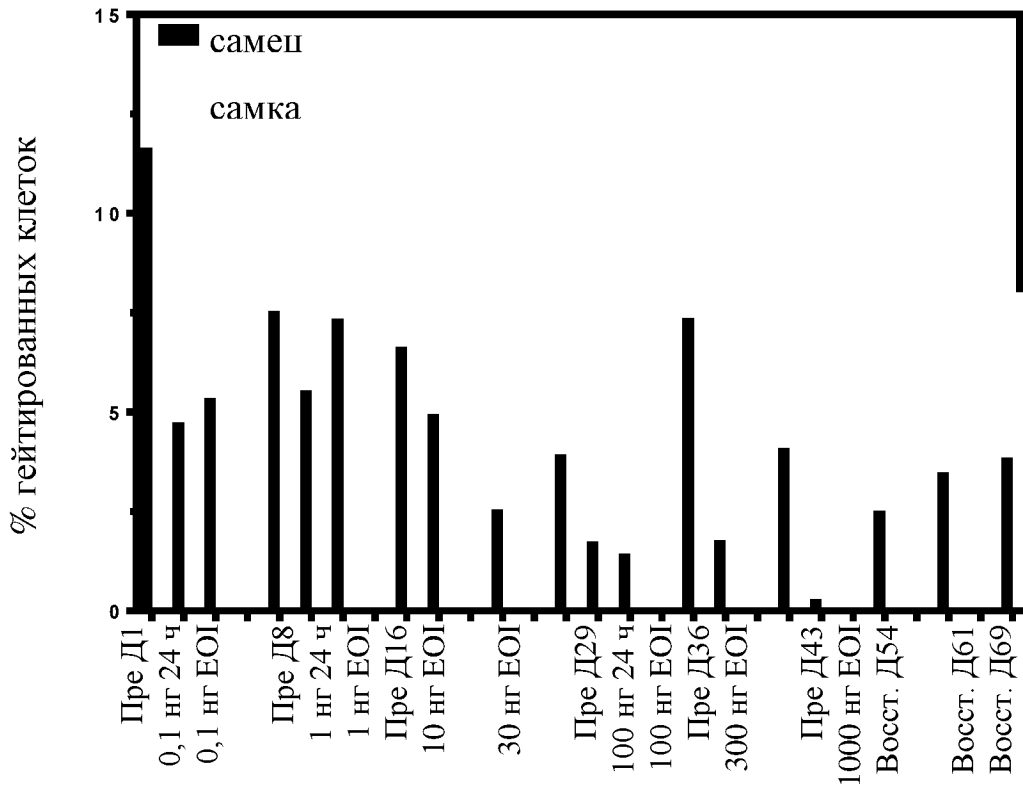
Моноциты, CD 14+



В

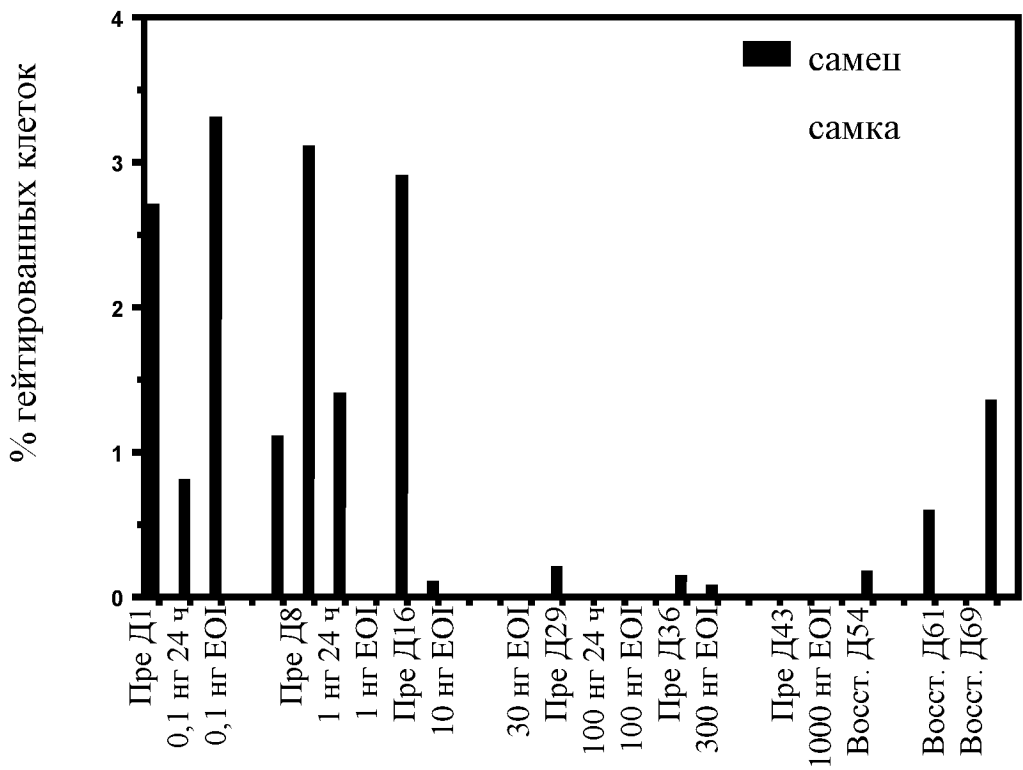
Фигура 21 (панели А-В)

НК-клетки, CD159+CD16+



C

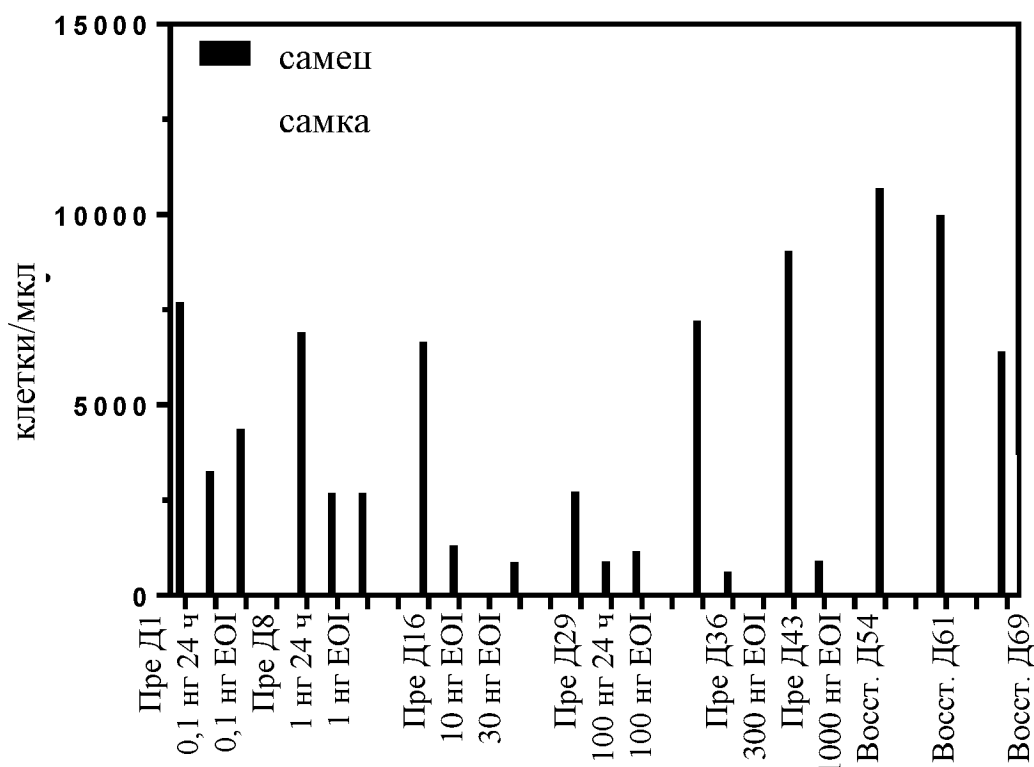
pDC, CD123^{Hi} CD14-



D

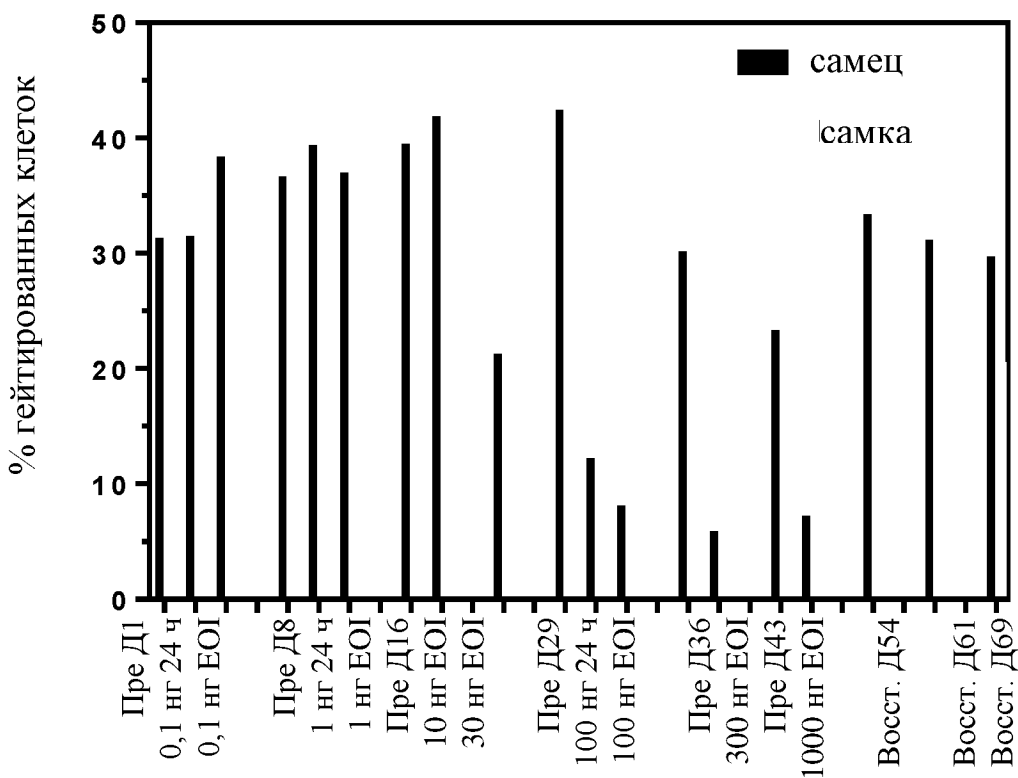
Фигура 21 (панели C-D)

Т-клетки CD4+ CD8+



А

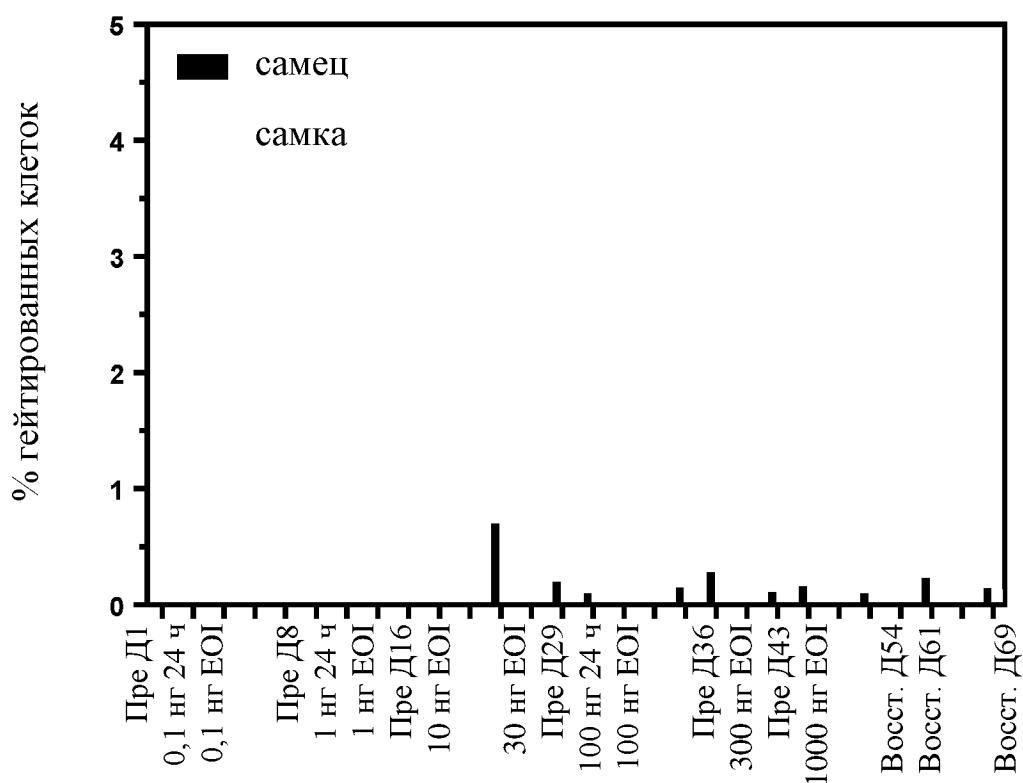
CD4+



В

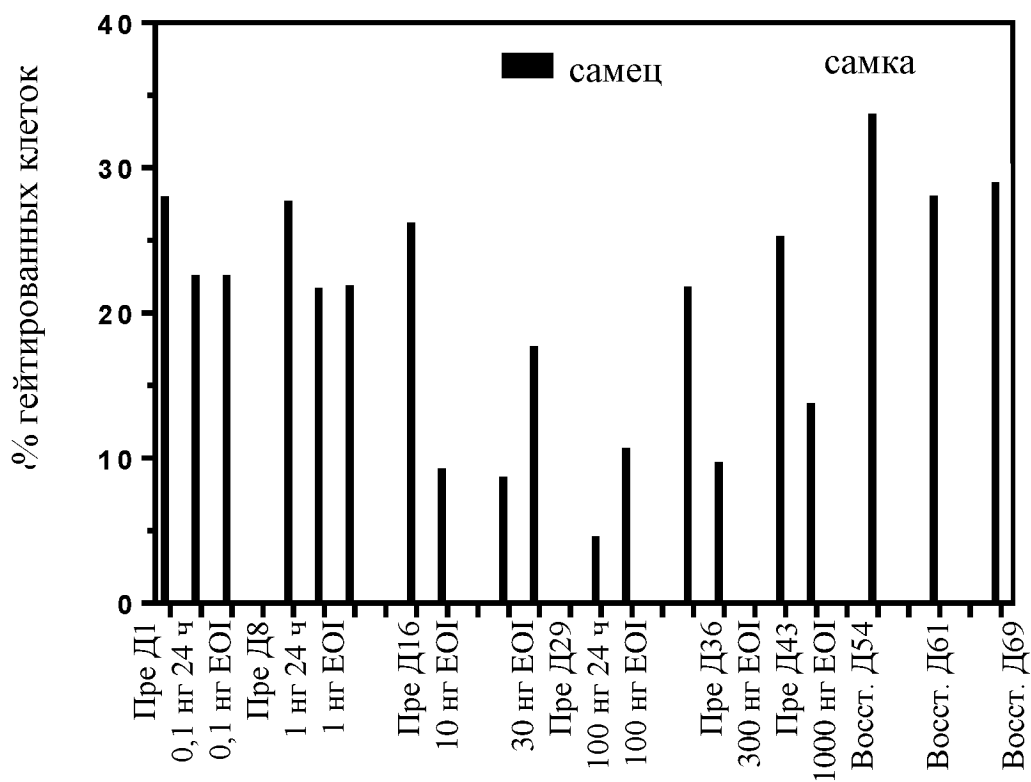
Фигура 22 (панели А-В)

CD69+



C

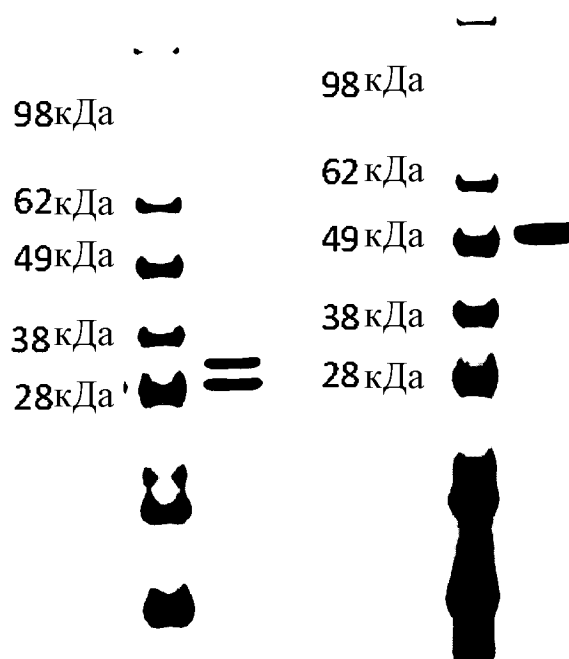
CD8+



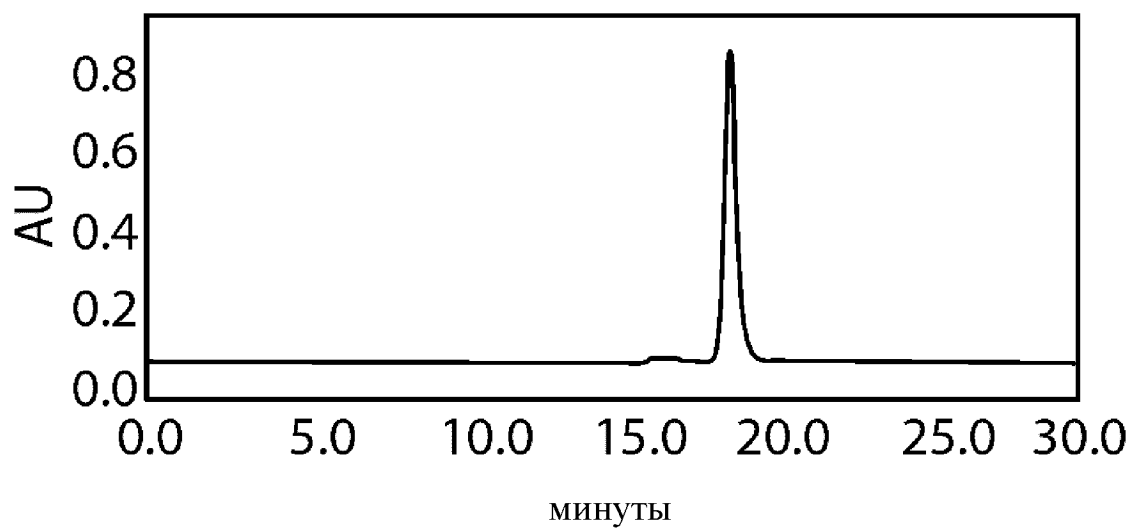
D

Фигура 22 (панели C-D)

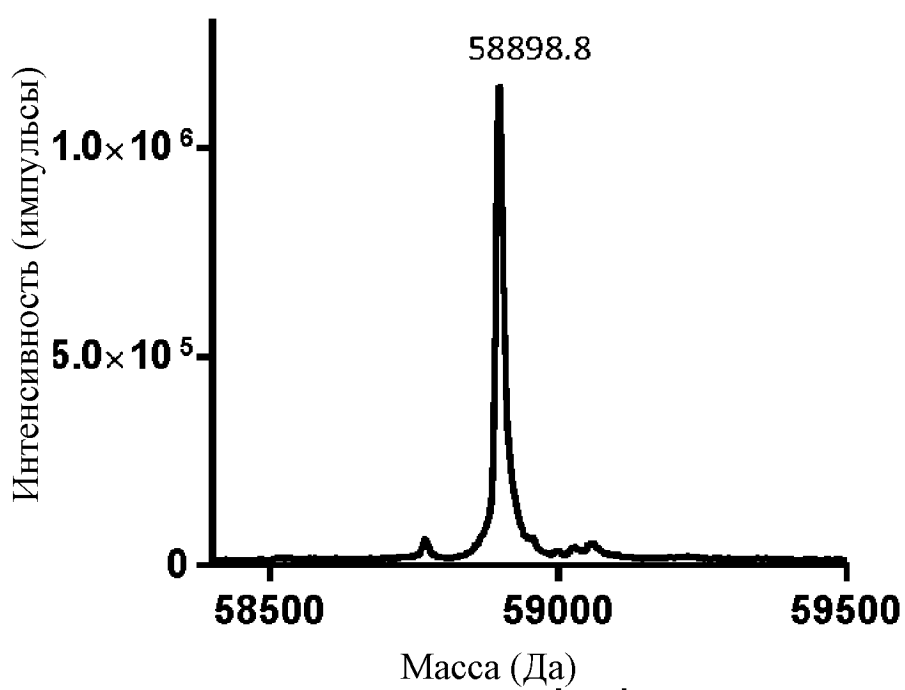
восстановленный невосстановленный



Фигура 23

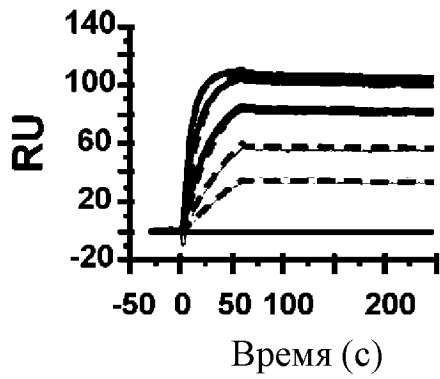


Фигура 24А



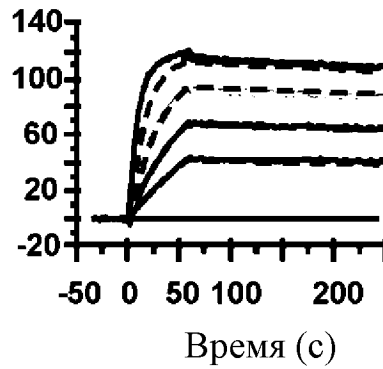
Фигура 24В

CD123 человека



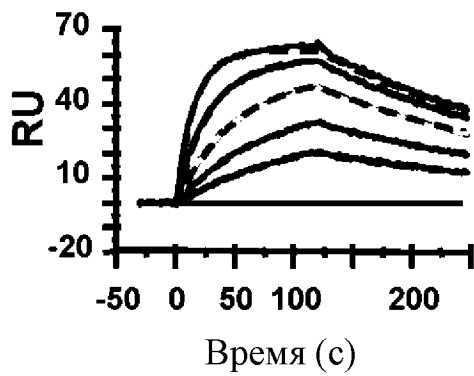
Фигура 25А

CD123 яванского макака



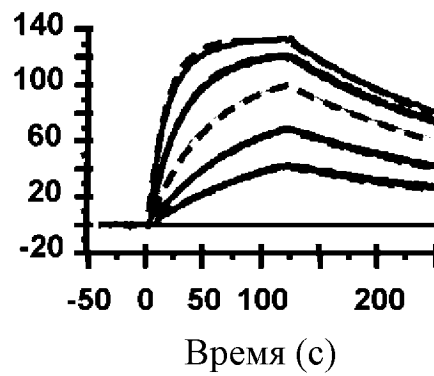
Фигура 25В

CDε/δ человека



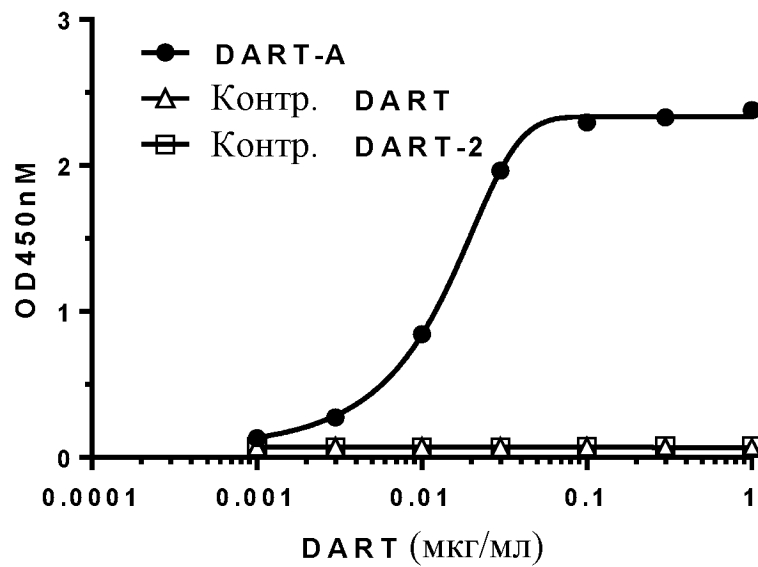
Фигура 25С

CDε/δ яванского макака



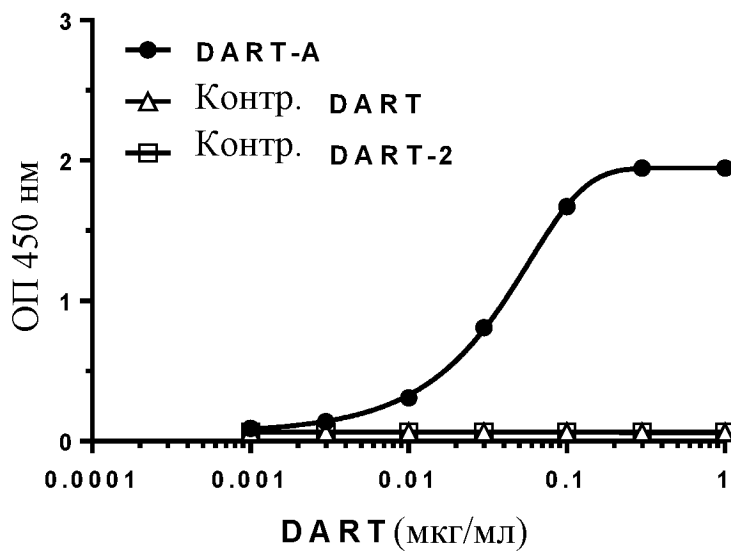
Фигура 25D

Захват: CD123 человека
Обнаружение: CD3 человека

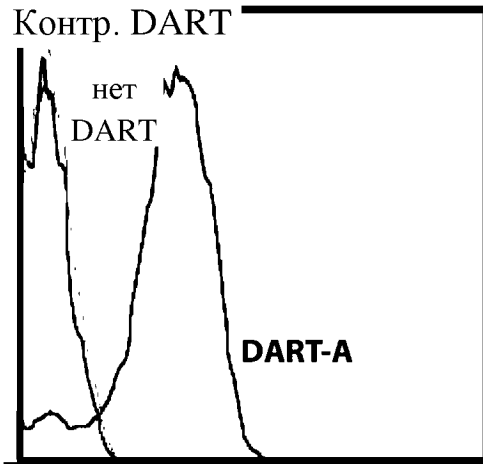


Фигура 26А

Захват: CD123 яванского макака
Обнаружение: CD3 человека



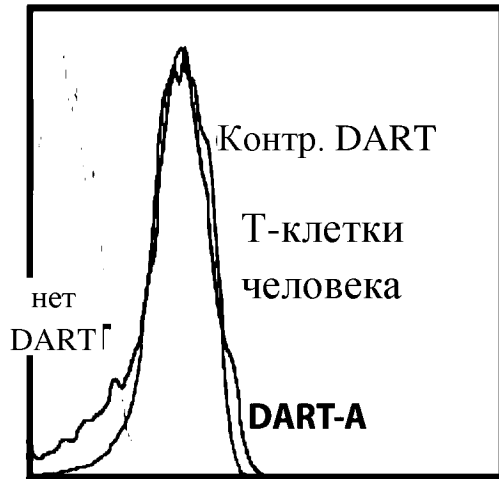
Фигура 26В



Molm-13

Фигура 26С

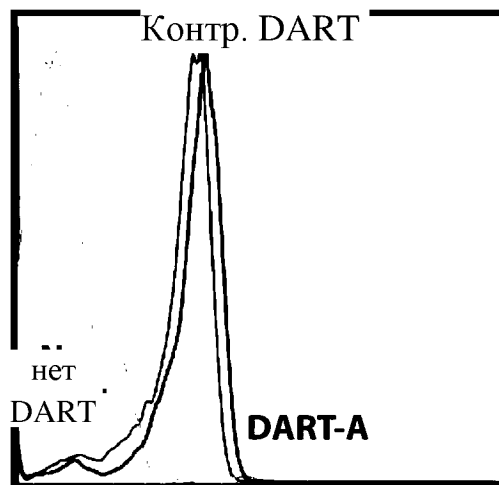
α -ЕК



Т-клетки человека

Фигура 26В

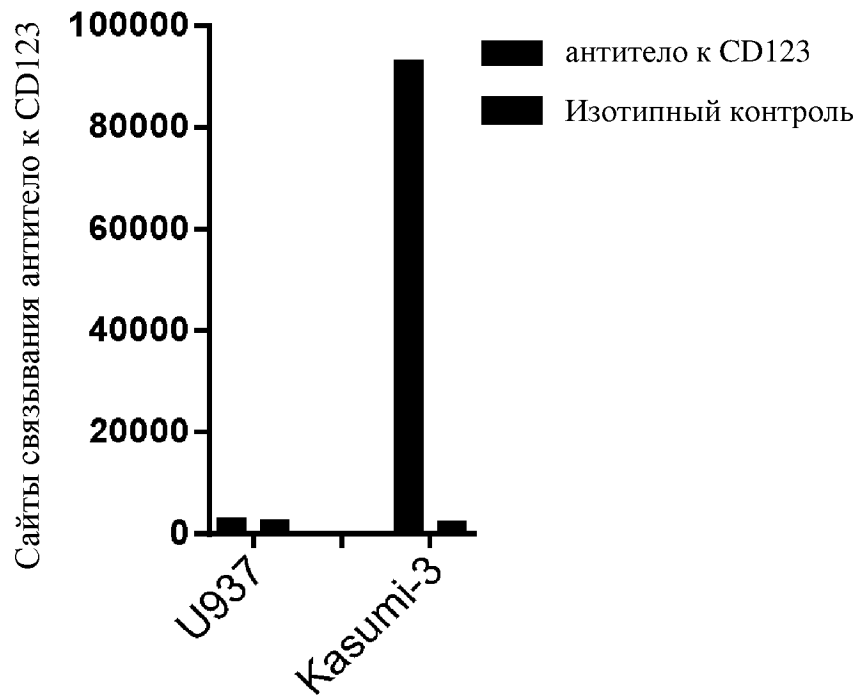
α -ЕК



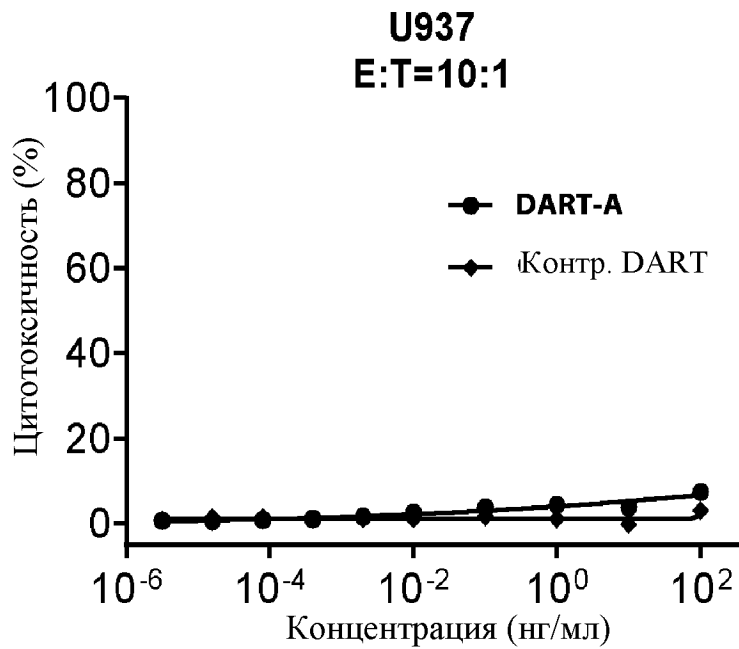
Т-клетки яванского
макака

Фигура 26Е

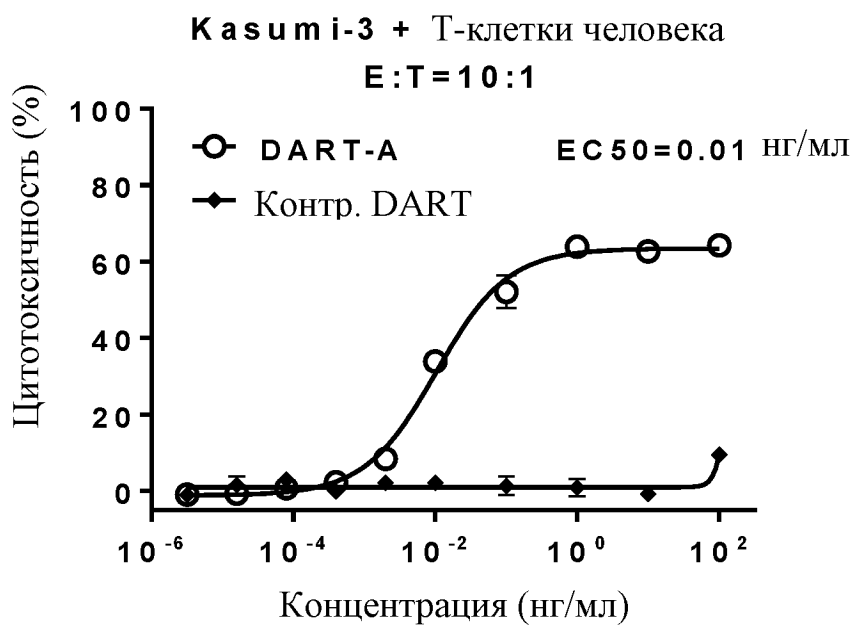
α -ЕК



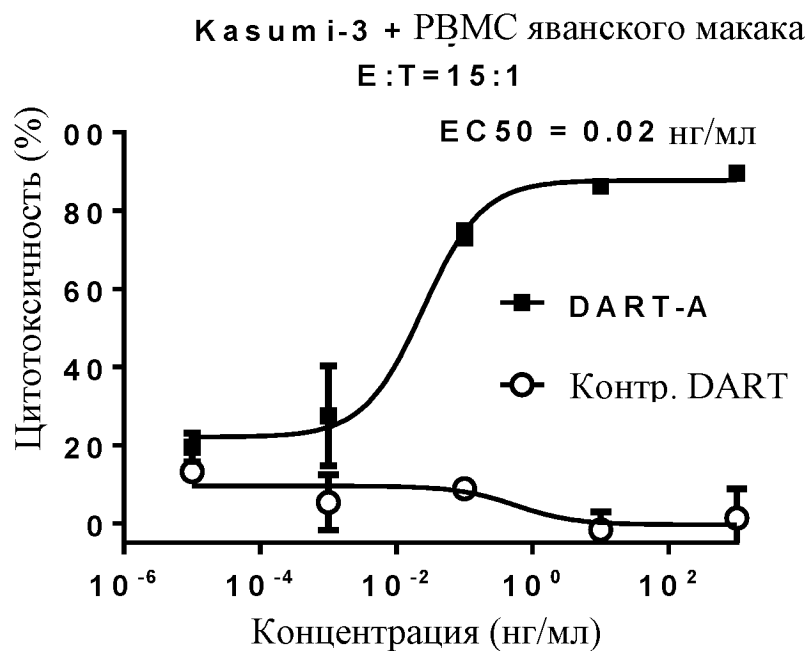
Фигура 27А



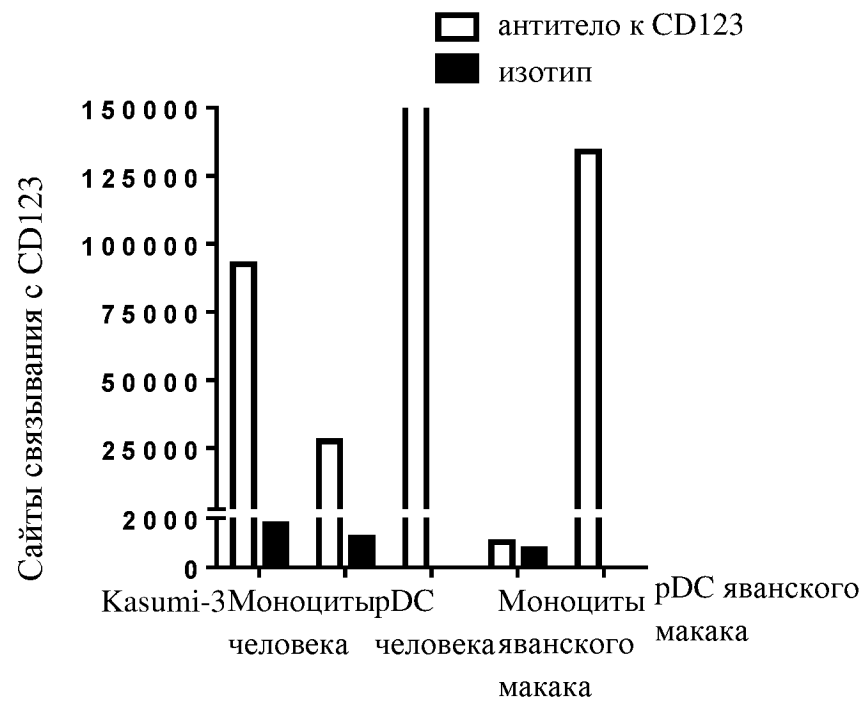
Фигура 27В



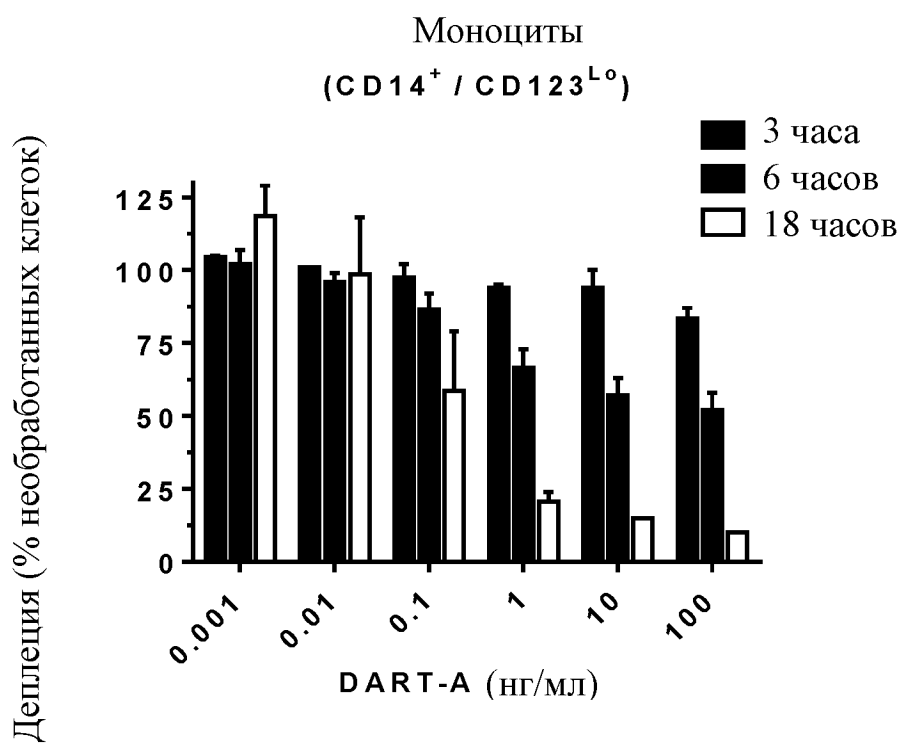
Фигура 27С



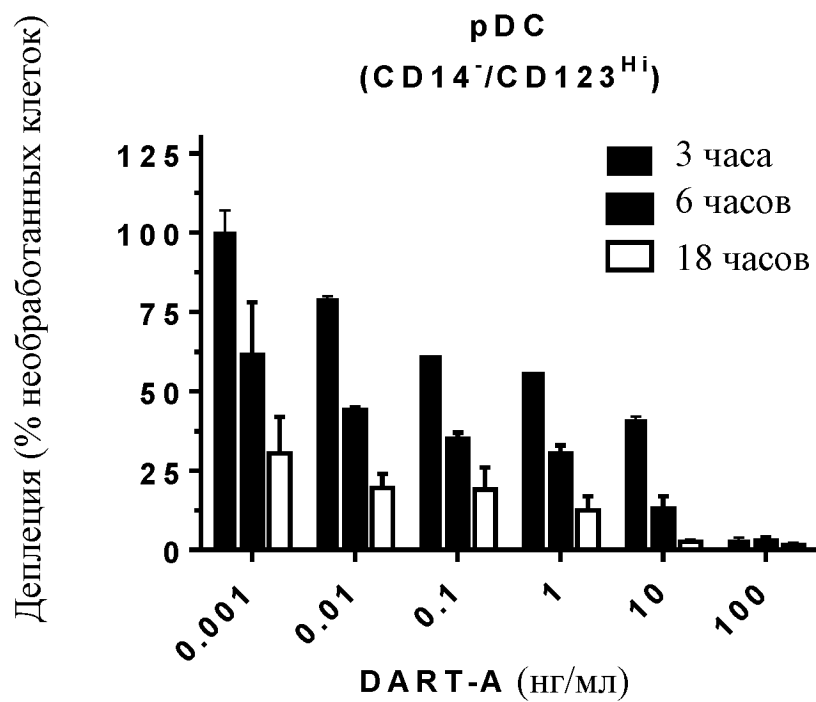
Фигура 27D



Фигура 27Е

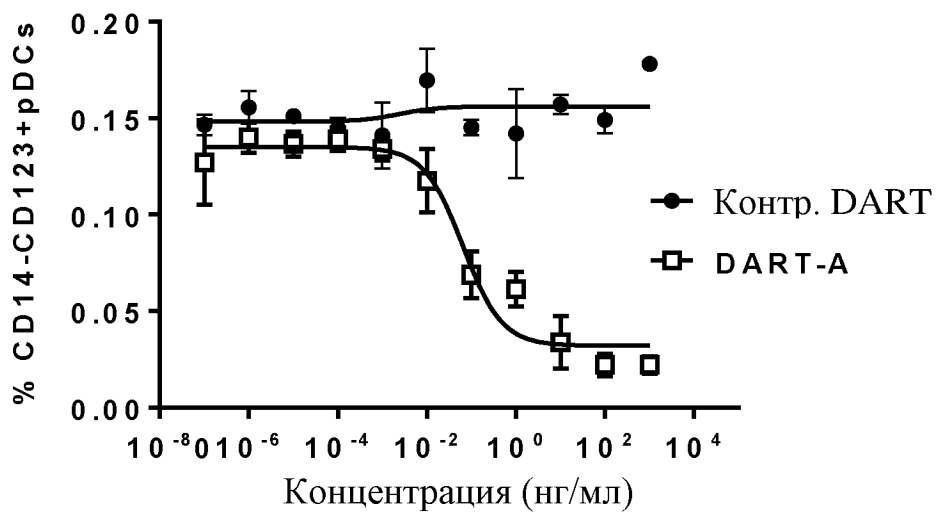


Фигура 27F

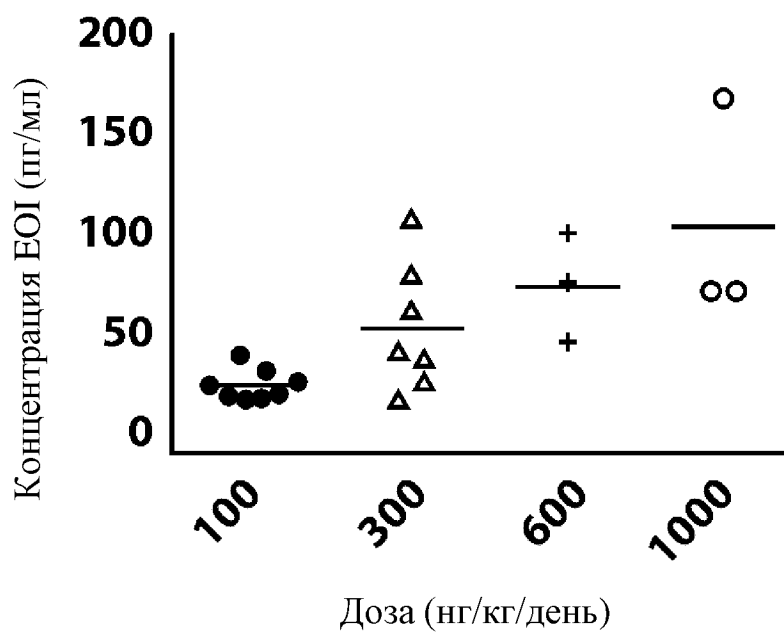


Фигура 27G

РВМС яванского макака отдельно
(FACS)

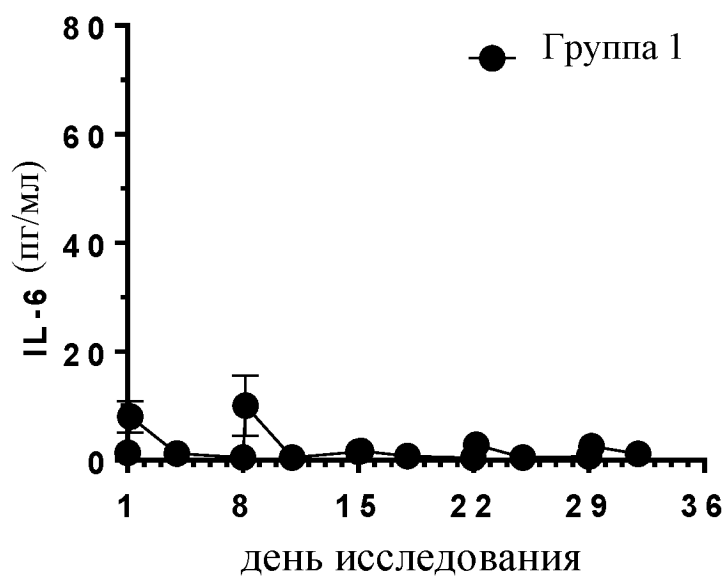


Фигура 27Н



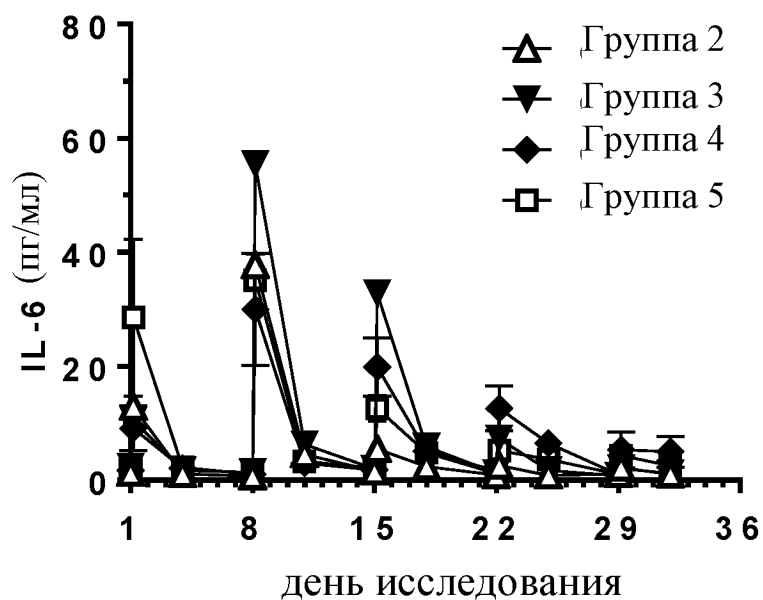
Фигура 28

Инертный носитель



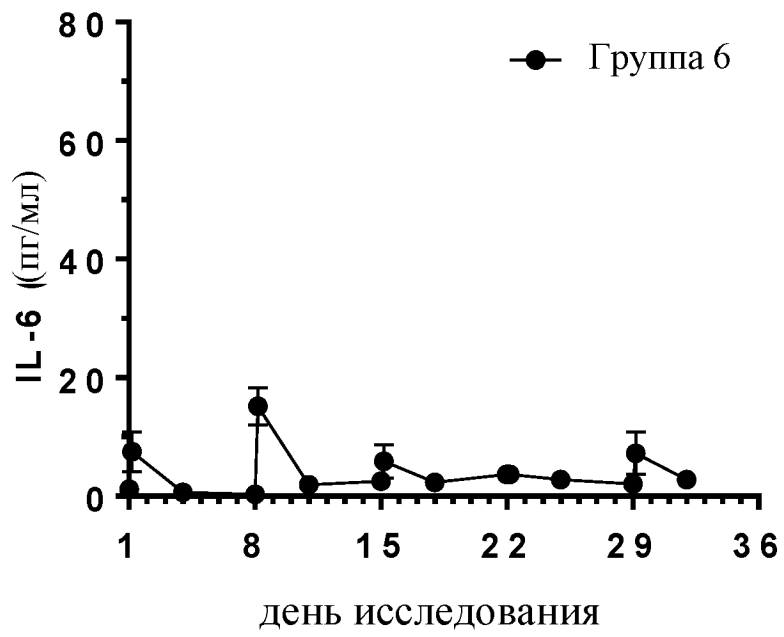
Фигура 29А

DART-A



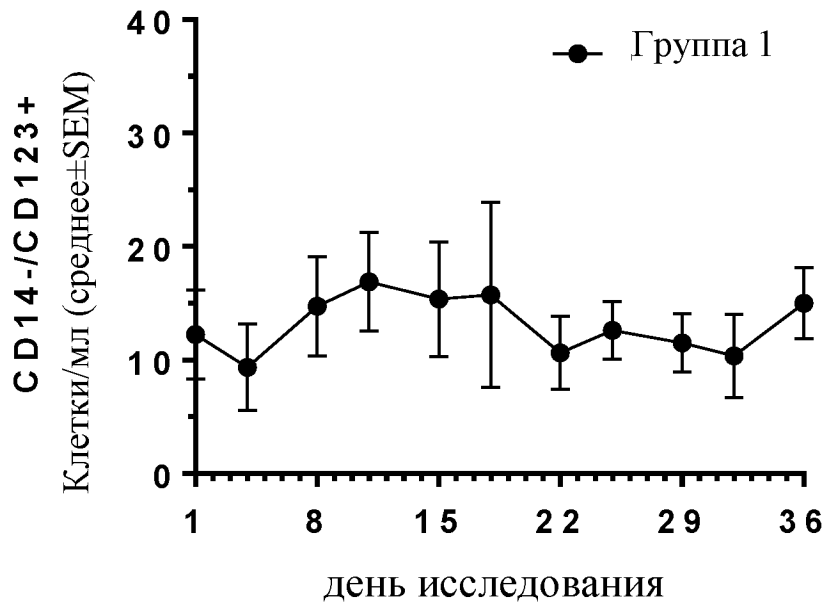
Фигура 29В

DART-A



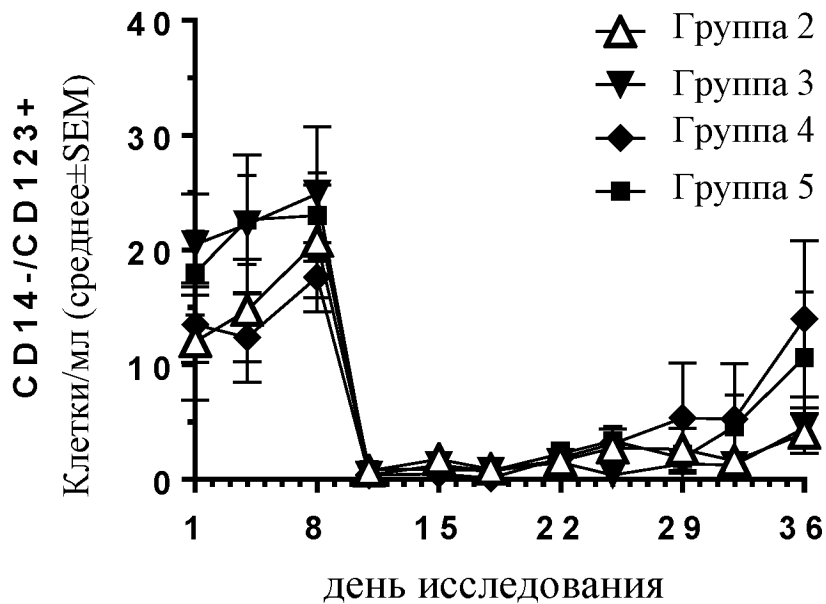
Фигура 29С

Инертный носитель

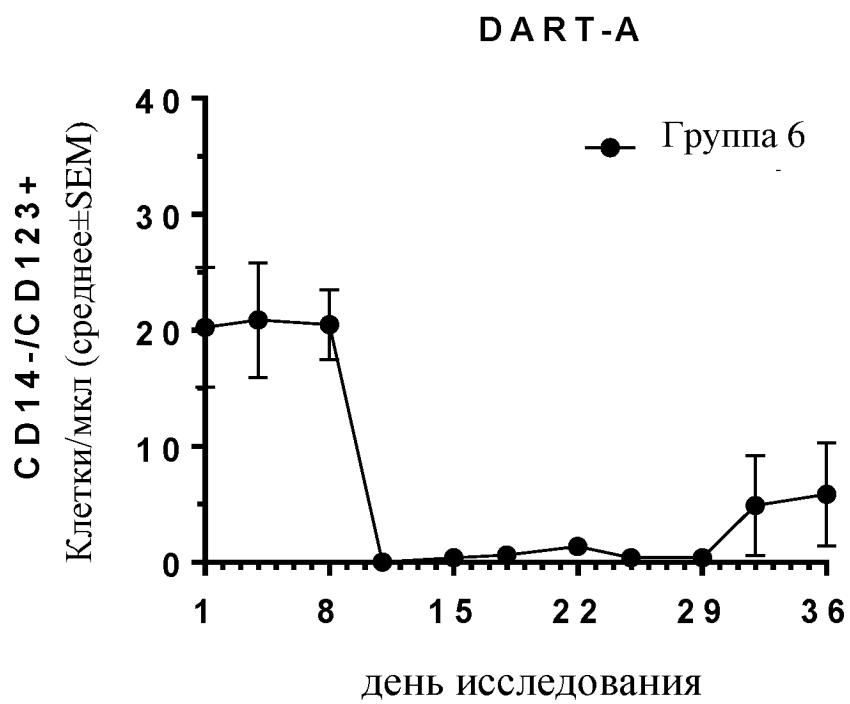


Фигура 30А

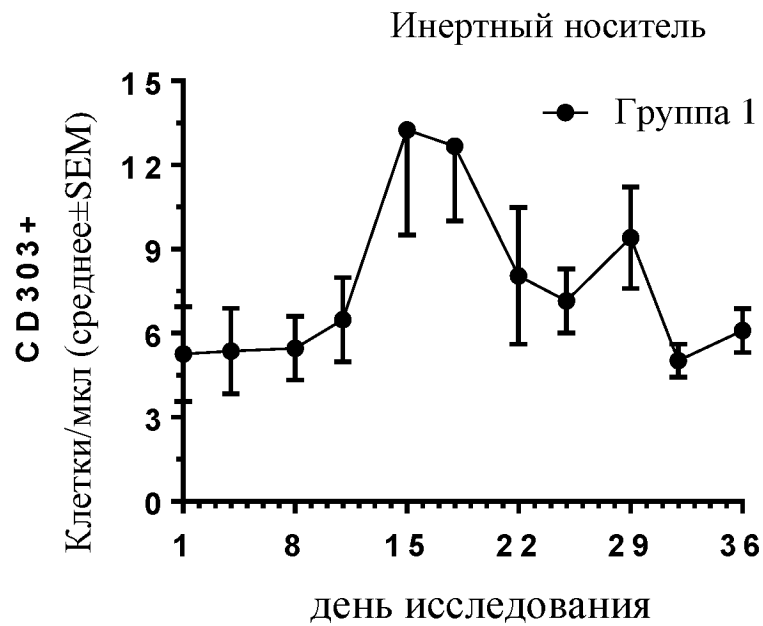
DART-A



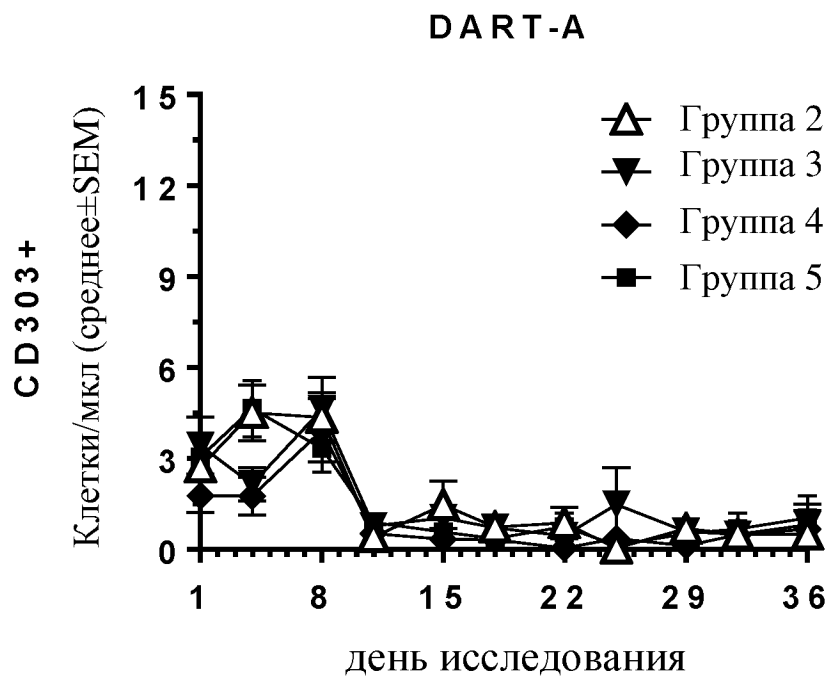
Фигура 30В



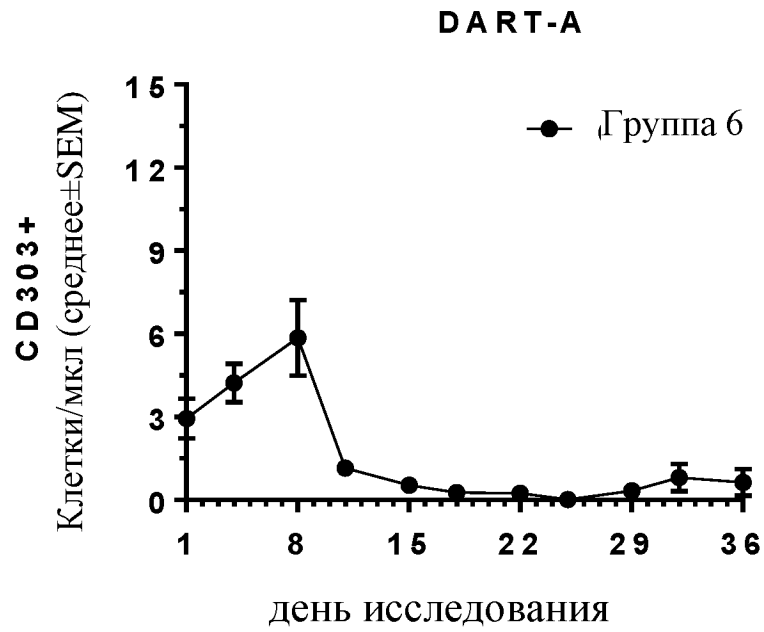
Фигура 30С



Фигура 30D

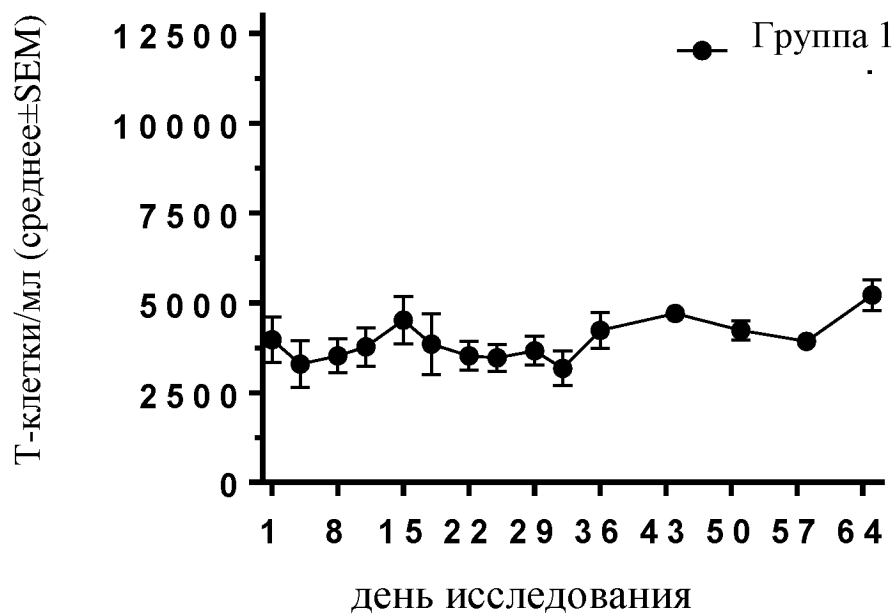


Фигура 30E

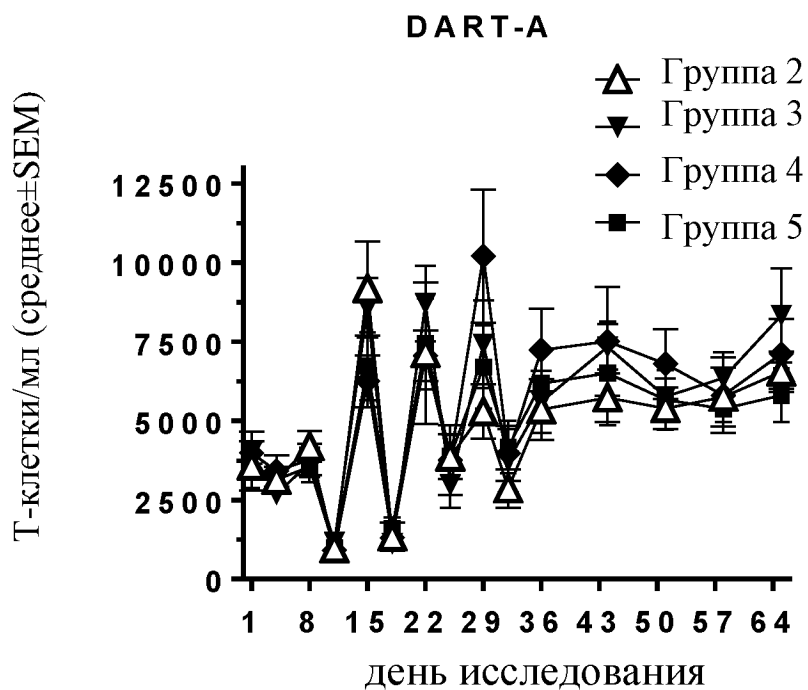


Фигура 30F

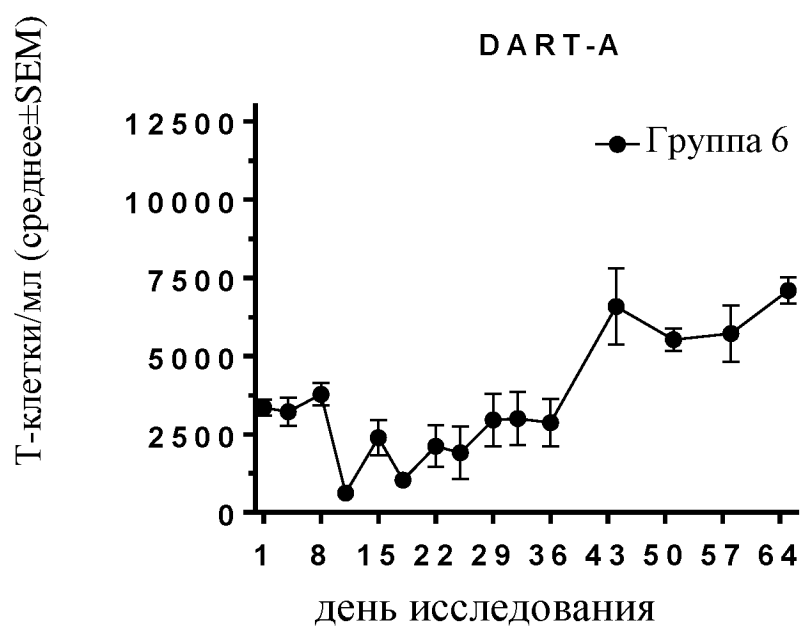
Инертный носитель



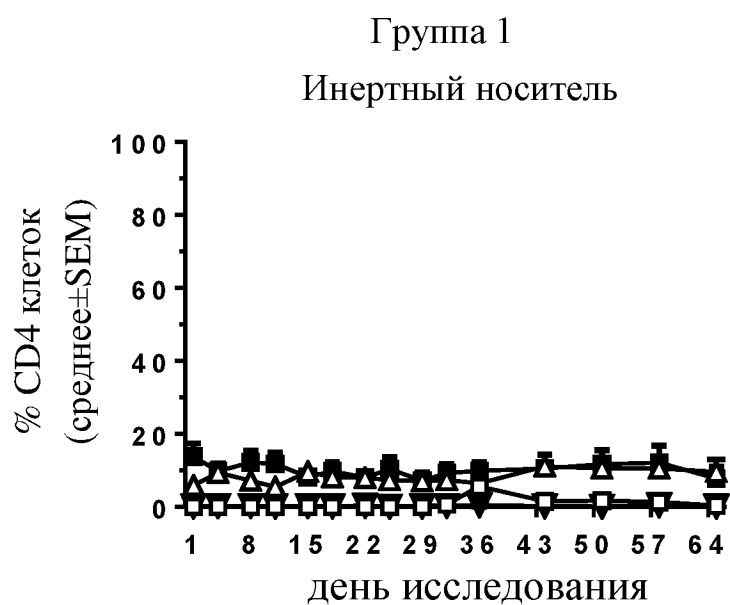
Фигура 31А



Фигура 31В



Фигура 31С

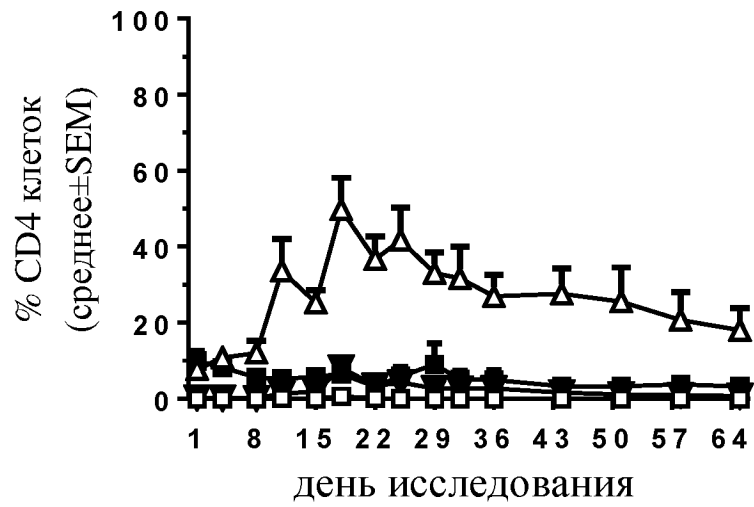


Фигура 31D

50/66

Группа 5

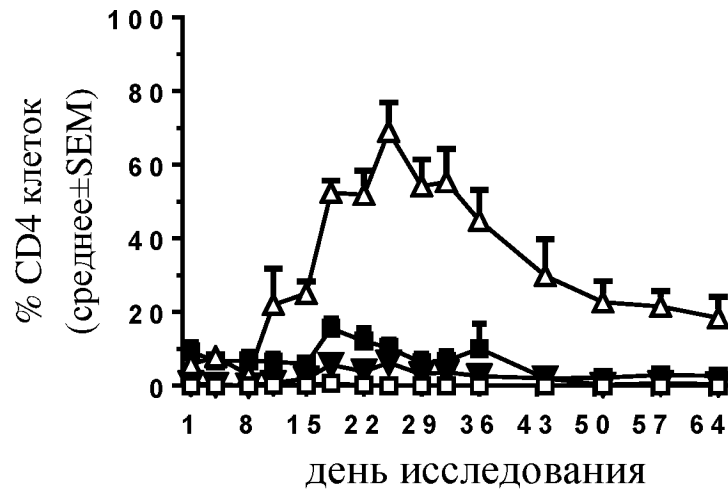
DART-A



Фигура 31E

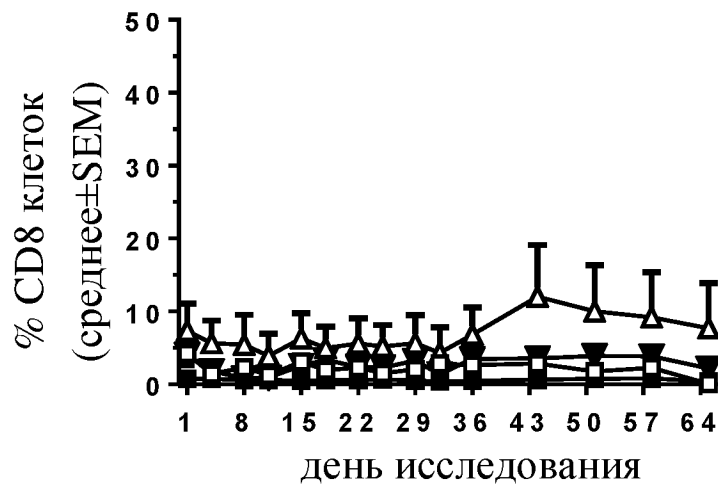
Группа 6

DART-A



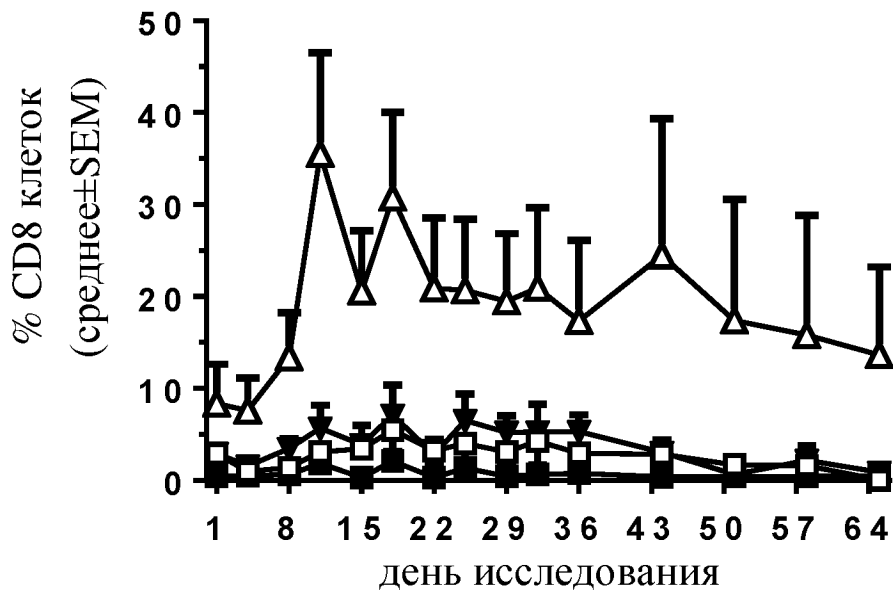
Фигура 31F

Группа 1
Инертный носитель



Фигура 31G

Группа 5
DART-A

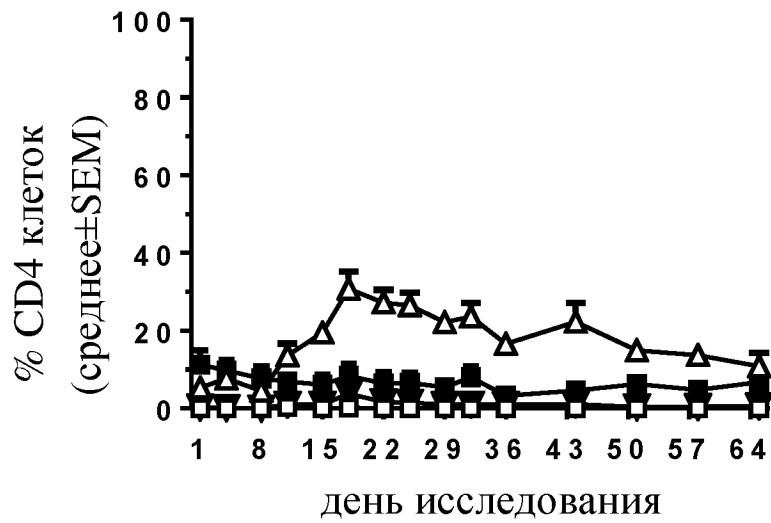


Фигура 31H

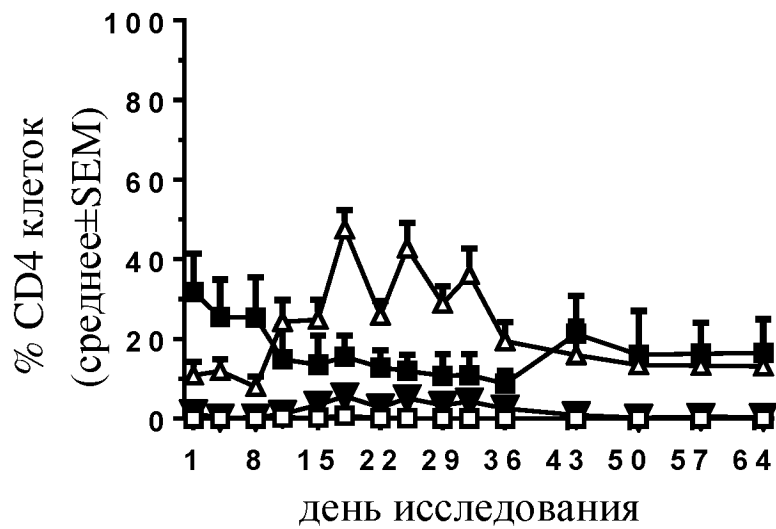
Группа 6
DART-A



Фигура 31I

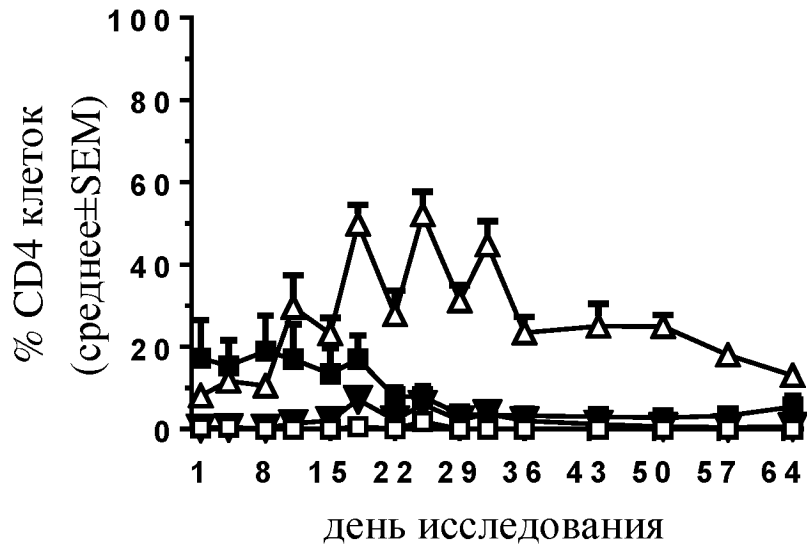
DART-A
Группа 2

Фигура 32А

DART-A
Группа 3

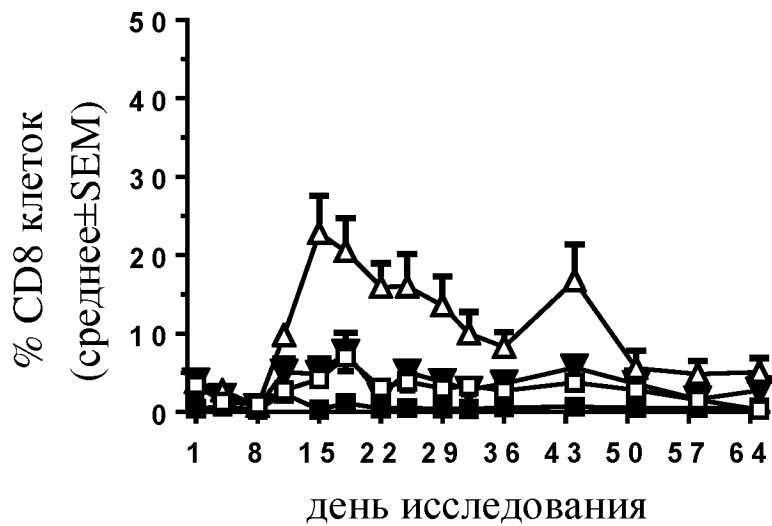
Фигура 32В

DART-A
Группа 4

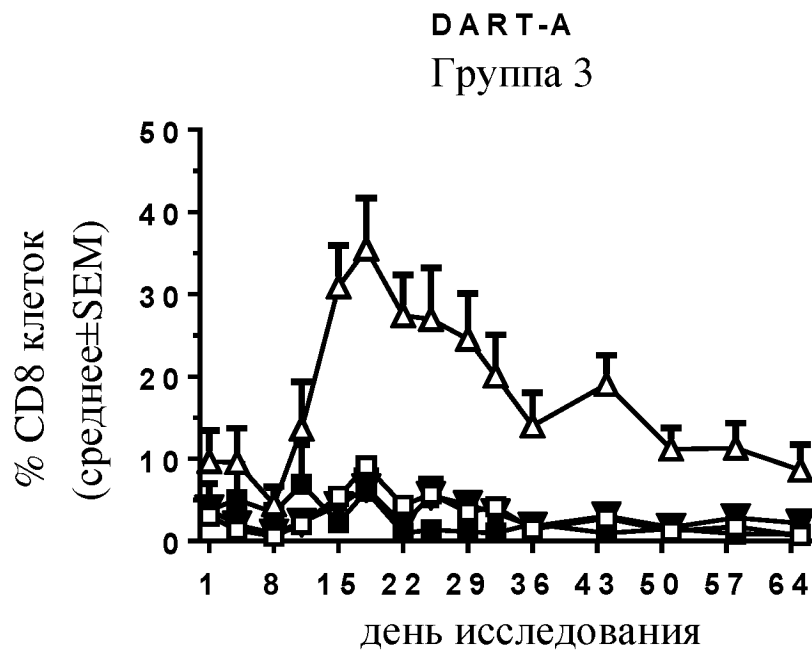


Фигура 32С

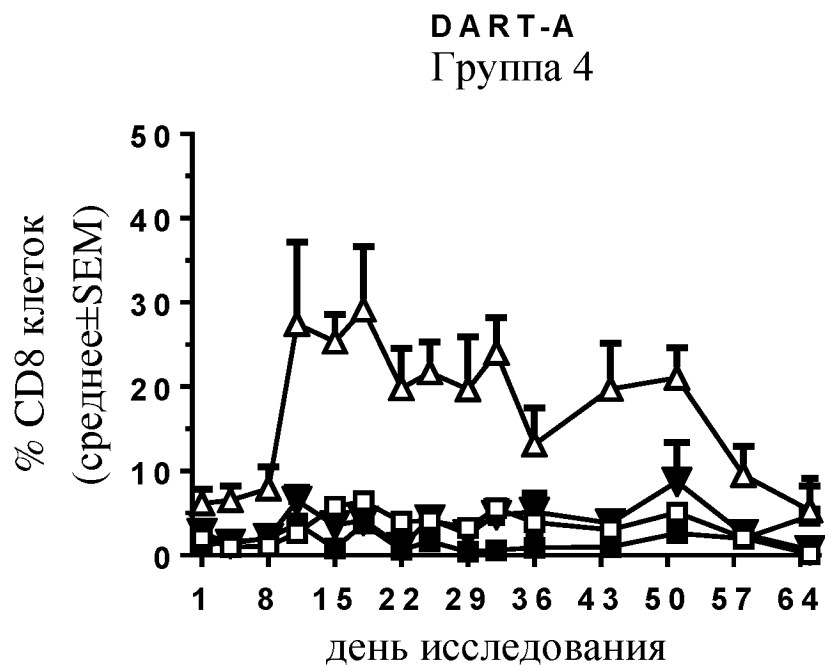
DART-A
Группа 2



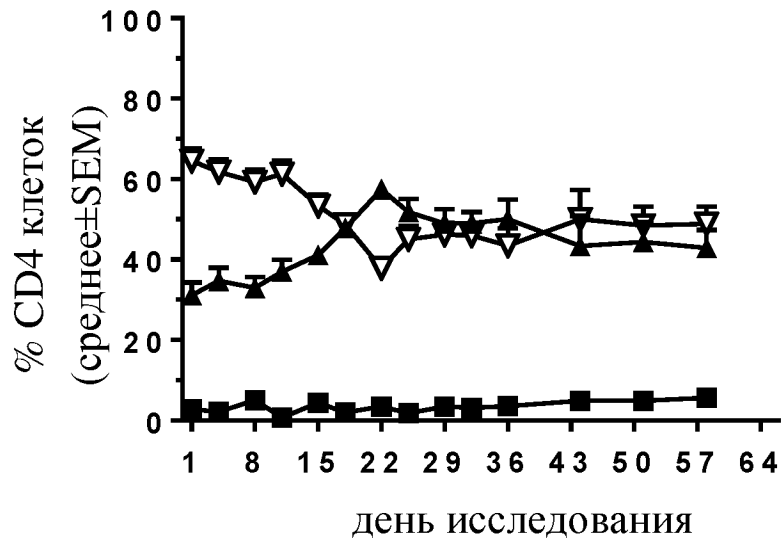
Фигура 32D



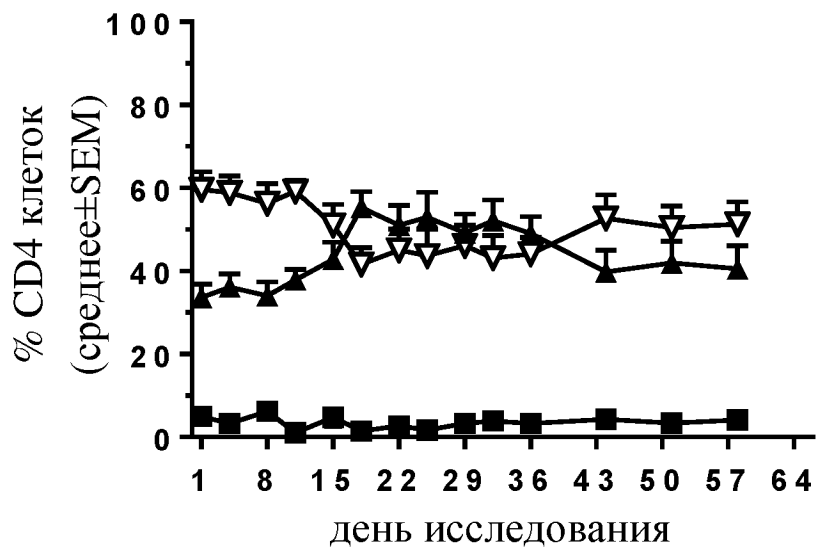
Фигура 32E



Фигура 32F

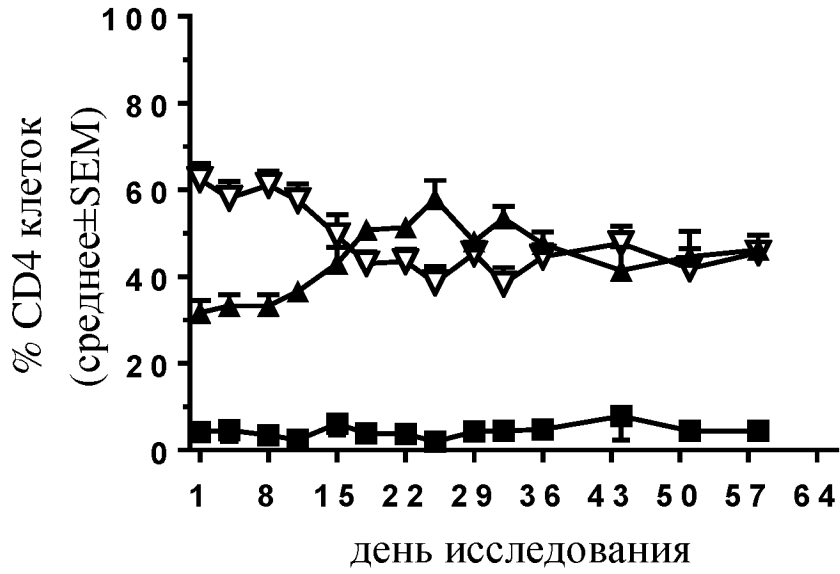
DART-A
Группа 2

Фигура 33А

DART-A
Группа 3

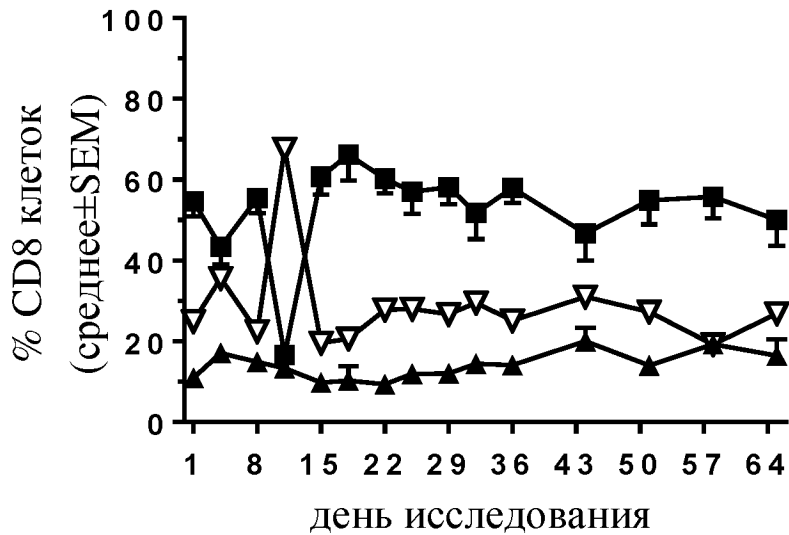
Фигура 33В

DART-A
Группа 4



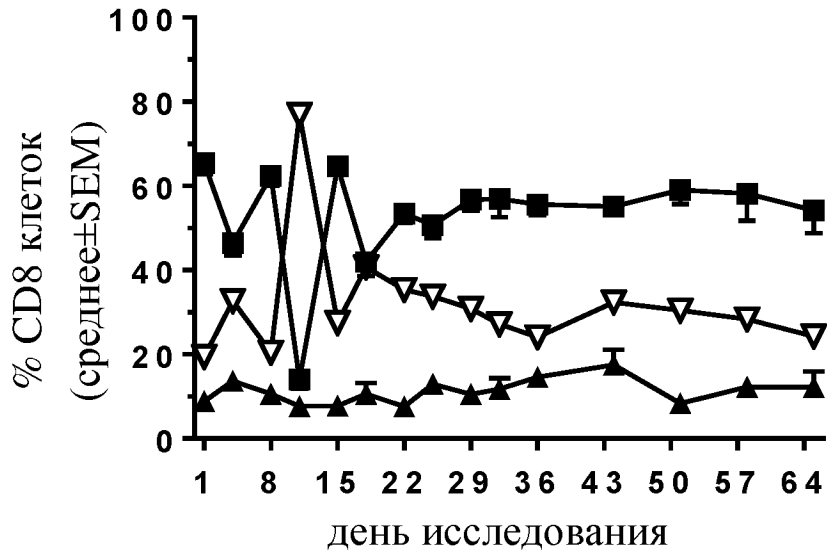
Фигура 33С

DART-A
Группа 2



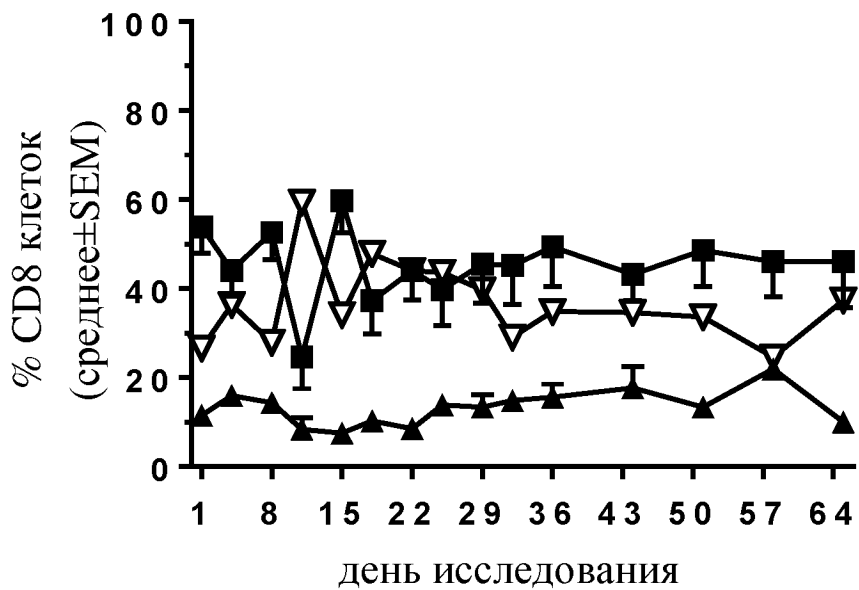
Фигура 33D

DART-A
Группа 3

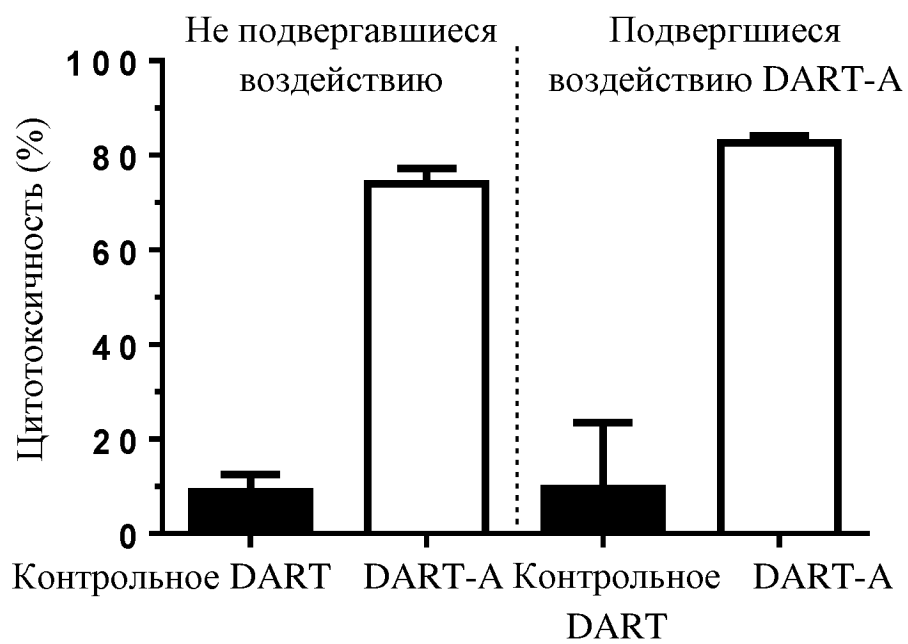


Фигура 33Е

DART-A
Группа 4

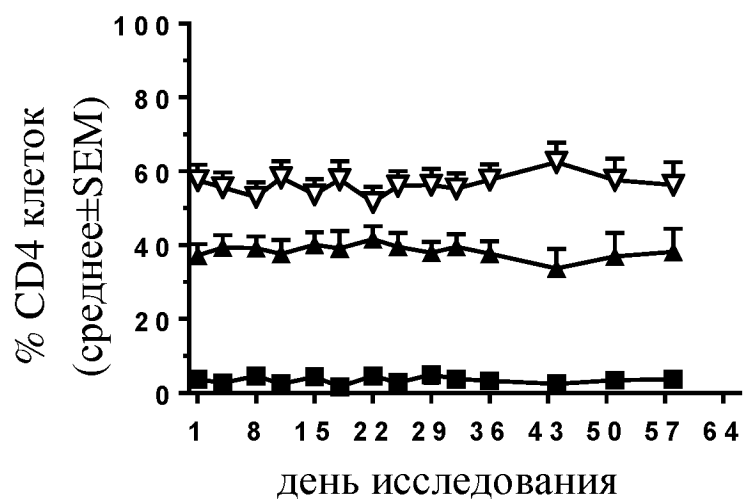


Фигура 33Ф



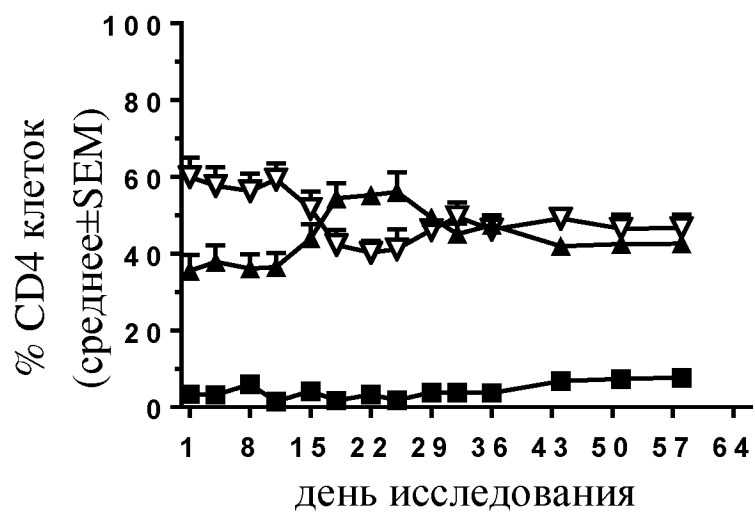
Фигура 34

Группа 1
Инертный носитель



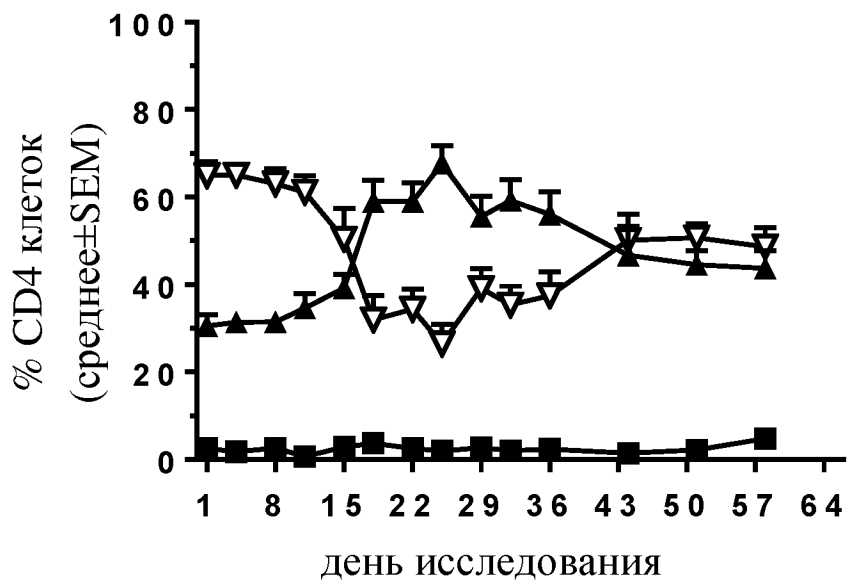
Фигура 35А

DART-A
Группа 5



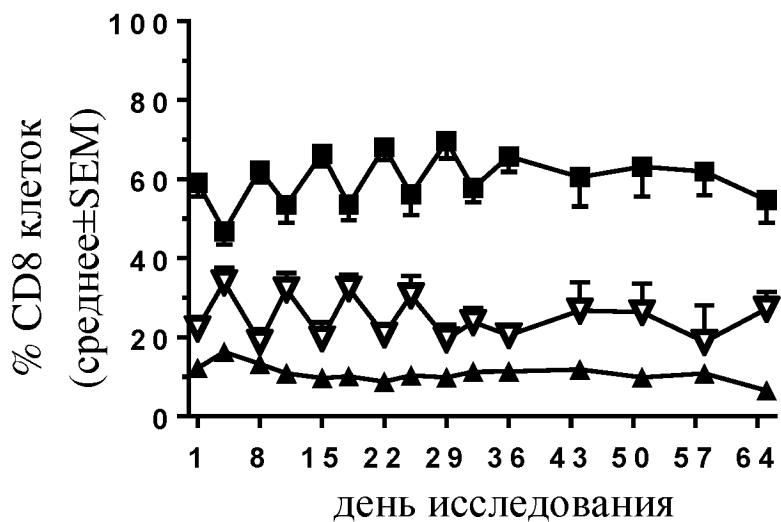
Фигура 35В

DART-A
Группа 6

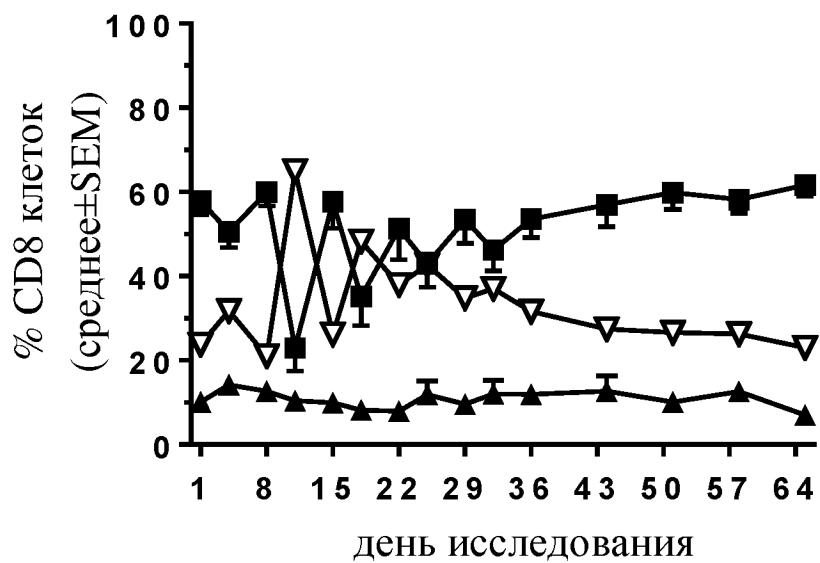


Фигура 35C

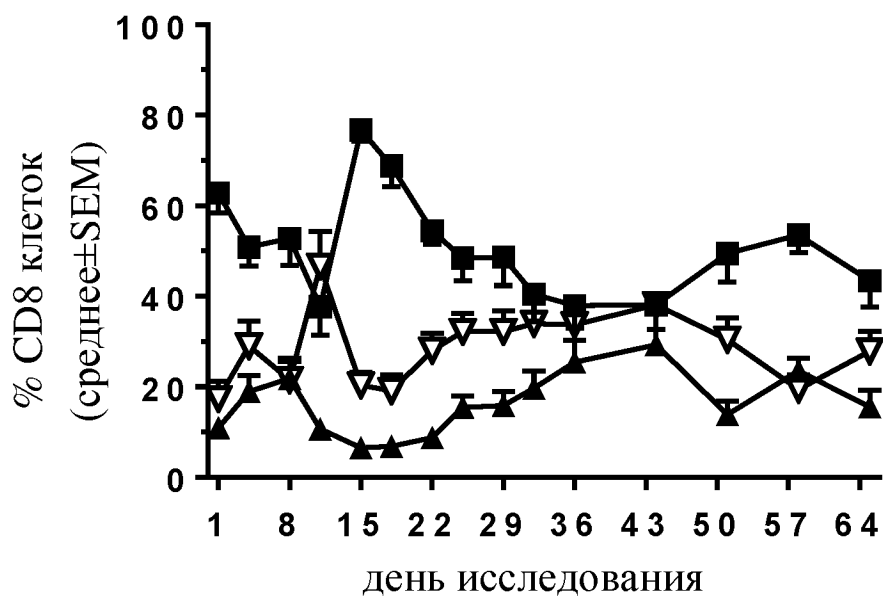
Группа 1
Инертный носитель



Фигура 35D

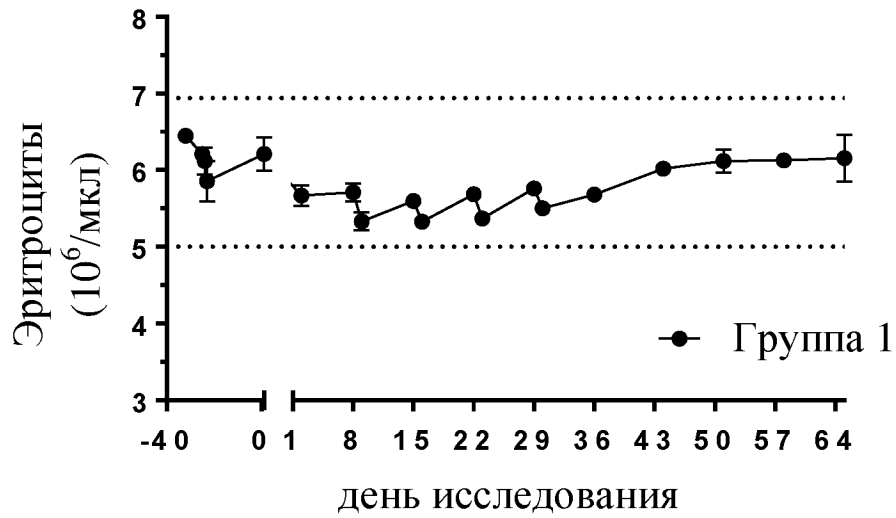
DART-A
Группа 5

Фигура 35E

DART-A
Группа 6

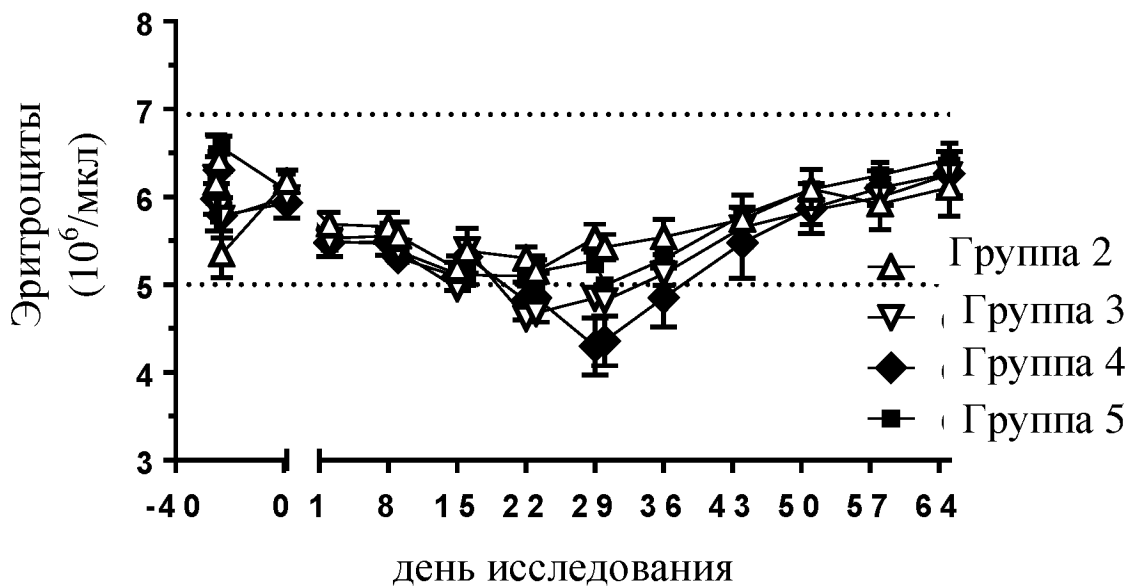
Фигура 35F

Инертный носитель

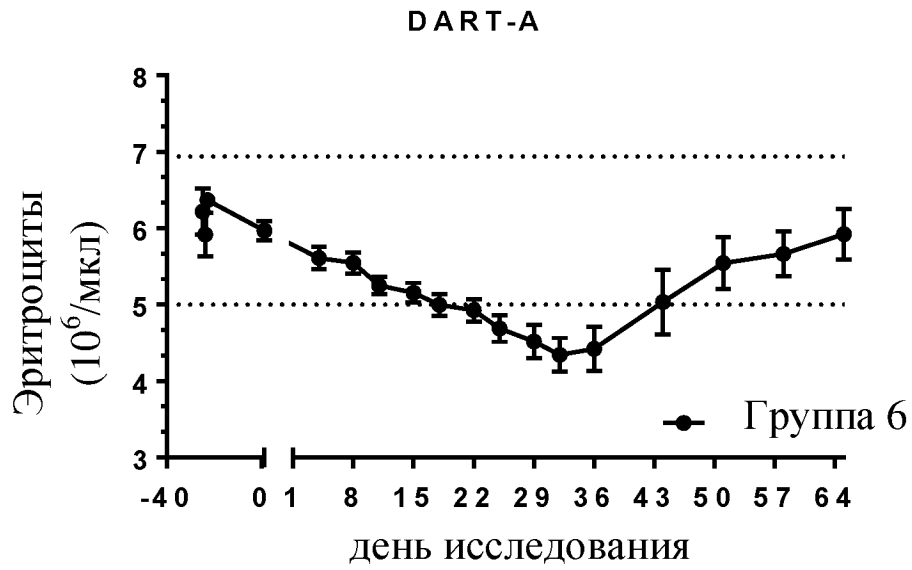


Фигура 36А

DART-A



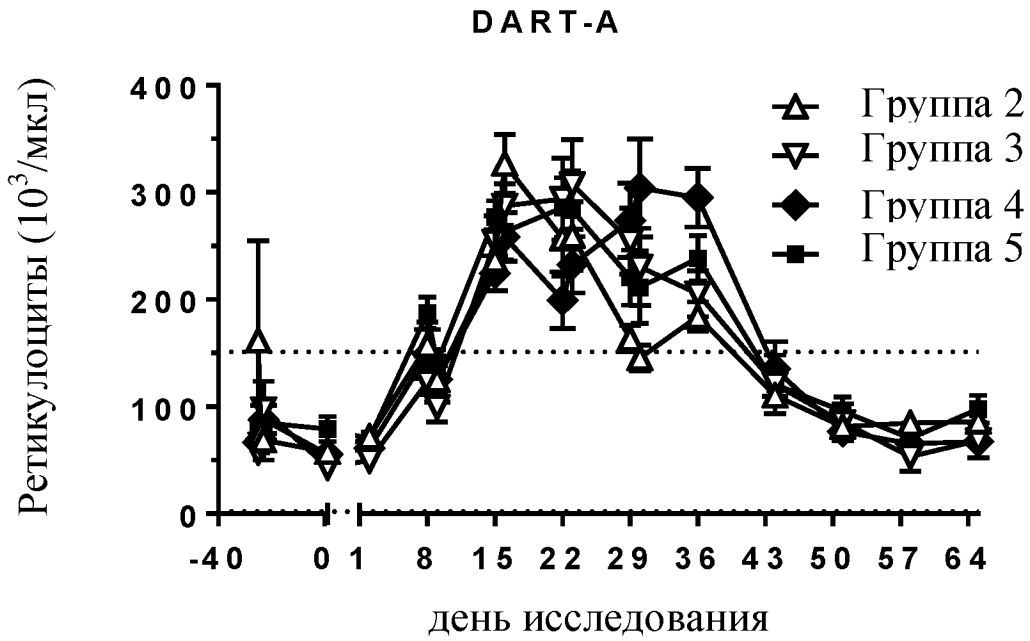
Фигура 36В



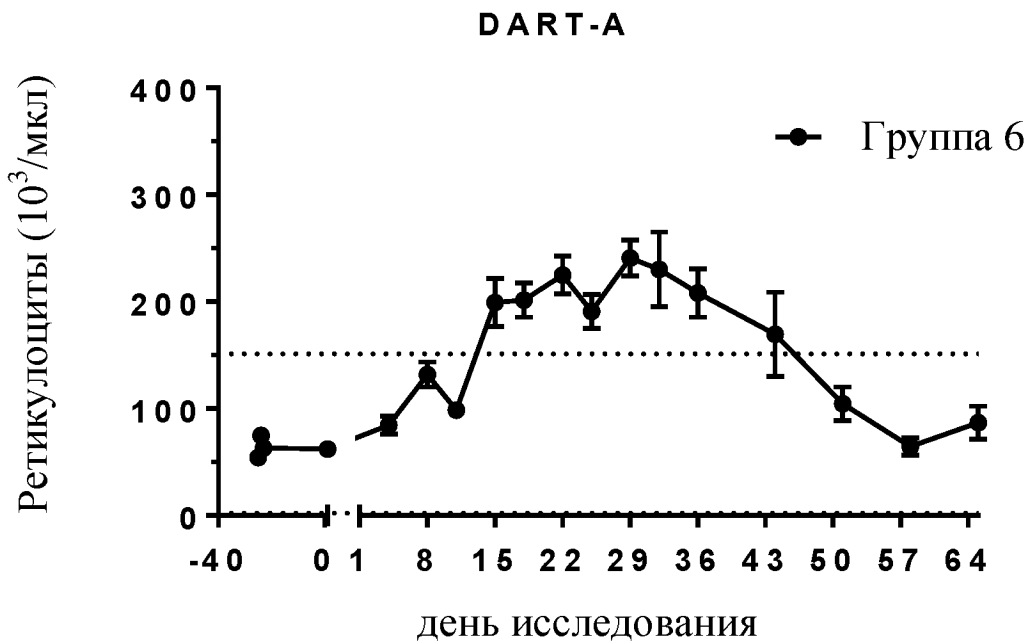
Фигура 36С



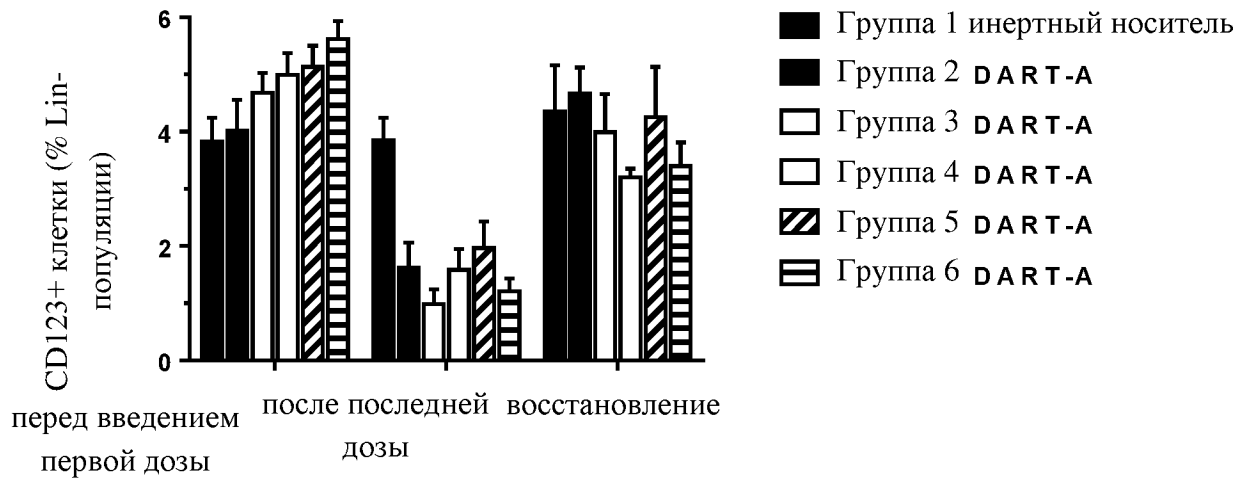
Фигура 36D



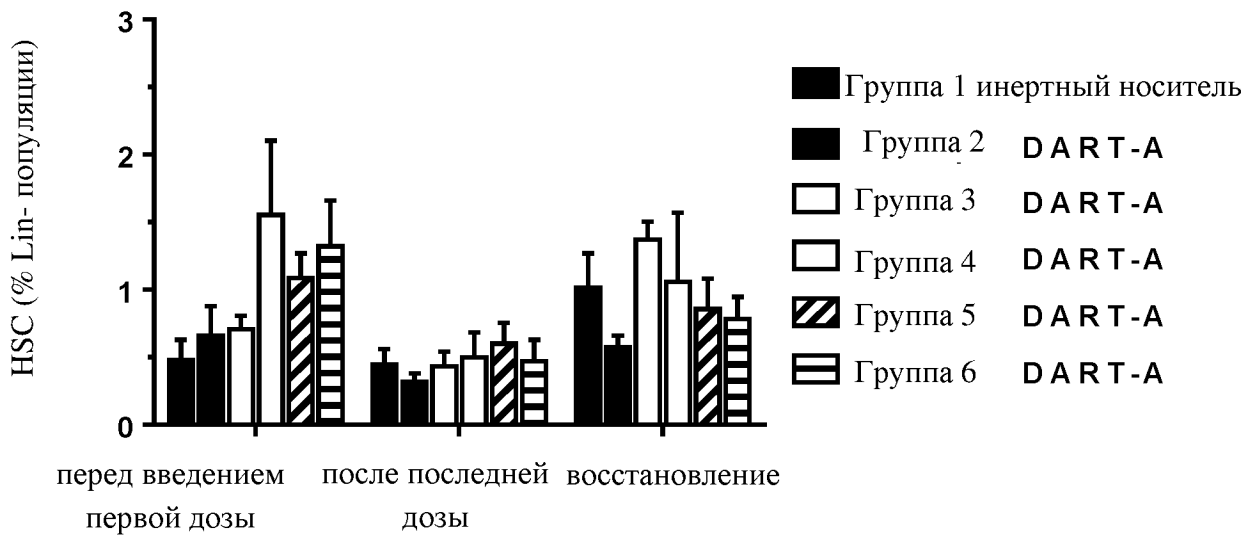
Фигура 36Е



Фигура 36F



Фигура 37А



Фигура 37В