

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047733**(13) **B9**

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

- (15) Информация об исправлении
**Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле**
- (48) Дата публикации исправления
2024.10.04, Бюллетень №10'2024
- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.02
- (21) Номер заявки
201990773
- (22) Дата подачи заявки
2017.09.21
- (51) Int. Cl. **A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)**

(54) CD123-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ОТНОСЯЩИЕСЯ К НИМ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

- (31) **62/397,736; 62/466,192**
- (32) **2016.09.21; 2017.03.02**
- (33) **US**
- (43) **2019.08.30**
- (86) **PCT/US2017/052808**
- (87) **WO 2018/057802 2018.03.29**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АПТЕВО РИСЕРЧ ЭНД
ДИВЕЛОПМЕНТ ЛЛК (US)**
- (72) Изобретатель:
**Эрнандес-Ойос Габриэла, Сьюэзл
Элейн Т., Макмахан Кетрин Дж.,
Бьенвеню Девид, Бленкеншип
Джон В., Митчелл Дениэл, Павлик
Питер (US)**
- (74) Представитель:
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)**
- (56) **WO-A1-2016116626
US-A1-20150110789
US-A1-20160176953
US-A1-20050208048
US-A1-20060234302
US-A1-20130266569
US-A1-20060035320
WO-A2-2014143807**

B9**047733****047733
B9**

- (57) Данное изобретение относится к белковым молекулам, которые специфически связываются с CD123, которые могут иметь по меньшей мере один гуманизированный или человеческий CD123-связывающий домен. Такие молекулы полезны для лечения рака. Молекула белка, связывающаяся с CD123, может иметь второй связывающий домен, который связывается с другой мишенью. В одном варианте осуществления молекулы мультиспецифических полипептидов связывают как клетки, экспрессирующие CD123, так и Т-клеточный рецепторный комплекс на Т-клетках, чтобы индуцировать зависимую от мишени цитотоксичность, активацию и пролиферацию Т-клеток. Данное изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие указанные молекулы полипептида, связывающего CD123, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эти полипептиды, и способы получения этих молекул.

Данная заявка заявляет приоритет и преимущество предварительной заявки на патент США № 62/397736, поданной 21 сентября 2016 г., и предварительной заявки на патент США № 62/466192, поданной 2 марта 2017 г. Содержание каждой из указанных заявок включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Описание текстового файла, поданного в электронном виде

Содержимое текстового файла, поданного с данным документом в электронной форме, полностью включено в данный документ посредством ссылки: Копия Списка Последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла:

APVO_054_03WO_SeqList_ST25.txt; дата записи: 21 сентября 2017 г.; размер файла 257861 байт).

Область техники

Данное раскрытие относится к молекулам, которые специфически связываются с CD123, которые могут иметь по меньшей мере один гуманизованный CD123-связывающий домен. Эти молекулы полезны для характеристики или лечения расстройств, характеризующихся сверхэкспрессией CD123, таких как рак. Терапевтический белок, связывающийся с CD123 может быть моноспецифическим терапевтическим белком или мультиспецифическим терапевтическим белком. Мультиспецифический терапевтический белок может связывать как экспрессирующие CD123 клетки, так и Т-клеточный рецепторный комплекс на Т-клетках, чтобы индуцировать зависимую от мишени Т-клеточную цитотоксичность, активацию и пролиферацию.

Уровень техники

CD123 также известен как альфа-цепь человеческого рецептора интерлейкина-3 (ИЛ-3). CD123 является трансмембранным гликопротеином 1-го типа и является членом суперсемейства цитокиновых рецепторов. Рецептор интерлейкина-3 представляет собой гетеродимер, образованный CD123 и бета-цепью (CD131). ИЛ-3 связывается с CD123, а передача сигнала обеспечивается CD131. ИЛ-3 регулирует функцию и продукцию кроветворных и иммунных клеток и стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток (Testa et al., *Biomark Res.* 2: 4 (2014)).

CD123 сверхэкспрессируется при многих гематологических злокачественных новообразованиях, включая подгруппу острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), новообразований из бластных плазматоидных дендритных клеток (ОБПДК) и волосатоклеточного лейкоза. Id. В то время как большинство пациентов с ОМЛ хорошо реагируют на начальную терапию, у большинства пациентов с ОМЛ в конечном итоге диагностируют рецидив или рефрактерную болезнь (Ramos et al., *J. Clin. Med.* 4:665-695 (2015)). Существует потребность в молекулах, нацеленных на CD123, с повышенной эффективностью и потенциальностью и сниженными побочными эффектами, которые могут быть использованы для лечения расстройств, связанных с нарушением регуляции CD123.

Сущность изобретения

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему CD123-связывающий домен, причем CD123-связывающий домен включает (i) варируемую область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) варируемую область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 6 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 10 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 12 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 14 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 16 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Например, данное раскрытие охватывает рекомбинантный полипептид, содержащий CD123-связывающий домен, причем CD123-связывающий домен содержит (i) варируемую область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) варируемую область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 6 одной или двумя аминокислотными заменами; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 одной или двумя аминокислотными заменами; LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 10 одной или двумя аминокислотными заменами; HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 12 одной или двумя аминокислотными заменами; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или

LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 86 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 88 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (c) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 90, по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (d) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 92 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (e) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 94 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (f) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 96, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 96 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Например, данное изобретение включает полипептид, содержащий переменные домены, представленные в SEQ ID NO: 82 и 84.

(ii) переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 84.

Полипептиды по данному изобретению специфически связываются с CD123 человека. В определенных вариантах осуществления полипептиды связываются с CD123 примата, отличного от человека. В дополнительных вариантах осуществления указанные полипептиды связываются с CD123 яванского макака. Данное изобретение включает полипептид, связывающий CD123, содержащий человеческий CD123-связывающий домен, и полипептид, связывающий CD123, содержащий гуманизированный CD123-связывающий домен. В одном варианте осуществления CD123-связывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

Рекомбинантные полипептиды по данному изобретению включают в себя биспецифические полипептиды, содержащие второй связывающий домен. В одном варианте осуществления второй связывающий домен связывает Т-клетку, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного (ТКР) комплекса со специфичностью. Например, данное изобретение включает рекомбинантные CD123-связывающие полипептиды, содержащие CD3-связывающий scFv. Данное изобретение включает в себя объединение любого из раскрытых scFv, связывающихся с CD123, с раскрытым scFv, связывающим CD3. В одном варианте осуществления полипептид состоит из: (i) CD123-связывающего домена, (ii) шарнирной области, (iii) константной области иммуноглобулина, (iv) карбокси-терминального линкера и (v) второго связывающего домена. Например, данное изобретение включает рекомбинантный полипептид, содержащий по порядку от amino до карбоксильного конца: (i) CD123-связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокситерминальный линкер и (v) второй связывающий домен.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифические полипептиды, содержащие CD123-связывающий домен и CD3-связывающий домен, содержат модифицированную константную область иммуноглобулина, сконструированную для проявления минимальной активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ/ADCC-antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC - complement-dependent cytotoxicity). В одном варианте осуществления изобретения CD3-связывающий домен получен из моноклонального антитела, выбранного из CRIS-7, HuM291 и I2C.

В определенных вариантах осуществления изобретения полипептид, связывающий CD123 включает: (i) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130; (ii) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 132; (iii) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 134; (iv) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136; (v) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138; (vi) аминокислотную

последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140; (vii) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142; (viii) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144; (iv) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146; (x) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 148; (xi) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную по меньшей мере примерно на 95% идентичную, по меньшей мере примерно на 97% идентичную, по меньшей мере, примерно на 98% идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 150; (xii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере, примерно на 93% идентичную, по меньшей мере, примерно на 95% идентичную, по меньшей мере, примерно на 97% идентичную, по меньшей мере, примерно на 98% идентичную или, по меньшей мере, примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 152; (xiii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере, примерно, на 93% идентичную, по меньшей мере, примерно, на 95% идентичную, по меньшей мере, примерно, на 97% идентичную, по меньшей мере, примерно, на 98% идентичную или, по меньшей мере, примерно, на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154; или (xiv) аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 93% идентичную, по меньшей мере примерно на 95%, идентичную по меньшей мере примерно на 97%, идентичную по меньшей мере примерно на 98%, идентичную или по меньшей мере примерно на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156.

В одном варианте осуществления изобретения рекомбинантный полипептид индуцирует перенаправленную цитотоксичность Т-клеток (RTCC - redirected T-cell cytotoxicity). В некоторых вариантах осуществления указанный рекомбинантный полипептид индуцирует активацию Т-клеток или пролиферацию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид индуцирует Т-клеточно-зависимый лизис клеток, экспрессирующих CD123.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифический полипептид, содержащий CD123-связывающий домен и CD3-связывающий домен при связывании с белком CD3 на Т-клетке, индуцирует пониженное высвобождение цитокинов из указанной Т-клетки по сравнению с контролем с антителом ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифический полипептид, содержащий CD123-связывающий домен и CD3-связывающий домен, полученный из CRIS-7, индуцирует пониженное высвобождение цитокинов из указанной Т-клетки по сравнению с биспецификом, содержащим CD3-связывающий домен, происходящий от ОКТ3 или I2C. В определенных вариантах осуществления изобретения биспецифический полипептид содержит CD123-связывающий домен (например, CD123-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 4) и CD3-связывающий домен, полученный из CRIS-7, и в формате scFv-Fc-scFv, вызывающий уменьшение высвобождения цитокинов у людей или приматов, отличных от человека, по сравнению с биспецифическим полипептидом, содержащим CD123-связывающий домен и CD3-связывающий домен, полученный из I2C, в формате scFv-scFv или диатела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифический полипептид, содержащий CD123-связывающий домен и CD3-связывающий домен, например рекомбинантный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или на 100%, идентичные SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132), индуцирует пониженное высвобождение цитокинов у примата, отличного от человека, или человека, по сравнению с MGD006 или TRI168. В одном варианте осуществления изобретения рекомбинантный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132, индуцирует пониженные уровни ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α и/или ИЛ-10 по сравнению с MGD006 или TRI168.

Данное раскрытие охватывает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, связывающий CD123, описанный в данном документе, или часть указанного полипептида, связывающего CD123. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153 или SEQ ID NO: 155.

Данное раскрытие относится к экспрессионному вектору, содержащему сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид, связывающий CD123, описанный в данном документе, причем указанный сегмент нуклеиновой кислоты функционально связан с регуляторными последовательностями, подходящими для экспрессии указанного сегмента нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Указанный сегмент нуклеиновой кислоты указанного экспрессионного вектора может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153 или SEQ ID NO: 155.

Данное раскрытие включает в себя рекомбинантную клетку-хозяин, содержащую вектор экспрессии, описанный в данном документе.

Данное раскрытие относится к способу получения полипептида, связывающего CD123, причем способ включает культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии, описанный в данном документе, в условиях, в которых экспрессируется сегмент нуклеиновой кислоты вектора, в результате чего получается полипептид, связывающий CD123. Способ может дополнительно включать выделение полипептида, связывающего CD123.

В некоторых вариантах осуществления данное раскрытие относится к фармацевтической композиции, содержащей полипептид, связывающий CD123, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде лекарственной формы, выбранной из группы, состоящей из единичная форма дозы для перорального введения, единичная форма дозы для внутривенного введения, единичная форма дозы для интраназального введения, единичная форма дозы для суппозиторий, единичная форма дозы для внутрикожного введения, единичная форма дозы для внутримышечного введения, единичная форма дозы для внутрибрюшинного введения, единичная форма дозы для подкожного введения, единичная форма дозы для эпидурального введения, единичная форма дозы для сублингвального введения и единичная форма дозы для внутримозгового введения. Фармацевтическая композиция, составленная в виде пероральной единичной формы дозы, может быть выбрана из группы, состоящей из таблеток, пилюль, pellets, капсул, порошков, пастилок, гранул, растворов, суспензий, эмульсий, сиропов, эликсиров, составов с замедленным высвобождением, аэрозолей, и спреев.

Данное изобретение также относится к способу индукции перенаправленной цитотоксичности Т-клеток (RTCC) в отношении клетки, экспрессирующей CD123, причем этот способ включает контактирование указанной клетки, экспрессирующей CD123, с полипептидом, связывающим CD123, описанным в данном документе, причем второй связывающий домен специфически связывает Т-клетку, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного комплекса; и причем указанное контактирование происходит в условиях, при которых индуцируется RTCC против CD123-экспрессирующей клетки.

Данное раскрытие относится к способу индуцирования Т-клеточно-зависимого лизиса клетки, экспрессирующей CD123, причем способ включает контактирование указанной клетки, экспрессирующей CD123, с полипептидом, связывающим CD123 или CD123-связывающим белком, описанным в данном документе, причем второй связывающий домен специфически связывает Т-клетку, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного комплекса; и причем указанное контактирование происходит в условиях, при которых индуцируется Т-клеточно зависимый лизис клетки, экспрессирующей CD123.

Данное раскрытие относится к способу лечения расстройства (например, рака) у субъекта, причем указанное расстройство характеризуется сверхэкспрессией CD123, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количество полипептида, связывающего CD123, описанного в данном документе. Данное раскрытие также относится к CD123-связывающему полипептиду, описанному в данном документе, для изготовления лекарственного средства для лечения расстройства (например, рака) у субъекта, причем указанное расстройство характеризуется сверхэкспрессией CD123. Данное раскрытие включает в себя полипептид, связывающий CD123, описанный в данном документе, для приме-

нения при лечении расстройства (например, рака) у субъекта, причем указанное расстройство характеризуется сверхэкспрессией CD123. Рак, который лечат CD123-связывающими полипептидами, описанными в данном документе, может быть острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), В-лимфолейкозом, новообразованиями из бластных плазматоидных дендритных клеток (ОБПДК) или волосатоклеточным лейкозом.

Эти и другие варианты осуществления и/или другие аспекты раскрытия станут очевидными после ссылки на следующее подробное описание раскрытия и приложенных графических материалов.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-D продемонстрировано связывание 13 различных биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε (TRI123, TRI125, TRI126, TRI127, TRI128, TRI129, TRI130, TRI131, TRI132, TRI134, TRI137, TRI138 и TRI139) в трех независимых экспериментах с CD123 (+) линией опухолевых клеток человека Molm-13.

На фиг. 2A-C, 2B и 2C продемонстрировано связывание 13 различных биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε (TRI123, TRI125, TRI126, TRI127, TRI128, TRI129, TRI130, TRI131, TRI132, TRI134, TRI137, TRI138 и TRI139) и TRI138) в двух независимых экспериментах с клетками CHO, стабильно экспрессирующими белок CD123 яванского макака.

На фиг. 3A-C продемонстрированы результаты анализа высвобождения хрома-51 с клеточной линией Molm-13, измеренных через 4 ч с использованием 13 различных биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε (TRI123, TRI125, TRI126, TRI127, TRI128, TRI129, TRI130, TRI131, TRI132, TRI134, TRI137, TRI138 и TRI139) в двух независимых экспериментах. Все биспецифические молекулы анти-CD123х анти-CD3ε показали эффективный лизис клеток-мишеней через 4 ч в диапазоне от 24 до 48% максимального специфического лизиса.

На фиг. 4A-D продемонстрирована индукция пролиферации Т-клеток при низких концентрациях (10 пМ).

На фиг. 5A-D продемонстрирована целенаправленная активация CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в присутствии клеток Molm-13.

На фиг. 6 продемонстрирован пример анализа SPR TRI-130 при различных концентрациях ECD.

На фиг. 7 продемонстрированы кривые зависимости концентрации от времени для биспецифических молекул TRI129 и TRI130.

Фиг. 8 демонстрирует уменьшение объема опухоли на мышинной модели опухоли, обработанной TRI129.

Фиг. 9 демонстрирует уменьшение объема опухоли на мышинной модели опухоли, обработанной TRI130.

На фиг. 10 продемонстрировано, что лечение мышинной опухолевой модели с помощью TRI129 или TRI130 приводит к увеличению выживаемости.

Фиг. 11 представляет собой иллюстрацию рекомбинантного полипептида, связывающего CD123, способного к RTCC в конфигурации CD123-связывающий домен - шарнирный домен - константный домен иммуноглобулина - CD3-связывающий домен.

На фиг. 12 продемонстрированы результаты анализа высвобождения хрома-51 с клеточными линиями Molm-13, KG-1a и Daudi, измеренного через 4 часа с использованием биспецифической молекулы TRI130 анти-CD123х анти-CD3ε. В этом анализе измеряли цитотоксичность TRI130, инкубированного с CD123-позитивными или CD123-негативными опухолевыми клеточными линиями и очищенными Т-клетками человека.

На фиг. 13 продемонстрированы некомпартментные оценки (NCA - non-compartmental) WinNonlin[®] и период полураспада (HL - half-life) для групп лечения яванских макаков, получавших TRI130, как описано в примере 14.

На фиг. 14 продемонстрирован график, показывающий изменение популяции лимфоцитов с течением времени у яванских макаков, получавших TRI130, как описано в примере 14.

На фиг. 15 продемонстрирован график, показывающий изменение популяции базофилов с течением времени у яванских макаков, обработанных TRI130, как описано в примере 14.

Фиг. 16 демонстрирует график, изображающий опухолевую нагрузку, измеренную по уровням биолюминесценции во времени на модели с диссеминированным ксенотрансплантатом мыши при остром миелолейкозе (ОМЛ), как описано в примере 15.

Фиг. 17 демонстрирует биолюминесцентные изображения опухолевой нагрузки у мышей на 14 день.

На фиг. 18 продемонстрированы результаты анализов, измеряющих TRI130- и TRI168-индуцированную активацию Т-клеток клетками-мишенями CD123⁺ Molm-13, как описано в примере 17.

На фиг. 19 продемонстрированы результаты анализов, измеряющих индуцированную TRI130 и TRI168 цитотоксичность Т-клеток клеток-мишеней CD123 Molm-13, как описано в примере 17.

На фиг. 20 продемонстрированы результаты анализов, измеряющих TRI130- и TRI168-индуцированное высвобождение цитокинов Т-клеток с клетками-мишенями CD123⁺ Molm-13, как описано в примере 17.

На фиг. 21 продемонстрированы результаты анализов, измеряющих TRI130- и TRI168-индуцированное высвобождение цитокинов Т-клеток в культурах моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), как описано в примере 17.

На фиг. 22 продемонстрированы результаты анализов, измеряющих цитотоксичность TRI130, инкубированного с образцами клеток ОМЛ от субъектов с ОМЛ, как описано в примере 18.

Подробное описание сущности изобретения

Данное раскрытие изобретения обеспечивает связывающие домены, которые специфически связываются с CD123 (также известный как альфа-цепь рецептора интерлейкина-3) и связывающие молекулы (например, полипептиды и белки), которые специфически связываются с CD123. Эти связывающие молекулы могут специфически связываться с CD123 и с другой мишенью. Введение терапевтически эффективного количества полипептида или белка, связывающего CD123, нуждающемуся в этом пациенту, полезно для лечения определенных расстройств, связанных со сверхэкспрессией CD123, включая некоторые виды рака. В одном варианте осуществления полипептид или белок, связывающий CD123, связывает как клетку-мишень со сверхэкспрессией CD123, так и Т-клетку, тем самым "сшивая" клетку-мишень со сверхэкспрессией CD123 и Т-клетку. Связывание обоих доменов с их мишенями вызывает сильную, зависящую от мишени перенаправленную цитотоксичность Т-клеток (RTCC) (например, индуцирует цитотоксичность, зависящую от мишеней Т-клеток, активацию Т-клеток и/или пролиферацию Т-клеток). CD123-связывающие терапевтические средства по данному изобретению предлагают различные преимущества при лечении пациентов, например эффективное связывание с CD123, эффективную индукцию RTCC активности, пониженные уровни высвобождения цитокинов и/или более низкий риск нежелательных явлений (например, токсичности). В определенных аспектах CD123-связывающие белки связываются с CD123 более эффективно в определенных форматах (например, scFv по сравнению с родительским антителом) и/или в определенных ориентациях (например, VL-VH по сравнению с VH-VL), что приводит к более высокой потенции и улучшению применимости при лечении расстройств, связанных со сверхэкспрессией CD123.

Заголовки разделов, используемые в данном описании, предназначены только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект изобретения. Все документы или части документов, цитируемых в данном документе, включая, но не ограничиваясь патентами, патентными заявками, статьями, книгами и трактатами, в данном документе прямо включены посредством ссылки в полном объеме для любых целей. В случае, если один или несколько из включенных документов или частей документов определяют термин, который противоречит определению этого термина в применении, определение, которое появляется в этом применении, имеет преимущество. Однако упоминание любой ссылки, статьи, публикации, патента, патентной публикации и заявки на патент, цитируемых в данном документе, не является и не должно восприниматься как подтверждение или какая-либо форма предположения о том, что они представляют собой действующий предшествующий уровень техники или являются частью общих общеизвестных знаний в любой стране мира.

В данном описании любой диапазон концентрации, процентный диапазон, диапазон отношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано иное. Следует понимать, что термины в единственном числе, используемые в данном документе, относятся к "одному или нескольким" из перечисленных компонентов, если не указано иное. Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как означающее либо одну, обе, либо любую их комбинацию альтернатив. Используемые в данном документе термины "включать" и "содержать" используются как синонимы. Кроме того, следует понимать, что полипептиды, содержащие различные комбинации компонентов (например, доменов или областей) и заместителей, описанных в данном документе, раскрыты в данной заявке в той же степени, как если бы каждый полипептид был представлен индивидуально. Таким образом, выбор конкретных компонентов отдельных полипептидов находится в пределах данного раскрытия.

Как используется в данном документе термин "связывающий домен" или "связывающая область" относится к домену, области, части или сайту белка, полипептида, олигопептида или пептида или антигена или связывающего домена, полученного из антигена, которое обладает способностью специфически распознавать и связывать молекулу-мишень, такую как антиген, лиганд, рецептор, субстрат или ингибитор (например, CD123, CD3). Иллюстративные связывающие домены включают одноцепочечные переменные области антител (например, доменные антитела, sFv, scFv, scFab), эктодомены рецепторов и лиганды (например, цитокины, хемокины). В некоторых вариантах осуществления связывающий домен содержит или состоит из антигенсвязывающего сайта, например, включающего переменную последовательность тяжелой цепи и переменную последовательность легкой цепи или три области, определяющие комплементарность (CDR), легкой цепи и три CDR тяжелой цепи из антигена, помещенного в альтернативные каркасные области (FR) (например, FR человека, необязательно содержащее одну или несколько аминокислотных замен). Известно множество анализов для идентификации связывающих доменов по данному изобретению, которые специфически связывают конкретную мишень, включая вестерн-блот, ИФА, скрининг библиотеки фагового дисплея и анализ взаимодействия BIACORE®. Как ис-

пользуется в данном документе полипептид, связывающий CD123 может иметь "первый связывающий домен" и, необязательно, "второй связывающий домен". В некоторых вариантах осуществления "первый связывающий домен" представляет собой CD123-связывающий домен, а формат представляет собой антитело или антитело-подобный белок или домен. В некоторых вариантах осуществления, включающих в себя как первый, так и второй связывающий домены, второй связывающий домен представляет собой домен, связывающий Т-клетки, такой как scFv, полученный из мышинового моноклонального антитела (например, CRIS-7), или фагового дисплея (например, I2C), который связывается с антигеном поверхности Т-клеток (например, CD3). В других вариантах осуществления второй связывающий домен представляет собой второй CD123-связывающий домен. В еще одном варианте осуществления второй связывающий домен представляет собой связывающий домен, отличный от CD123-связывающего домена или домена связывания Т-клеток.

"Высвобождение цитокинов" или "цитокиновый шторм" или "реакция инфузии" относится к высвобождению цитокинов из Т-клеток. Когда цитокины попадают в кровообращение, могут возникнуть системные симптомы, такие как лихорадка, тошнота, озноб, гипотензия, тахикардия, астения, головная боль, сыпь, зуд в горле и одышка. Некоторые пациенты могут испытывать серьезные, опасные для жизни реакции, возникающие в результате массового выделения цитокинов. "Уменьшенное" высвобождение цитокинов относится к уменьшению высвобождения по меньшей мере одного цитокина (например, ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α и/или ИЛ-10) после введения рекомбинантного полипептида по данному изобретению по сравнению с антителом ОКТ-3 или другой CD3-связывающей биспецифической молекулой. Уменьшенное высвобождение цитокинов может быть измерено с использованием анализов *in vitro* или *in vivo*.

Связывающий домен или белок "специфически связывает" мишень, если он связывает мишень с аффинностью или K_a (то есть константой равновесной ассоциации конкретного связывающего взаимодействия с единицами 1/М), равной или превышающей 10^5 M^{-1} , в то время как незначительно связывает другие компоненты, присутствующие в тестовом образце. Связывающие домены могут быть классифицированы как связывающие домены с высокой аффинностью и связывающие домены с низкой аффинностью. Связывающие домены с "высокой аффинностью" относятся к таким связывающим доменам, у которых K_a по меньшей мере 10^7 M^{-1} , по меньшей мере 10^8 M^{-1} , по меньшей мере 10^9 M^{-1} , по меньшей мере 10^{10} M^{-1} , по меньшей мере 10^{11} M^{-1} , по меньшей мере 10^{12} M^{-1} или по меньшей мере 10^{13} M^{-1} . "Низкоаффинные" связывающие домены относятся к таким связывающим доменам, у которых K_a составляет вплоть до 10^7 M^{-1} , вплоть до 10^6 M^{-1} , вплоть до 10^5 M^{-1} . Альтернативно, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) конкретного связывающего взаимодействия с единицами М (например, от 10^{-5} M до 10^{-13} M). Аффинность полипептидов связывающего домена и одноцепочечных полипептидов в соответствии с данным изобретением может быть легко определена с использованием обычных методик (см., например, Scatchard et al. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 660; и патенты США № 5283173, 5468614 или эквивалент).

"CD3" известен в данной области как мультибелковый комплекс из шести цепей (см., например, Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., P. 172 и 178, 1999), которые являются субъединицами Т-клеточного рецепторного комплекса. У млекопитающих субъединицы CD3 Т-клеточного рецепторного комплекса представляют собой CD3 γ -цепь, CD3 δ -цепь, две CD3 ϵ -цепи и гомодимер СВ3 ζ -цепей. Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ являются высоко родственными белками клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащими один внеклеточный домен иммуноглобулина.

Трансмембранные области цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ заряжены отрицательно, что является характеристикой, которая позволяет этим цепям ассоциироваться с положительно заряженными цепями Т-клеточного рецептора. Каждый из внутриклеточных хвостов цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ содержит один консервативный мотив, известный как мотив активации иммунорецептора на основе тирозина, или ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), в то время как каждая цепь CD3 ζ , имеет три таких. Считается, что ITAM важны для сигнальной способности ТКР комплекса. CD3, используемый в данном описании, может быть от различных видов животных, включая человека, обезьяну, мышь, крысу или других млекопитающих.

Как используется в данном документе термин "консервативная замена" в данной области техники известен как замена одной аминокислоты другой аминокислотой, которая имеет сходные свойства. Иллюстративные консервативные замены хорошо известны в данной области (см., например, WO 97/09433, страница 10, опубликованная 13 марта 1997 года; Lehninger, *Biochemistry, Second Edition*; Worth Publishers, Inc. NY: NY (1975), pp. 71-77; Lewin, *Genes IV*, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA (1990), p. 8). В некоторых вариантах осуществления консервативная замена включает замену лейцина на серин.

Как используется в данном документе, термин "производное" относится к модификации одного или нескольких аминокислотных остатков пептида химическими или биологическими средствами, либо с использованием фермента, либо без него, например, путем гликозилирования, алкилирования, ацилирования, образования сложного эфира или амида.

Как используется в данном документе термин полипептид или аминокислотная последователь-

ность, "происходящая из" указанного полипептида или белка, относится к происхождению указанного полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептидная или аминокислотная последовательность, которая происходит из конкретной последовательности (иногда называемой "исходной" или "родительской" или "родительной" последовательностью), имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична исходной последовательности или ее части, причем указанная часть состоит из по меньшей мере 10-20 аминокислот, по меньшей мере 20-30 аминокислот или по меньшей мере 30-50 аминокислот, или по меньшей мере 50-150 аминокислот, или которую иным образом можно идентифицировать для специалиста в данной области техники, как происходящую из начальной последовательности. Например, связывающий домен может быть получен из антитела, например, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv, однодоменного антитела (sdAb - single domain antibody) и т.д.

Полипептиды, происходящие от другого полипептида, могут иметь одну или несколько мутаций относительно исходного полипептида, например, один или несколько аминокислотных остатков, которые были замещены другим аминокислотным остатком или которые имеют одну или несколько вставок или делеций аминокислотных остатков. Полипептид может содержать аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. Такие вариации обязательно имеют меньше, чем 100% идентичности последовательности или сходства с исходным полипептидом. В одном варианте осуществления указанный вариант будет иметь аминокислотную последовательность от примерно 60% до менее чем 100% идентичную или сходную с аминокислотной последовательностью аминокислотной последовательности исходного полипептида. В другом варианте осуществления указанный вариант будет иметь аминокислотную последовательность от примерно 75 до менее чем 100%, от примерно 80 до менее чем 100%, от примерно 85 до менее чем 100%, от примерно 90 до менее чем 100%, от примерно 95 до менее чем 100% идентичную или сходную с аминокислотной последовательностью исходного полипептида.

Как используется в данном документе, если не указано иное, положение аминокислотного остатка в вариабельной области молекулы иммуноглобулина нумеруется в соответствии с соглашением о нумерации IMGT (Brochet X, et al., Nucl. Acids Res. (2008) 36, W503-508), а положение аминокислотного остатка в константной области молекулы иммуноглобулина пронумеровано в соответствии с номенклатурой EU (Ward et al., 1995 Therap. Immunol. 2:77-94). В данной области известны другие соглашения о нумерации (например, соглашение о нумерации по Кабату (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Bethesda, MD: Public Health Service, National Institutes of Health (1991)).

Как используется в данном документе, термин "димер" относится к биологическому объекту, который состоит из двух субъединиц, связанных друг с другом посредством одной или нескольких форм внутримолекулярных сил, включая ковалентные связи (например, дисульфидные связи) и другие взаимодействия (например, электростатические взаимодействия, солевые мостики, водородные связи и гидрофобные взаимодействия) и является стабильным в соответствующих условиях (например, в физиологических условиях, в водном растворе, подходящем для экспрессии, очистки и/или хранения рекомбинантных белков, или в условиях денатурирующего и/или невосстанавливающего электрофореза). Как используется в данном документе термин "гетеродимер" или "гетеродимерный белок" относится к димеру, образованному из двух разных полипептидов. Гетеродимер не включает антитело, образованное из четырех полипептидов (то есть двух легких цепей и двух тяжелых цепей). Как используется в данном документе, термин "гомодимер" или "гомодимерный белок" относится к димеру, образованному из двух идентичных полипептидов. Рекомбинантные полипептиды по данному изобретению существуют главным образом в димеризованной форме. Следует понимать, что все раскрытие полипептида, включая характеристики и активности (такие как связывание и RTCC), включает полипептид в его димерной форме, а также другие мультимерные формы.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий CD123, содержит, от аминоконца до карбоксильного конца или от карбоксильного конца до аминоконца, (i) CD123-связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокси-терминальный линкер (или амино-терминальный линкер) и (v) второй связывающий домен. Как используется в данном документе и в зависимости от контекста "шарнирная область" или "шарнир" относится к полипептидной области между связывающим доменом (например, CD123-связывающим доменом) и константной областью иммуноглобулина. Как используется в данном документе и в зависимости от контекста, "линкер" может относиться к (1) полипептидной области между областями V_H и V_L в одноцепочечной Fv(scFv) или (2) полипептидной области между константной областью иммуноглобулина и вторым связывающим доменом в CD123-связывающем полипептиде, содержащем два связывающих домена. Область полипептида между константной областью иммуноглобулина, и вторым связывающим доменом в CD123-связывающем полипептиде, содержащем два связывающих домена может также называться как "карбокси-терминальный линкер" (карбокси-концевой линкер) или "амино-терминальный линкер" (амино-концевой линкер). Неограничивающие примеры карбокси-терминальных и амино-терминальных линкеров включают гибкие линкеры, содержащие глицин-сериновые (например, (Gly₄Ser)) повторы (SEQ ID NO: 315), и линкеры, происходящие от (a) междоменной области трансмембранного белка (например, трансмембранного белка 1-го типа); (b) область ножки С-лектина II-го типа; или (c) шарнир иммуноглобулина. Неограничивающие примеры шарниров и линкеров приведены в табл. 1 и 2. В некоторых вари-

антах осуществления "линкер" обеспечивает функцию спейсера, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов, так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания с той же молекулой-мишенью, что и антитело, которое содержит те же вариабельные области легкой и тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от пяти до примерно 35 аминокислот, например, от примерно 15 до примерно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из по меньшей мере 5 аминокислот, по меньшей мере 7 аминокислот или по меньшей мере 9 аминокислот.

"Шарнирный участок иммуноглобулина дикого типа" относится к встречающимся в природе аминокислотным последовательностям верхнего и среднего шарниров, вставленным между и соединяющими СН1 и СН2-домены (для IgG, IgA и IgD) или вставленным между и соединяющим СН1 и СН3-домены (для IgE и IgM), которые обнаруживаются в тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнирной области иммуноглобулина дикого типа является человеческой и может содержать шарнирную область IgG человека.

"Измененная шарнирная область иммуноглобулина дикого типа" или "измененная шарнирная область иммуноглобулина" относится к: (а) шарнирной области иммуноглобулина дикого типа с аминокислотными изменениями, составляющими вплоть до 30% (например, вплоть до 25%, 20%, 15%, 10% или 5% аминокислотных замен или делеций), или (b) части шарнирной области иммуноглобулина дикого типа, которая имеет длину от около 5 аминокислот (например, около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот) до примерно 120 аминокислот (например, имеющей длину от примерно 10 до примерно 40 аминокислот или от примерно 15 до примерно 30 аминокислот или от около 15 до около 20 аминокислот или от около 20 до около 25 аминокислот), имеющей до 30% аминокислотных изменений (например, до около 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% аминокислотных замен или делеций или их комбинации) и имеет центральную шарнирную область IgG, как описано в US 2013/0129723 и US 2013/0095097.

Как используется в данном документе термин "гуманизированный" относится к процессу производства антител или иммуноглобулинсвязывающих белков и полипептидов, полученных от нечеловеческого вида (например, мыши или крысы), менее иммуногенных для человека, при этом сохраняющих антигенсвязывающие свойства оригинального антитела, с использованием методов генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен(ы) антитела или иммуноглобулинсвязывающих белков и полипептидов (например, вариабельные области легкой и тяжелой цепи, Fab, scFv) являются гуманизированными. Нечеловеческие связывающие домены могут быть гуманизированы с использованием методов, известных как прививка CDR (Jones et al., Nature 321: 522 (1986)) и их вариантов, включая "изменение формы" (Verhoeven et al., 1988 Science 239: 1534-1536; Riechmann et al., 1988 Nature 332: 323-337; Tempest et al., Bio/Technol 1991 9: 266-271), "гиперхимеризацию" (Queen et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: 10029-10033; Co et al. 1991, Proc Natl Acad Sci USA, 88: 2869-2873; Co et al., 1992 J Immunol. 148: 1149-1154) и "виниринг/veneering" (Mark et al., "Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies.". In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312). Если они происходят от нечеловеческого источника, другие области антитела или связывающие иммуноглобулин белки и полипептиды, такие как шарнирная область и домены константной области, также могут быть гуманизированы.

Используемый в данном описании термин "домен димеризации иммуноглобулина" или "домен гетеродимеризации иммуноглобулина" относится к домену полипептидной цепи иммуноглобулина, который преимущественно взаимодействует или ассоциируется с другим доменом второй полипептидной цепи иммуноглобулина, причем взаимодействие различных доменов гетеродимеризации иммуноглобулинов существенно способствует или эффективно способствует гетеродимеризации первой и второй полипептидных цепей (то есть образованию димера между двумя разными полипептидными цепями, который также называют "гетеродимером"). Взаимодействия между доменами гетеродимеризации иммуноглобулина "существенно способствуют или эффективно способствуют" гетеродимеризации первой и второй полипептидных цепей, если происходит статистически значимое снижение димеризации между первой и второй полипептидными цепями в отсутствие домена гетеродимеризации иммуноглобулина первой полипептидной цепи и/или домена гетеродимеризации иммуноглобулина второй полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления, когда первая и вторая полипептидные цепи коэкспрессированы по меньшей мере 60%, по меньшей мере от около 60 до около 70%, по меньшей мере от около 70 до около 80%, по меньшей мере от 80 до около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% первой и второй полипептидных цепей образуют гетеродимеры друг с другом. Иллюстративные гетеродимеризационные домены иммуноглобулина включают СН1-домен иммуноглобулина, домен СL иммуноглобулина (например, изоформы Сk или Сl) или их производные, включая СН1 и СL-домены иммуноглобулина дикого типа и измененные (или мутированные) СН1 и СL-домены иммуноглобулина, как предусмотрено в данном документе.

"Константная область иммуноглобулина" или "константная область" является термином, определенным в данном документе для обозначения пептидной или полипептидной последовательности, которая соответствует или происходит из части или всего одного или более доменов константной области. В

некоторых вариантах осуществления константная область иммуноглобулина соответствует или происходит из части или всего одного или более доменов константной области, но не всех доменов константной области исходного антитела. В некоторых вариантах осуществления константная область содержит СН2 и СН3-домены IgG, например, СН2 и СН3-домены IgG1. В некоторых вариантах осуществления константная область не содержит СН1-домен. В определенных вариантах осуществления домены константной области, составляющие константную область, являются человеческими. В некоторых вариантах осуществления (например, в определенных вариациях полипептида, связывающего CD123 или белка, содержащего второй связывающий домен, который специфически связывает CD3 или другой антиген на поверхности Т-клеток), домены константной области слитого белка по данному раскрытию отсутствуют или имеют минимальные эффекторные функции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и активации комплемента и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), сохраняя при этом способность связывать некоторые Fc -рецепторы (такие как Fc Rn, Fc-рецептор новорожденных) и сохраняют относительно длительный период полужизни *in vivo*. В других вариантах слитый белок по данному изобретению включает константные домены, которые сохраняют такую эффекторную функцию одного или обоих из АЗКЦ и CDC. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен по данному изобретению слит с константной областью человеческого IgG1, причем константная область IgG1 имеет одну или несколько мутаций из следующих аминокислот: лейцин в положении 234 (L234), лейцин в положении 235 (L235), глицин в положении 237 (G237), глутамат в положении 318 (E318), лизин в положении 320 (K320), лизин в положении 322 (K322) или любую их комбинацию (нумерация согласно EU). Например, любая одна или несколько из этих аминокислот могут быть заменены на аланин. В дополнительном варианте осуществления Fc-домен IgG1 имеет каждый из L234, L235, G237, E318, K320 и K322 (согласно нумерации EU), мутированный в аланин (то есть L234A, L235A, G237A, E318A, K320A и K322A, соответственно) и, возможно, также мутацию N297A (т. е., по существу, устраняющую гликозилирование СН2-домена). В другом варианте осуществления Fc-домен IgG1 имеет каждую из мутаций L234A, L235A, G237A и K322A. Например, данное изобретение включает рекомбинантный полипептид, содержащий CD123-связывающий домен или scFv аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или на 100% идентичной SEQ ID NO: 130; домен IgG1, содержащий мутации L234A, L235A, G237A и K322A; и CD3-связывающий домен. Данное изобретение включает рекомбинантный полипептид, содержащий CD123-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 130; домен IgG1, содержащий мутации L234A, L235A, G237A и K322A; и CD3-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или 100%, идентичную SEQ ID NO: 192 или SEQ ID NO: 193.

"Fc-область" или "Fc-домен" относится к полипептидной последовательности, соответствующей или происходящей из части исходного антитела, которая отвечает за связывание с рецепторами антител на клетках и компонентом C1q комплемента. Fc означает "кристаллизуемый фрагмент", фрагмент антитела, который легко образует кристалл белка. Отдельные фрагменты белка, которые были первоначально описаны с помощью протеолитического расщепления, могут определять в целом общую структуру белка иммуноглобулина. Как первоначально определено в литературе, Fc-фрагмент состоит из дисульфид-связанных шарнирных областей тяжелой цепи, СН2 и СН3-доменов. Однако недавно этот термин был применен к одной цепи, состоящей из СН3, СН2 и по меньшей мере части шарнира, достаточной для образования дисульфид-связанного димера со второй такой цепью. Для обзора структуры и функции иммуноглобулина, см. Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140; и Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994. Как используется в данном документе, термин Fc включает варианты встречающихся в природе последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий белок содержит белковый каркас, который в общих чертах раскрыт, например, в публикациях патентных заявок США № 2003/0133939, 2003/0118592 и 2005/0136049. CD123-связывающий белок может содержать в порядке от аминоконца до карбоксильного конца: первый связывающий домен, шарнирную область, и константную область иммуноглобулина. В других вариантах осуществления CD123-связывающий белок содержит белковый каркас, как правило, раскрытый, например, в публикации заявки на патент США № 2009/0148447. CD123-связывающий белок может включать в себя, в порядке от аминоконца до карбоксильного конца: константную область иммуноглобулина, шарнирную область и первый связывающий домен.

CD123-связывающие полипептиды и белки, раскрытые в данном документе, могут включать каркас мультиспецифического связывающего белка. Мультиспецифические связывающие белки и полипептиды с использованием каркасов раскрыты, например, в публикации заявки РСТ № WO 2007/146968, публикации заявки на патент США № 2006/0051844, публикации заявки РСТ № WO 2010/040105, публикации РСТ № WO 2010/003108, патенте США № 7166707 и патенте США № 8409577, каждый из которых полностью включен в данное описание посредством ссылки. CD123-связывающий белок может содержать два связывающих домена (домены могут быть предназначены для специфического связывания одной и

той же или разных мишеней), шарнирную область, линкер (например, карбокситерминальный или аминотерминальный линкер) и константный регион иммуноглобулина. CD123-связывающий белок может представлять собой гомодимерный белок, содержащий два идентичных дисульфид-связанных полипептида.

В одном варианте осуществления изобретения CD123-связывающий белок содержит, по порядку от аминоконца до карбоксильного конца, первый связывающий домен, шарнирную область, константную область иммуноглобулина и второй связывающий домен. Фиг. 11 иллюстрирует CD123-связывающий белок в этой конфигурации.

Как используется в данном документе термин "соединяющие аминокислоты" или "соединяющие аминокислотные остатки" относится к одному или нескольким (например, около 2-10) аминокислотным остаткам между двумя соседними областями или доменами полипептида, такими как между шарниром и смежной константной областью иммуноглобулина или между шарниром и соседним связывающим доменом или между пептидным линкером и соседним варибельным доменом иммуноглобулина или смежной константной областью иммуноглобулина. Соединяющие аминокислоты могут быть результатом проектирования конструктора полипептида (например, аминокислотные остатки, полученные в результате использования сайта рестрикционного фермента во время конструирования молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид).

Как используется в данном документе термин "нуждающийся пациент" или "нуждающийся субъект" относится к пациенту, подверженному риску заболевания или расстройства или состояния, которое поддается лечению или улучшению с помощью белка или полипептида, связывающегося с CD123. или их композиции, представленных в данном документе. Пациентом, нуждающимся в лечении, может быть, например, пациент, у которого диагностировано заболевание, связанное с экспрессией CD123, такое как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), В-лимфолейкоз, новообразования из бластных плазматоидных дендритных клеток (ОБПДК), волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ), хронический миелолейкоз и лимфома Ходжкина.

Как используется в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным веществам и композициям, которые обычно не вызывают аллергических или других серьезных побочных реакций при введении с использованием путей, хорошо известных в данной области. Молекулярные объекты и композиции, одобренные регулирующим органом Федерального правительства или правительства штата или перечисленные в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения на животных, и, в частности, на людях, считаются "фармацевтически приемлемыми".

Как используется в данном документе термин "промотор" относится к области ДНК, вовлеченной в связывание РНК-полимеразы для инициации транскрипции.

Используемые в данном документе термины "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид" относятся к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Если конкретно не ограничено, указанные термины охватывают нуклеиновые кислоты, содержащие аналоги природно нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными с эталонной нуклеиновой кислотой, и метаболизируются способом, подобным встречающимся в природе нуклеотидам. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты (например, вырожденные замены кодона) и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, вырожденные замены кодонов могут быть достигнуты путем генерирования последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzet et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; Cassol et al. (1992); Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98). Термин нуклеиновая кислота используется взаимозаменяемо с терминами ген, кДНК и мРНК, кодируемых геном. Используемые в данном документе термины "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид" предназначены для включения молекул ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), молекул РНК (например, мРНК), аналогов ДНК или РНК, сгенерированных с использованием нуклеотидных аналогов и их производных, фрагментов и гомологов.

Термин "экспрессия" относится к биосинтезу продукта, кодируемого нуклеиновой кислотой. Например, в случае сегмента нуклеиновой кислоты, кодирующего полипептид, представляющий интерес, экспрессия включает транскрипцию сегмента нуклеиновой кислоты в мРНК и трансляцию мРНК в один или несколько полипептидов.

Термины "единица экспрессии" и "кассета экспрессии" используются в данном документе взаимозаменяемо и обозначают сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид, представляющий интерес, и способный обеспечивать экспрессию сегмента нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Единица экспрессии обычно содержит промотор транскрипции, открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, представляющий интерес, и терминатор транскрипции, все в работоспособной конфигурации. Помимо транскрипционного промотора и терминатора, экспрессионная единица может дополнительно включать другие сегменты нуклеиновой кислоты, такие как, например, энхансер или сигнал полиадени-

лирования.

Как используется в данном документе термин "вектор экспрессии" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, линейной или циркулярной, содержащей одну или несколько единиц экспрессии. В дополнение к одной или нескольким единицам экспрессии вектор экспрессии может также включать дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты, такие как, например, один или несколько точек начала репликации или один или несколько маркеров, пригодных для селекции. Векторы экспрессии обычно происходят от плазмидной или вирусной ДНК или могут содержать элементы обоих.

Как используется в данном документе термин "идентичность последовательности" относится к взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными последовательностями или между двумя или более полипептидными последовательностями. Когда положение в одной последовательности занята тем же основанием нуклеиновой кислоты или аминокислотным остатком в соответствующем положении сравниваемой последовательности, говорят, что последовательности "идентичны" в этом положении. Процент "идентичности последовательности" рассчитывается путем определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, чтобы получить число "идентичных" положений. Количество "идентичных" положений затем делится на общее количество положений в окне сравнения и умножается на 100, чтобы получить процент "идентичности последовательности". Процент "идентичности последовательности" определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения. Окно сравнения для последовательностей нуклеиновых кислот может составлять, например, по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 или более нуклеиновых кислот в длину. Окно сравнения для полипептидных последовательностей может быть, например, по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300 или более аминокислот в длину. Чтобы оптимально выровнять последовательности для сравнения, часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции, называемые пробелами, в то время как эталонная последовательность поддерживается постоянной. Оптимальное выравнивание - это такое выравнивание, которое, даже с пропусками, создает максимально возможное количество "идентичных" положений между эталонной последовательностью и последовательностью сравнения. Процент "идентичности последовательностей" между двумя последовательностями можно определить с помощью версии программы "Последовательности BLAST 2", которая была доступна в Национальном центре биотехнологической информации по состоянию на 1 сентября 2004 г., и эта программа включает программы BLASTN (для сравнения нуклеотидных последовательностей) и BLASTP (для сравнения полипептидных последовательностей), программы которых основаны на алгоритме Karlin и Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12):5873-5877, 1993). При использовании "Последовательности BLAST 2" параметры, которые были параметрами по умолчанию на 1 сентября 2004 г., могут использоваться для размера слова (3), поправки на открытый пробел (11), поправки на пробел расширения (1), спада пробела (50), ожидаемое значение (10) и любого другого обязательного параметра, включая, но не ограничиваясь, опцию матрикса. Считается, что две нуклеотидные или аминокислотные последовательности имеют "по существу сходную идентичность последовательности" или "существенную идентичность последовательности", если две последовательности имеют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности относительно друг друга.

Как используется в данном документе термин "полипептид" или "полипептидная цепь" обозначает единое, линейное и непрерывное расположение ковалентно связанных аминокислот. Полипептиды могут иметь или образовывать одну или несколько внутрицепочечных дисульфидных связей. Что касается полипептидов, как описано в данном документе, ссылка на аминокислотные остатки, соответствующие остаткам, указанным в SEQ ID NO, включает посттрансляционные модификации таких остатков.

Как используется в данном документе термин "CD123-связывающий белок" может использоваться взаимозаменяемо с "полипептидом, связывающим CD123", "полипептидом" и "рекомбинантным полипептидом". Такие молекулы специфически связываются с CD123 (например, человеческим CD123), также известным как кластер дифференцировки 123, альфа-цепь рецептора интерлейкина-3 и IL3RA. CD123 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I с внеклеточным доменом, включающим предсказанный Ig-подобный домен и два домена FnIII. CD123-связывающие белки раскрытия связываются с внеклеточным доменом CD123. Термин "CD123" может относиться к любой изоформе CD123. Иллюстративные нуклеотидные и аминокислотные последовательности CD123 человека представлены в SEQ ID NO: 205 и 206 и SEQ ID NO: 207 и 208 соответственно. CD123 связывается с бета-цепью рецептора интерлейкина-3 с образованием указанного рецептора.

"Белок" представляет собой макромолекулу, содержащую одну или несколько полипептидных цепей. Белок также может содержать непептидные компоненты, такие как углеводные группы. Углеводы и другие непептидные заместители могут быть добавлены к белку клеткой, в которой производится белок, и будут варьироваться в зависимости от типа клетки. Белки определены в данном документе в терминах их аминокислотных каркасных структур; заместители, такие как углеводные группы, обычно не указаны,

но, тем не менее, могут присутствовать. Белок может быть антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления белок также может представлять собой молекулу scFv-Fc-scFv, димер scFv-scFv или диатело.

Термины "аминотерминальный" и "карбокситерминальный" используются в данном документе для обозначения положений в полипептидах. Где позволяет контекст, эти термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости или относительно-го положения. Например, определенная последовательность, расположенная по направлению к карбоксильному концу относительно контрольной последовательности в полипептиде, расположена проксимально к карбоксильному концу контрольной последовательности, но необязательно находится на карбоксильном конце полного полипептида.

"Т-клеточный рецептор" (ТКР) представляет собой молекулу, расположенную на поверхности Т-клеток, которая наряду с CD3, как правило, ответственна за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Он состоит из дисульфид-связанного гетеродимера сильно изменяющихся α - и β -цепей в большинстве Т-клеток. В других Т-клетках экспрессируется альтернативный рецептор, состоящий из варьируемых γ и δ цепей. Каждая цепь ТКР является членом суперсемейства иммуноглобулинов и обладает одним N-концевым варьируемым доменом иммуноглобулина, одним константным доменом иммуноглобулина, трансмембранной областью и коротким цитоплазматическим хвостом на C-терминальном конце (см. Abbas and Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (5th Ed.), Editor: Saunders, Philadelphia, 2003; Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th Ed, Current Biology Publications, p148, 149 и 172, 1999). ТКР, как используется в данном описании, может быть от различных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

Термин "ТКР комплекс" в контексте данного описания относится к комплексу, образованному в результате ассоциации цепей CD3 с другими цепями ТКР. Например, ТКР комплекс может состоять из CD3 γ CD3 γ цепи, CD3 δ CD3 δ цепи, двух CD3 ϵ CD3 ϵ цепей, гомодимера CD3 ζ , цепей, цепи ТКР α и цепи ТКР β . Альтернативно, ТКР комплекс может состоять из CD3 γ - цепи CD3 γ , CD3 δ - CD3 δ -цепи, двух CD3 ϵ -CD3 ϵ - цепей, гомодимера CD3 ζ , - цепей, цепи ТКР $\gamma\gamma$ и цепи ТКР δ .

"Компонент ТКР комплекса", используемый в данном документе, относится к цепи ТКР (то есть ТКР α , ТКР β , ТКР $\gamma\gamma$ или ТКР δ), цепи CD3 (то есть CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 ζ) или комплексу, образованному двумя или более цепями ТКР или цепями CD3 (например, комплекс ТКР α и ТКР β , комплекс ТКР γ и ТКР δ , комплекс CD3 ϵ и CD3 δ , комплекс CD3 γ и CD3 ϵ или комплекс суб-ТКР ТКР α , ТКР β , CD3 γ , CD3 δ и две цепи CD3 ϵ).

Термин "антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" и "АЗКЦ", используемые в данном описании, относятся к клеточно-опосредуемому процессу, в котором неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc- γ R (например, моноцитарные клетки, такие как клетки естественные киллеры (NK - Natural Killer) и макрофаги), распознают связанное антитело (или другой белок, способный связываться с Fc γ R) на клетке - мишени и впоследствии вызывают лизис клетки - мишени. В принципе, любые эффекторные клетки с активирующим Fc γ R могут быть индуцированы в качестве посредника АЗКЦ. Первичными клетками для опосредования АЗКЦ, являются NK - клетки, которые экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты, в зависимости от их состояния активации, локализации, или дифференциации, могут экспрессировать Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Для обзора по экспрессии Fc γ R на гемопоэтических клетках, см., например, Ravetch et al., 1991, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92.

Термин "обладающий АЗКЦ активностью", используемый в данном документе в отношении полипептида или белка, означает, что полипептид или белок (например, тот, который содержит шарнирную область иммуноглобулина и константную область иммуноглобулина, имеющую CH2 и CH3-домены, такие как происходящие от IgG (например, IgG1)), способны опосредовать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), через связывание цитолитического Fc-рецептора (например, Fc γ RIII) на цитолитической иммунной эффекторной клетке, экспрессирующей Fc-рецептор (например, NK-клетка).

"Комплементзависимая цитотоксичность" и "CDC" в контексте данного описания относятся к процессу, в котором компоненты в нормальной сыворотке ("комплемент") вместе с антителом или другим C1q-комплементсвязывающим белком, связанным с антигеном-мишенью, демонстрируют лизис клетки-мишени, экспрессирующей антиген-мишень. Комплемент состоит из группы сывороточных белков, которые действуют согласованно и в упорядоченной последовательности, чтоб оказывать определённое действие.

Используемые в данном документе термины "классический путь комплемента" и "классическая система комплемента" являются синонимами и относятся к конкретному пути активации комплемента. Классический путь требует комплексов антиген-антитело для инициации и включает упорядоченную активацию девяти основных белковых компонентов, обозначенных от C1 до C9. На нескольких этапах процесса активации продукт представляет собой фермент, который катализирует последующую стадию. Этот каскад обеспечивает усиление и активацию большого количества комплемента относительно не-

большим начальным сигналом.

Термин "обладающий активностью CDC", используемый в данном документе в отношении полипептида или белка, означает, что полипептид или белок (например, тот, который содержит шарнирную область иммуноглобулина и константную область иммуноглобулина, имеющую CH2 и CH3-домены, такие как происходящие от IgG (например, IgG1)) способен опосредовать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) посредством связывания белка комплемента C1q и активации классической системы комплемента. В одном варианте осуществления изобретения рекомбинантный полипептид был модифицирован для уменьшения активности CDC.

Термины "перенаправленная цитотоксичность Т-клеток" и "RTCC" в контексте данного описания относятся к процессу, опосредованному Т-клетками, в котором цитотоксические Т-клетки рекрутируются к клетке-мишени с использованием мультиспецифического белка, который способен специфически связывать, как цитотоксическую Т-клетку, так и клетку-мишень, и, таким образом, зависимый от мишени цитотоксический ответ Т-клетки вызывается против клетки-мишени. Полипептиды и белки, содержащие анти-CD123 и анти-CD3-связывающие домены, как описано в данном документе, способны к RTCC.

Как используется в данном документе термин "лечение", "лечить" или "улучшение" относится либо к терапевтическому лечению, либо к профилактическому/превентивному лечению. Лечение является терапевтическим, если по меньшей мере один симптом заболевания у индивидуума, получающего лечение, улучшается или лечение может отсрочить ухудшение прогрессирующего заболевания у индивидуума или предотвратить возникновение дополнительных сопутствующих заболеваний.

Как используется в данном документе термин "терапевтически эффективное количество (или доза)" или "эффективное количество (или доза)" конкретной связывающей молекулы или соединения относится к такому количеству соединения, которое достаточно, чтобы привести к ослаблению одного или нескольких симптомов заболевания, которое лечат, статистически значимым образом или статистически значимое улучшение функции органов. Когда речь идет об отдельном активном ингредиенте, вводимом отдельно, терапевтически эффективная доза относится только к этому ингредиенту. Применительно к комбинации терапевтически эффективная доза относится к объединенным количествам активных ингредиентов, которые приводят к терапевтическому эффекту, вводятся ли они последовательно или одновременно (в одной и той же композиции или одновременно в отдельных композициях).

Как используется в данном документе термин "трансформация", "трансфекция" и "трансдукция" относятся к переносу нуклеиновой кислоты (то есть нуклеотидного полимера) в клетку. Как используется в данном документе термин "генетическая трансформация" относится к переносу и включению ДНК, особенно рекомбинантной ДНК, в клетку. Переносимая нуклеиновая кислота может быть введена в клетку посредством экспрессионного вектора.

Как используется в данном документе термин "вариант" или "варианты" относится к нуклеиновой кислоте или полипептиду, отличающимся от эталонной нуклеиновой кислоты или полипептида, но сохраняющим их существенные свойства. Как правило, варианты в целом очень похожи и во многих областях идентичны эталонной нуклеиновой кислоте или полипептиду. Например, вариант может демонстрировать по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности по сравнению с активной частью или полноразмерной эталонной нуклеиновой кислотой или полипептидом.

Термины "вариабельная область легкой цепи" (также называемая "вариабельный домен легкой цепи" или "VL" или V_L) и "вариабельная область тяжелой цепи" (также называемая "вариабельный домен тяжелой цепи" или "VH" или V_H) относится к вариабельной области связывания легкой и тяжелой цепи антитела, соответственно. Вариабельные области связывания состоят из дискретных, четко определенных подобластей, известных как "определяющие комплементарность области" (CDR) и "каркасные области" (FR), обычно составляющие порядок FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3 -FR4 от аминоконца до карбоксильного конца. В одном варианте осуществления FR являются гуманизированными. Термин "CL" относится к "константной области легкой цепи иммуноглобулина" или "константной области легкой цепи", то есть константной области легкой цепи антитела. Термин "CH" относится к "константной области тяжелой цепи иммуноглобулина" или "константной области тяжелой цепи", которая дополнительно делится в зависимости от изоформа антитела на CH1, CH2 и CH3-домены (IgA, IgD, IgG) или CH1, CH2, CH3 и CH4-домены (IgE, IgM). "Fab" (фрагмент, связывающий антиген) представляет собой часть антитела, которая связывается с антигенами и включает вариабельную область и CH1-домен тяжелой цепи, связанный с легкой цепью через межцепную дисульфидную связь.

Данное раскрытие описывает связывающие домены, которые специфически связывают CD123 (например, человеческий CD123), а также полипептиды и белки, содержащие эти связывающие домены. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающие белки и полипептиды содержат второй связывающий домен, который может связываться с CD123 или с другой мишенью. Эти полипептиды и белки, включающие связывающие домены этого изобретения могут дополнительно содержать константные области иммуноглобулина, линкерные пептиды, шарнирную область, домены димериза-

ци/гетеродимеризации иммуноглобулинов, соединительные аминокислоты, тэги и т.д. Эти компоненты раскрытых полипептидов и белков более подробно описаны ниже.

Кроме того, CD123-связывающие полипептиды и белки, раскрытые в данном документе, могут быть в форме антитела или слитого белка любого из множества различных форматов (например, слитый белок может быть в форме CD123-связывающей биспецифической или мультиспецифической молекулы). Неограничивающие примеры биспецифических молекул включают молекулу scFv-Fc-scFv. Некоторые биспецифические молекулы содержат или состоят из scFv анти-CD123, связанного со вторым связывающим доменом scFv, и не включают другие последовательности, такие как константная область иммуноглобулина. В других вариантах осуществления CD123-связывающий белок представляет собой диатело.

CD123-связывающий белок в соответствии с данным раскрытием обычно включает по меньшей мере одну CD123-связывающую полипептидную цепь, содержащую: (а) CD123-связывающий домен, как изложено в данном документе. В некоторых вариантах полипептид, связывающий CD123, дополнительно включает (b) карбоксильный конец шарнирной области к CD123-связывающему домену и (с) константную область иммуноглобулина. В дополнительных вариантах полипептид, связывающий CD123, дополнительно включает (d) карбокситерминальный линкер, который является карбокситерминальным по отношению к константной области иммуноглобулина, и (е) второй связывающий домен карбокситерминальный по отношению к карбокси-терминальному линкеру.

В еще других вариантах полипептид, связывающий CD123 содержит (b) шарнирную область, которая является аминокислотной по отношению к CD123-связывающему домену и (с) субобласть иммуноглобулина, которая является аминокислотной по отношению к шарнирной области.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полипептиды способны к гомодимеризации, обычно посредством дисульфидной связи, через константную область иммуноглобулина и/или шарнирную область (например, через константную область иммуноглобулина, содержащую CH2 и CH3-домены IgG и шарнирную область IgG). Таким образом, в определенных вариантах осуществления данного раскрытия два идентичных одноцепочечных CD123-связывающих полипептида гомодимеризуются с образованием димерного CD123-связывающего белка. Пример гомодимера по данному изобретению представлен на фиг. 11.

В других вариантах осуществления полипептид, связывающий CD123, включает домен гетеродимеризации, который способен гетеродимеризоваться с другим гетеродимеризационным доменом во второй неидентичной полипептидной цепи. В определенных вариантах вторая полипептидная цепь для гетеродимеризации включает второй связывающий домен. Соответственно, в определенных вариантах осуществления данного раскрытия две неидентичные полипептидные цепи, одна из которых содержит CD123-связывающий домен, а вторая, необязательно, включает второй связывающий домен, димеризуются с образованием гетеродимерного CD123-связывающего белка. Примеры типов гетеродимеров включают те, которые описаны в публикации заявки на патент США № 2013/0095097 и US 2013/0129723.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен, белок или полипептид конъюгируют с лекарственным средством или токсическим фрагментом.

CD123-связывающие полипептиды, белки и их различные компоненты, используемые в терапевтических средствах по данному изобретению, дополнительно описаны ниже.

Как указано выше, данное раскрытие относится к связывающим доменам, которые специфически связывают CD123. В некоторых вариантах CD123-связывающий домен способен конкурировать за связывание с CD123 с антителом, имеющим области V_L и V_H , имеющие аминокислотные последовательности, продемонстрированные в SEQ ID NO: 194 и SEQ ID NO: 196 соответственно (например, 12F1). Мышиное анти-CD123-антитело 12F1 описано, например, в публикации заявки на патент США № 2013/041739 и Kuo et al. (2012) Protein Eng Design Select, p 1-9.

CD123-связывающий домен может содержать последовательности, продемонстрированные в табл. 3, а некоторые соответствующие SEQ ID NO суммированы в табл. 6. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит (i) переменную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина, содержащую CDR L1, L2 и L3, и (ii) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR H1, H2, и H3 с H1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, с H2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и с H3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит (i) переменную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR L1, L2 и L3, и (ii) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR H1, H2 и H3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) L1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 6 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) L2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) L3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, которая от-

личается от SEQ ID NO: 10 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 12 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 14 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 16 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела. Например, данное изобретение включает рекомбинантный полипептид, содержащий: (i) LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 6 одной или двумя аминокислотными заменами; (ii) LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 одной или двумя аминокислотными заменами; (iii) LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 10 одной или двумя аминокислотными заменами; (iv) HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 12 одной или двумя аминокислотными заменами; (v) HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 14 одной или двумя аминокислотными заменами; и (vi) HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 16 одной или двумя аминокислотными заменами. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой.

В родственных вариантах осуществления рекомбинантный полипептид по данному изобретению содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5% или 100% идентичны аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 2) или переменной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 4), или обем. В одном варианте осуществления CD123-связывающий домен рекомбинантного полипептида представляет собой scFv, содержащий переменную тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4, и переменную легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 2, в ориентации VHVL. В другом варианте осуществления CD123-связывающий домен рекомбинантного полипептида представляет собой scFv, содержащий переменную легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 2, и переменную тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4, в ориентации VLVH. Например, в определенных вариантах осуществления полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132. Данное изобретение включает рекомбинантный полипептид, который имеет по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5% или 100% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит: (i) переменную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 22 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 24 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 26 по меньшей

мере одной аминокислотной заменой; (ii) LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 24 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 26 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 44 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 46 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 48 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела.

В родственных вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5%, или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 18) или вариабельной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 42), или и той и другой.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 22 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 24 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 26 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 100 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 102, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 102 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 104, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 104 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела.

В родственных вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5%, или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 18) или вариабельной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 98), или и той и другой.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит: (i) вариабельную об-

ласть легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 22 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 24 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 26 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 116, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 116 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 118, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 118 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 120, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 120, по меньшей мере, одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела.

В родственных вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5%, или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 18) или вариабельной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 114), или и той и другой.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 22 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 24 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 26 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 124, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 124 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 126, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 126 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 128, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 128 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела.

В родственных вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по

меньшей мере примерно на 99,5%, или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 18) или вариабельной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 122), или и той и другой.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 54 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 56 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 58 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 60 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 62 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 64 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела.

В родственных вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5% или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 50) или вариабельной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 52), или и той и другой.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 70 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 72 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 74 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 76 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 78 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 80, по меньшей мере, одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела.

В родственных вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на

85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5% или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 66) или вариабельной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 68), или и той и другой.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (V_L), содержащую CDR L1, L2 и L3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), содержащую CDR H1, H2 и H3. В некоторых таких вариантах осуществления (i) L1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 86 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (ii) L2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 88 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iii) L3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 90 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (iv) H1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 92 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; (v) H2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 94 по меньшей мере одной аминокислотной заменой; и (vi) H3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 96, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 96 по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Описанная выше аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной аминокислотной заменой. В некоторых вариантах осуществления L1, L2, L3, H1, H2 и/или H3 отличаются от указанной последовательности на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CDR по данному раскрытию содержит около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, около одной или нескольких (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с последовательностью CDR известного моноклонального антитела.

В родственных вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 88%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 99,5% или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (V_L) (например, SEQ ID NO: 82) или вариабельной области тяжелой цепи (V_H) (например, SEQ ID NO: 84), или и той и другой.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит гуманизованные области V_L и/или V_H иммуноглобулина. Способы гуманизации областей V_L и V_H иммуноглобулина известны в данной области и обсуждаются, например, в публикации заявки на патент США № 2006/0153837. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий домен содержит области V_L и/или V_H иммуноглобулина человека.

Ожидается, что "гуманизация" приведет к антителу, которое будет менее иммуногенным с полным сохранением антигенсвязывающих свойств исходной молекулы. Чтобы сохранить все антигенсвязывающие свойства исходного антитела, структура его антигенсвязывающего сайта должна быть воспроизведена в "гуманизованной" версии. Этого можно достичь, прививая только нечеловеческие CDR на человеческие вариабельные каркасные домены и константные области с сохранением или без сохранения критических каркасных остатков (Jones et al., Nature 321: 522 (1986); Verhoeven et al., Science 239: 1539 (1988)) или путем рекомбинации целых нечеловеческих вариабельных доменов (для сохранения лигандсвязывающих свойств), но "маскирования" их человеческой поверхностью путем разумной замены экспонированных остатков (для снижения антигенности) (Padlan, Molec. Immunol. 28:489 (1991)).

По сути, гуманизация с помощью прививки CDR включает рекомбинацию только CDR нечеловеческого антитела в каркас вариабельной области человека и константную область человека. Теоретически это должно существенно снизить или устранить иммуногенность (за исключением случаев, когда существуют аллотипические или идиотипические различия). Однако ранее сообщалось, что некоторые каркасные остатки исходного антитела также могут нуждаться в сохранении (Reichmann et al., Nature, 332: 323 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10,029 (1989)).

Остатки каркаса, которые необходимо сохранить, поддаются идентификации с помощью компьютерного моделирования. Альтернативно, критические каркасные остатки могут быть потенциально иден-

тифицированы путем сравнения известных структур антигенсвязывающих сайтов (Padlan, Molec. Immunol, 31 (3): 169-217 (1994), включена в данный документ посредством ссылки).

Остатки, которые потенциально влияют на связывание антигена, делятся на несколько групп. Первая группа включает остатки, которые соприкасаются с поверхностью сайта антигена, которые, следовательно, могут вступать в прямой контакт с антигенами. Эти остатки включают аминоконцевые остатки и те, которые примыкают к CDR. Вторая группа включает в себя остатки, которые могут изменить структуру или относительное выравнивание CDR либо путем контакта с CDR, либо с другой пептидной цепью в антителе. Третья группа включает аминокислоты со скрытыми боковыми цепями, которые могут влиять на структурную целостность переменных доменов. Остатки в этих группах обычно находятся в одних и тех же положениях (Padlan, 1994, выше), хотя их идентифицированные положения могут различаться в зависимости от системы нумерации (см. Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Pub. No. 91-3242, U. S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991).

Знания о гуманизированных антителах в данной области техники применимы к полипептидам согласно раскрытию, даже если эти полипептиды не являются антителами.

В некоторых вариантах осуществления данное раскрытие относится к CD123-связывающим доменам, причем (i) переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, и переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; (ii) переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, и переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20; (iii) переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, и переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34; (iv) переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, и переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42; (v) переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50, и переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52; (vi) переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66, и переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68; (vii) переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на

97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 82, и вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 84; (viii) вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, и вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 122; (ix) вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, и вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 106; или (xi) вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, и вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95% при по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 114.

В других вариантах осуществления каждый CDR содержит не более одной, двух или трех замен, вставок или делеций по сравнению с моноклональным антителом или его фрагментом или производным, которое специфически связывается с представляющей интерес мишенью (например, CD123).

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий белок может содержать один или несколько дополнительных связывающих доменов (например, второй связывающий домен), которые связывают мишень, отличную от CD123. Эти другие связывающие домены могут содержать, например, конкретный цитокин или молекулу, которая нацеливает полипептид с указанным связывающим доменом на определенный тип клеток, токсин, дополнительный рецептор клетки, антитело и т.д.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающая молекула или белок может содержать Т-клеточный связывающий домен для рекрутирования Т-клеток для нацеливания на клетки, экспрессирующие CD123. В определенных вариантах осуществления CD123-связывающий белок, как описано в данном документе, может включать (i) связывающий домен, который специфически связывает ТКР комплекс или его компонент (например, ТКР α , ТКР β , CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ) и (ii) другой связывающий домен, который специфически связывается с CD123. CD123-связывающий белок может использовать по существу любой связывающий домен, который связывается с Т-клеткой, например связывающий домен, происходящий из антитела. Иллюстративные антитела анти-CD3, из которых может быть получен CD3-связывающий домен, включают моноклональное антитело CRIS-7 (Reinherz, EL et al. (Eds.), Leukocyte typing II, Springer Verlag, New York, (1986); V_L и V_H последовательности аминокислот, соответственно, продемонстрированы в SEQ ID NO: 209:

(QVVLTSQPAIMSAFPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDSSKLGASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISMETEDAATYYCQQWSRNPPTFGGGTKLQITR) и SEQ ID NO: 210 (QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRSTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSAY-TNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASPQVHYDYNQFPYWGQGLTVSA)); HuM291 (Chau et al. (2001) Transplantation 71:941-950; V_L и V_H аминокислотные последовательности, соответственно, продемонстрированы в SEQ ID NO: 211:

(DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLGASGVPARFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIK) и SEQ ID NO: 212

(QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGY-THYNQKCLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGLTVSS)); моноклональное антитело BC3 (Anasetti et al. (1990) J. Exp. Med. 172: 1691); моноклональное антитело OKT3 (Ortho multienter Transplant Study Group (1985) N. Engl. J. Med. 313: 337) и его производные, такие как OKT3 ala-ala (также называемое OKT3 AA-FL или OKT3 FL), гуманизированный вариант Fc с заменами аланина в положениях 234 и 235 (Herold et al. (2003) J. Clin. Invest. 11:409)); висилизумаб (Carpenter et al. (2002) Blood 99: 2712), моноклональное антитело G19-4 (Ledbetter et al., 1986, J. Immunol. 136: 3945), моноклональное антитело 145-2C11 (Hirsch et al. (1988) J. Immunol. 140: 3766) и моноклональное антитело I2C (см., например, US 2011/0293619 и US 20120244162). Например, CD3-связывающий домен может содержать CD3-связывающий домен, раскрытый в публикации заявки на патент США № 2012/0244162, включая CD3-связывающий домен, содержащий область VL, выбранную из SEQ ID NO: 17, 21, 35, 39, 53, 57, 71, 75, 89, 83, 107, 111, 125, 129, 143, 147, 161, 165, 179 и 183 US 2012/0244162 и/или область VH, выбранную из SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 и 181 US 2012/0244162. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151., 167, 169, 185 и 187 из патента США 2012/0244162. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен представляет собой домен, описанный в WO 2004/106380, WO 2005/040220A1, US 2014/0099318 или полученный из его CD3-связывающего домена. Иллюстративным антителом против ТКР является моноклональное антитело BMA031 (Borst et al. (1990) Human Immunology 29:175-188). CD3-связывающий домен может быть получен из любого из антител или последовательностей, описанных в WO 2013/158856 (полностью включено в данное описание посредством ссылки). В некоторых вариантах второй CD123-связывающий домен-связывающего полипептида, описанный в данном документе, содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2, и HCDR3, причем (a) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 162, 163 и 164 соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 165, 166 и 167 соответственно; или (b) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169 и SEQ ID NO: 170, соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности указанные в SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 173 соответственно. В других аспектах второй CD123-связывающий домен-связывающего полипептида, описанный в данном документе, включает: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2, и HCDR3, причем (a) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 171, 172 и 173, соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 174, 175 и 176 соответственно; или (b) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 179, 180 и 181 соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй CD123-связывающий домен-связывающего полипептида, описанный в данном документе, содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2, и HCDR3, причем (a) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 182, 183 и 184 соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 185, 186 и 187 соответственно; или (b) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 188, 189 и 190, соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 191, 192 и 193 соответственно. В некоторых аспектах вторые связывающие домены, содержащие последовательности CDR, указанные в этом параграфе, являются гуманизированными.

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающего белка, включающего второй связывающий домен, который специфически связывает CD3ε, второй связывающий домен конкурирует за связывание с CD3ε с моноклональным антителом CRIS-7, HuM291 или I2C. В некоторых вариантах CD3-связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (V_L) иммуноглобулина и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), полученную из моноклонального антитела CRIS-7, HuM291 или I2C (например, V_L и V_H второго связывающего домена могут представлять собой гуманизированные вариабельные области, включающие, соответственно, CDR легкой цепи и CDR тяжелой цепи моноклонального антитела). Второй связывающий домен может содержать вариабельную область легкой цепи, вариабельную область тяжелой цепи или оба из CD3-связывающих доменов DRA222, TSC455 или TSC456. Аминокислотные последовательности DRA222, TSC455 и TSC456 представлены в табл. 3. Связывающие домены DRA222 также описаны в WO 2013/158856. TSC455 также может упоминаться как

TSC394 F87Y. TSC455 также может упоминаться как TSC394 E86D F87Y или TSC394 DY. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен специфически связывает CD3 и содержит переменную область легкой цепи иммуноглобулина и переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина; причем переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 93% идентична, по меньшей мере примерно на 95% идентична, по меньшей мере примерно на 97% идентична, по меньшей мере примерно на 98% идентична или по меньшей мере примерно, на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 157 или по меньшей мере примерно на 94% идентична, по меньшей мере примерно на 95% идентична, по меньшей мере примерно на 97% идентична, по меньшей мере примерно на 98% идентична или по меньшей мере примерно, на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 158; и причем переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 82% идентична, по меньшей мере примерно на 85% идентична, по меньшей мере примерно на 87% идентична, по меньшей мере примерно, на 90% идентична, по меньшей мере примерно на 92% идентична, по меньшей мере примерно на 95% идентична, по меньшей мере примерно на 97% идентична, по меньшей мере примерно на 98% идентична или по меньшей мере примерно на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 159. В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий CD123 или белок, дополнительно содержащий CD3-связывающий домен, может иметь низкий уровень высокомолекулярных агрегатов, продуцируемых во время рекомбинантной экспрессии полипептида или белка, полипептид, связывающий CD123 или белок, дополнительно содержащий CD3-связывающий домен может иметь относительно длинную стабильность в сыворотке человека, в зависимости от CD3-связывающего домена, присутствующего в полипептиде или белке.

В некоторых вариантах осуществления второй CD123-связывающий домен-связывающего полипептида, описанный в данном документе, представляет собой CD3-связывающий домен и содержит одну или несколько CD3-связывающих последовательностей (например, CDR или переменных областей), раскрытых в патенте США 2013/0129730, патенте США 2011/0293619, патенте США 7635472, WO 2010/037836, WO 2004/106381 или WO 2011/121110; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен содержит одну или несколько из следующих последовательностей:

LCDR1	LCDR2	LCDR3
GSSTGAVTSGYYPN (SEQ ID NO:289)	GTKFLAP (SEQ ID NO:292)	ALWYSNRWV (SEQ ID NO:295)
RSSTGAVTSGYYPN (SEQ ID NO:290)	ATDMRPS (SEQ ID NO:293)	ALWYSNRWV (SEQ ID NO:296)
GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:291)	GTKFLAP (SEQ ID NO:294)	VLWYSNRWV (SEQ ID NO:297)

В различных вариантах осуществления CD3-связывающий домен содержит одну или несколько из следующих последовательностей:

HCDR1	HCDR2	HCDR3
IYAMN (SEQ ID NO:298)	RIRSKYNNYATYYADSVKS (SEQ ID NO:301)	HGNFGNSYVSFFAY (SEQ ID NO:304)
KYAMN (SEQ ID NO:299)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:302)	HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:305)
SYAMN (SEQ ID NO:300)	RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO:303)	HGNFGNSYLSFWAY (SEQ ID NO:306)

В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий CD123, используемый в описанных в данном документе способах и композициях, представляет собой биспецифическую одноцепочечную молекулу, содержащую CD123-связывающий домен и CD3-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления CD123- и/или CD3- связывающий домен происходит из антитела и содержит переменную тяжелую цепь (V_H) и переменную легкую цепь (V_L). Например, scFv содержит V_H и V_L . Эти связывающие домены и переменные цепи могут быть расположены в любом порядке, который все еще сохраняет некоторую связывающую активность с мишенью(ями). Например, переменные домены могут быть расположены в таком порядке, как V_H CD123- V_L CD123- V_H CD3- V_L CD3; V_L CD123- V_H CD123- V_H CD3- V_L CD3; V_H CD123- V_L CD123- V_L CD3- V_H CD3; V_L CD123- V_H CD123- V_L CD3- V_H CD3; V_H CD3- V_L CD3- V_H CD123- V_L CD123; V_L CD3- V_H CD3- V_L CD123- V_H CD123; V_H CD3- V_L CD3- V_L CD123- V_H CD123; или V_L CD3- V_H CD3- V_H CD123- V_L CD123. Пары V_H -областей и V_L -областей в связывающем домене, связывающемся с CD3, могут быть в формате одноцепочечного антитела (scFv). области V_H и V_L могут быть расположены в порядке V_H - V_L или V_L - V_H . В некоторых вариантах осуществления scFv может связываться с CD123 более эффективно, чем антитело, содержащее

одинаковые последовательности областей VH и VL в одинаковой ориентации. В определенных вариантах осуществления scFv может более эффективно связываться с CD123 в ориентации VL-VH, чем в ориентации VH-VL, или наоборот (см., например, Пример 2). VH-область может быть расположена на N-конце относительно последовательности линкера. Область VL может быть расположена на C-конце относительно последовательности линкера. Расположение доменов в CD3-связывающем домене биспецифической одноцепочечной молекулы может быть VH-VL, причем указанный CD3-связывающий домен расположен на C-конце относительно CD123-связывающего домена. Биспецифическая молекула может содержать scFv-связывающийся с CD123, соединенный с scFv связывающим CD3. Эти scFv могут быть связаны коротким пептидом. В некоторых вариантах осуществления биспецифические одноцепочечные молекулы не содержат шарнирную область или константную область (см., например, US 2013/0295121, WO 2010/037836, WO 2004/106381 и WO 2011/121110; каждая из них включена в данный документ посредством ссылки во всей их полноте).

В некоторых вариантах осуществления связывающий домен представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), который содержит области V_H и V_L, специфичные для мишени представляющей интерес. В некоторых вариантах осуществления области V_H и V_L являются человеческими или гуманизированными.

В некоторых вариантах связывающий домен представляет собой одноцепочечный Fv(scFv), содержащий области V_L и V_H иммуноглобулина, соединенные пептидным линкером. Использование пептидных линкеров для соединения областей V_L и V_H хорошо известно в данной области, и в этой конкретной области существует большое количество публикаций. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой 15-член, состоящий из трех повторов аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Gly-Ser ((Gly₄ Ser)₃) (SEQ ID NO: 213). Были использованы другие линкеры и технология фагового дисплея, а также технология селективного инфекционного фага (selective infective phage technology) была использована для диверсификации и выбора подходящих линкерных последовательностей (Tang et al., J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Hennecke et al., Protein Eng. 11, 405-410, 1998). В некоторых вариантах осуществления области V_L и V_H соединены пептидным линкером, имеющим аминокислотную последовательность, содержащую формулу (Gly₄ Ser)_n, причем n = 1-5 (SEQ ID NO: 214). Другие подходящие линкеры могут быть получены путем оптимизации простого линкера (например, (Gly₄ Ser)_n) (SEQ ID NO: 315) посредством случайного мутагенеза.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, связывающий CD123 содержит, по порядку от amino-конца до карбоксильного конца (или в порядке от карбоксильного конца до aminoконца), (i) CD123-связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокситерминальный линкер (или линкер aminoконца) и (v) второй связывающий домен. Как используется в данном документе в контексте полипептидной конструкции, содержащей первый связывающий домен и второй связывающий домен, "шарнирная область" или "шарнир" относится к полипептидной области между первым связывающим доменом и Fc-областью. "Карбокситерминальный линкер" или "аминотерминальный линкер" относится к полипептидной области между Fc-областью и вторым связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления карбокси-терминальный линкер (или аминотерминальный линкер) включает или состоит из SEQ ID NO: 248. В некоторых вариантах осуществления шарнир представляет собой шарнирную область иммуноглобулина человека дикого типа. В некоторых других вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков могут быть добавлены на amino- или карбоксильном конце шарнирной области иммуноглобулина дикого типа как часть конструкции слитого белка. Например, дополнительные аминокислотные остатки соединения на aminoконце шарнира могут быть "RT", "RSS", "TG" или "T", или на карбоксильном конце шарнира может быть "SG", или удаление шарнира может быть совмещено с добавлением, таким как AP с "SG", добавленным на карбоксильном конце.

В некоторых вариантах осуществления шарнир, карбокситерминальный линкер или аминотерминальный линкер представляют собой измененный шарнир иммуноглобулина, в котором один или несколько остатков цистеина в шарнирной области иммуноглобулина дикого типа замещены одним или несколькими другими аминокислотными остатками (например, серином или аланином).

Иллюстративные измененные шарниры иммуноглобулина, карбокситерминальные линкеры и аминотерминальные линкеры включают в себя шарнирную область иммуноглобулина человеческого IgG1, имеющую один, два или три остатка цистеина, которые присутствуют в шарнире человеческого IgG1 дикого типа, замещенные одним, двумя или тремя различными аминокислотными остатками (например, серином или аланином). Измененный иммуноглобулиновый шарнир может дополнительно содержать пролин, замещенный другой аминокислотой (например, серином или аланином). Например, описанный выше измененный шарнир IgG1 человека может дополнительно иметь пролин, расположенный карбокситерминально по отношению к трём цистеинам шарнирной области IgG1 дикого типа человека, замещенный другим аминокислотным остатком (например, серином, аланином). В одном варианте осуществления пролины центральной шарнирной области не замещены.

В некоторых вариантах осуществления шарнир, карбокситерминальный линкер или полипептид amino-терминального линкера содержат или представляют собой последовательность, которая по мень-

шей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична шарнирной области иммуноглобулина дикого типа, такой как шарнир человеческого IgG1 дикого типа, шарнир человеческого IgG2 дикого типа, или шарнир человеческого IgG4 дикого типа.

В других вариантах осуществления шарнир, карбокситерминальный линкер или аминоконцевой линкер, присутствующий в CD123-связывающем полипептиде, может представлять собой шарнир, который не основан на шарнире иммуноглобулина или не происходит от него (т.е. не является шарниром иммуноглобулина дикого типа или измененным шарниром иммуноглобулина). Примеры таких шарниров и линкеров с карбоксильным концом включают пептиды из от примерно пяти до примерно 150 аминокислот, происходящие от междоменной области трансмембранного белка или области ножки С-лектина типа II, например, пептиды из примерно от восьми до 25 аминокислот и пептиды от примерно семи до 18 аминокислот. В другом варианте осуществления карбокси-терминальный линкер или линкер на аминоконце содержит (Gly₄ Ser) повтор (SEQ ID NO: 315), такой как (Gly₄ Ser)₃ PS (SEQ ID NO: 316).

В некоторых вариантах осуществления шарнирные, карбоксильные концевые линкерные и аминоконцевые линкерные последовательности содержат от 5 до 150 аминокислот, от 5 до 10 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот, от 20 до 30 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, 40 до 50 аминокислот, от 50 до 60 аминокислот, от 5 до 60 аминокислот, от 5 до 40 аминокислот, от 8 до 20 аминокислот или от 10 до 15 аминокислот. Шарнир или линкер могут быть в основном гибкими, но могут также обеспечивать более жесткие характеристики или могут содержать в основном α -спиральную структуру с минимальной структурой β -листа. Длина или последовательность шарниров и линкеров может влиять на аффинность связывания связывающих доменов, с которыми шарниры прямо или косвенно (через другую область или домен, например, домен гетеродимеризации) связаны, а также на одну или несколько активностей участков Fc-области, с которыми шарниры или линкеры прямо или непрямо связаны.

В некоторых вариантах осуществления последовательности шарнира, карбокситерминального линкера и аминоконцевой линкера являются стабильными в плазме и сыворотке и устойчивы к протеолитическому расщеплению. Первый лизин в верхней шарнирной области IgG1 может быть мутирован для минимизации протеолитического расщепления, например, лизин может быть замещен метионином, треонином, аланином или глицином или удален.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид, связывающий CD123 способен образовывать гетеродимер со второй полипептидной цепью и содержит шарнирную область (a), непосредственно аминоконцевой по отношению к константной области иммуноглобулина (например, аминоконцевой по отношению к CH2-домену, причем константная область иммуноглобулина включает CH2 и CH3-домены или аминоконцевой по отношению к CH3-домену, причем субобласти иммуноглобулина включают CH3 и CH4-домены), (b) расположенную между и соединяющую связывающий домен (например, scFv) и гетеродимеризационный домен иммуноглобулина, (c) расположенную между и соединяющую гетеродимеризационный домен иммуноглобулина и константную область иммуноглобулина (например, при этом константная область иммуноглобулина включает CH2 и CH3-домены или CH3 и CH4-домены), (d) расположенную между и соединяющую константную область иммуноглобулина и связывающий домен, (e) на аминоконце полипептидной цепи или (f) на карбоксильном конце полипептидной цепи. Полипептидная цепь, содержащая шарнирную область, как описано в данном документе, будет способна связываться с другой полипептидной цепью с образованием гетеродимерного белка, представленного в данном документе, и образованный гетеродимер будет содержать связывающий домен, который сохраняет свою специфичность к мишени или его специфическую аффинность связывания с мишенью.

Некоторые примерные шарнирные, карбоксильные линкерные и аминоконцевые линкерные последовательности, подходящие для использования в соответствии с данным изобретением, продемонстрированы в табл. 1 и 2 ниже. Дополнительные иллюстративные области шарнира и линкера приведены в SEQ ID NO: 241-244, 601, 78, 763-791, 228, 379-434, 618-749 US 2013/0129723 (указанные последовательности включены в данное описание посредством ссылки).

Таблица 1. Иллюстративные шарниры и линкеры

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
шарнир sss(s)-	EPKSSDKTHTSPSS	SEQ

hIgG1		ID NO:21 5
шарнир csc(s)- hIgG1	EPKSCDKTHTSPPCS	SEQ ID NO:21 6
шарнир ssc (s) -hIgG1	EPKSSDKTHTSPPCS	SEQ ID NO:21 7
шарнир scc(s)- hIgG1	EPKSSDKTHTCPPCS	SEQ ID NO:21 8
шарнир css(s)- hIgG1	EPKSCDKTHTSPPSS	SEQ ID NO:21 9
шарнир scs (s) -hIgG1	EPKSSDKTHTCPPSS	SEQ ID NO:22 0
шарнир ccc (s) -hIgG1	EPKSCDKTHTSPPCS	SEQ ID NO:22 1
шарнир ccc(p)- hIgG1	EPKSCDKTHTSPPCP	SEQ ID NO:22 2
шарнир sss (p)	EPKSSDKTHTSPPSP	SEQ

-hIgG1		ID NO:22 3
шарнир csc (p) -hIgG1	EPKSCDKTHTSPPCP	SEQ ID NO:22 4
шарнир ssc (p) -hIgG1	EPKSSDKTHTSPPCP	SEQ ID NO:22 5
шарнир scs (p) -hIgG1	EPKSSDKTHTCPPCP	SEQ ID NO:22 6
шарнир css (p) -hIgG1	EPKSCDKTHTSPPSP	SEQ ID NO:22 7
шарнир scs (p) -hIgG1	EPKSSDKTHTCPPSP	SEQ ID NO:22 8
Scppcp	SCPPCP	SEQ ID NO:22 9
STD1	NYGGGGSGGGGSGGGGSGNS	SEQ ID NO:23 0
STD2	NYGGGGSGGGGSGGGGSGNYGGGGSGGGGSGGGGSGN	SEQ

	S	ID NO:23 1
H1	NS	SEQ ID NO:23 2
H2	GGGGSGNS	SEQ ID NO:23 3
H3	NYGGGGSGNS	SEQ ID NO:23 4
H4	GGGGSGGGGSGNS	SEQ ID NO:23 5
H5	NYGGGGSGGGGSGNS	SEQ ID NO:23 6
H6	GGGGSGGGGSGGGGSGNS	SEQ ID NO:23 7
H7	GCPPCPNS	SEQ ID NO:23 8
(G ₄ S) ₃	GGGGSGGGGSGGGGS	SEQ

		ID NO:23 9
H105	SGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO:24 0
(G ₄ S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO:24 1
H75 (четверной мутант NKG2A)	QRHNSSLNTGTQMAGHSPNS	SEQ ID NO:24 2
H83 (происходящи й от NKG2A)	SSLNTGTQMAGHSPNS	SEQ ID NO:24 3
H106 (происходящи й от NKG2A)	QRHNSSLNTGTQMAGHS	SEQ ID NO:24 4
H81 (происходящи й от NKG2D)	EVQIPLTESYSPNS	SEQ ID NO:24 5
H91 (происходящи й от NKG2D)	NSLANQEVQIPLTESYSPNS	SEQ ID NO:24 6
H94	SGGGGSGGGGSGGGGSPNS	SEQ

		ID NO:24 7
H111	SGGGGSGGGGSGGGGSPGS	SEQ ID NO:24 8
H114	GGGGSGGGGSGGGGSPS	SEQ ID NO:28 8

Таблица 2. Иллюстративные шарниры и линкеры (происходящие от шарнира H7, области ножки С-лектина типа II или междоменной области трансмембранного белка типа I)

<u>Название</u>	<u>Аминокислотная последовательность</u>	<u>Молекула и/или шарнир, от которого происходят</u>	<u>SEQ ID NO</u>
H16	LSVKADFLTPSIGNS	CD80	SEQ ID NO:249
H17	LSVKADFLTPSISCPPPNS	CD80 + H7	SEQ ID NO:250
H18	LSVLANFSQPEIGNS	CD86	SEQ ID NO:251
H19	LSVLANFSQPEISCPPPNS	CD86 + H7	SEQ ID NO:252
H20	LKIQERVSKPKISNS	CD2	SEQ ID NO:253
H21	LKIQERVSKPKISCPPPNS	CD2 + H7	SEQ ID

			NO:254
H22	LNVSERPFPPHIQNS	CD22	SEQ ID NO:255
H23	LDVSERPFPPHIQSCPPCPNS	CD22 + H7	SEQ ID NO:256
H24	REQLAEVTLSLKANS	CD80	SEQ ID NO:257
H25	REQLAEVTLSLKACPPCPNS	CD80 + H7	SEQ ID NO:258
H26	RIHQMNSELSVLANS	CD86	SEQ ID NO:259
H27	RIHQMNSELSVLACPPCPNS	CD86 + H7	SEQ ID NO:260
H28	DTKGKNVLEKIFSNS	CD2	SEQ ID NO:261
H30	LPPETQESQEVTLNS	CD22	SEQ ID NO:262
H32	RIHLNVSERPFPPNS	CD22	SEQ ID NO:263
H33	RIHLNVSERPFPPCPNS	CD22 + H7	SEQ ID NO:264
H36	GCPPCPGGGGSNS	H7	SEQ ID NO:265
H40	GCPPCPANS	H7	SEQ ID NO:266
H41	GCPPCPANS	H7	SEQ ID NO:267
H42	GCPPCPNS	H7	SEQ ID NO:268
H44	GGGASCPGNS	H7	SEQ ID

			NO:269
H45	GGGASCPPCAGNS	H7	SEQ ID NO:270
H46	GGGASCPPCANS	H7	SEQ ID NO:271
H47	LSVKADFLTPSIGNS	CD80	SEQ ID NO:272
H48	ADFLTPSIGNS	CD80	SEQ ID NO:273
H50	LSVLANFSQPEIGNS	CD86	SEQ ID NO:274
H51	LSVLANFSQPEIGNS	CD86	SEQ ID NO:275
H52	SQPEIVPISNS	CD86	SEQ ID NO:276
H53	SQPEIVPISCPCPNS	CD86 + H7	SEQ ID NO:277
H54	SVLANFSQPEISCPCPNS	CD86 + H7	SEQ ID NO:278
H55	RIHQMNSELSVLANS	CD86	SEQ ID NO:279
H56	QMNSELSVLANS	CD86	SEQ ID NO:280
H57	VSERPFPPNS	CD22	SEQ ID NO:281
H58	KPFFTCGSADTCPNS	CD72	SEQ ID NO:282
H59	KPFFTCGSADTCPNS	CD72	SEQ ID NO:283
H60	QYNCPGQYTFSPNS	CD69	SEQ ID
			NO:284
H61	EPAFTPGPNIELQKSDCPNS	CD94	SEQ ID NO:285
H62	QRHNNSLNTRTQKARHCPNS	NKG2A	SEQ ID NO:286
H63	NSLFNQEVQIPLTESYCPNS	NKG2D	SEQ ID NO:287

Как указано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления полипептиды по данному изобретению содержат константную область иммуноглобулина (также называемую константной областью) в полипептидной цепи. Включение константной области иммуноглобулина замедляет клиренс гомодимерного и гетеродимерного белков, образованных из двух CD123-связывающих полипептидных цепей, из циркуляции после введения субъекту. Благодаря мутациям или другим изменениям константная область иммуноглобулина дополнительно обеспечивает относительно легкую модуляцию эффекторных функций димерного полипептида (например, АЗКЦ, ADCP, CDC, фиксацию комплемента и связывание с рецепторами Fc), которые могут увеличиваться или уменьшаться в зависимости от заболевания,

которое лечат, как известно в данной области и описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления константная область иммуноглобулина одной или обеих полипептидных цепей полипептидных гомодимеров и гетеродимеров по данному изобретению будет способна опосредовать одну или несколько из этих эффекторных функций. В других вариантах осуществления одна или несколько из этих эффекторных функций представляют собой уменьшенный или отсутствующий в константной области иммуноглобулина одной или обеих полипептидных цепей полипептидных гомодимеров и гетеродимеров данного изобретения по сравнению с соответствующей константной областью иммуноглобулина дикого типа. Например, для димерных CD123-связывающих полипептидов, предназначенных для индукции RTCC, таким образом как, например, посредством включения CD3-связывающего домена, константная область иммуноглобулина может иметь сниженную или не иметь эффекторной функции относительно соответствующей константной области иммуноглобулина дикого типа.

Константная область иммуноглобулина, присутствующая в полипептидах по данному изобретению, может содержать или происходить от части или всего из: CH2-домена, CH3-домена, CH4-домена или любой их комбинации. Например, константная область иммуноглобулина может содержать CH2-домен, CH3-домен, оба CH2 и CH3-домена, оба CH3 и CH4-домена, два CH3-домена, CH4-домен, два CH4-домена и CH2-домен и часть CH3-домена.

CH2-домен, который может образовывать константную область иммуноглобулина полипептида по данному изобретению, может представлять собой CH2-домен иммуноглобулина дикого типа или измененный CH2-домен иммуноглобулина из определенных классов или подклассов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgD) и от различных видов (включая человека, мышь, крысу и других млекопитающих).

В некоторых вариантах осуществления CH2-домен представляет собой CH2-домен человеческого иммуноглобулина дикого типа, такой как CH2-домены дикого типа человеческих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgD, представленные в SEQ ID NO: 115, 199-201 и 195-197, соответственно, из патента США 2013/0129723 (указанные последовательности включены в данное описание посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления CH2-домен представляет собой CH2-домен IgG1 человека дикого типа, представленный в SEQ ID NO: 115 из патента США 2013/0129723 (указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления CH2-домен представляет собой измененную CH2-область иммуноглобулина (например, измененный CH2-домен IgG1 человека), которая включает аминокислотную замену в аспарагине в положении 297 (например, аспарагина на аланин). Такое аминокислотное замещение уменьшает или устраняет гликозилирование в этом сайте и устраняет эффективное связывание Fc с FcγR и C1q. Последовательность измененного CH2-домена человеческого IgG1 с Asn на Ala к замене в положении 297 представлена в SEQ ID NO: 324 патент США 2013/0129723 (указанная последовательность включена в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления CH2-домен представляет собой измененную CH2-область иммуноглобулина (например, измененный CH2-домен IgG1 человека), которая содержит по меньшей мере одну замену или делецию в положениях с 234 по 238. Например, CH2-область иммуноглобулина может содержать замену в положении 234, 235, 236, 237 или 238, положениях 234 и 235, положениях 234 и 236, положениях 234 и 237, положениях 234 и 238, положениях 234-236, положениях 234, 235 и 237, положениях 234, 236 и 238, положениях 234, 235, 237 и 238, положениях 236-238 или любой другой комбинации двух, трех, четырех или пяти аминокислот в положениях 234-238. В дополнение или альтернативно, измененная CH2-область может содержать одну или несколько (например, две, три, четыре или пять) делеций аминокислот в положениях 234-238, например, в одном из положения 236 или положения 237, в то время как другое положение является замещенным. Вышеуказанные мутации уменьшают или устраняют активность антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или способность связываться с Fc-рецептором полипептидного гетеродимера, который содержит измененный CH2-домен. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки в одном или нескольких положениях 234-238 были заменены одним или несколькими остатками аланина. В других вариантах осуществления только один из аминокислотных остатков в положениях 234-238 был удален, в то время как одна или несколько оставшихся аминокислот в положениях 234-238 могут быть заменены другой аминокислотой (например, аланином или серином).

В некоторых других вариантах осуществления CH2-домен представляет собой измененную CH2-область иммуноглобулина (например, измененный CH2-домен IgG1 человека), которая содержит одну или несколько аминокислотных замен в положениях 253, 310, 318, 320, 322 и 331. Например, CH2-область иммуноглобулина может содержать замену в положении 253, 310, 318, 320, 322 или 331, положениях 318 и 320, положениях 318 и 322, положениях 318, 320 и 322 или любую другую комбинацию из двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислот в положениях 253, 310, 318, 320, 322 и 331. Вышеуказанные мутации уменьшают или устраняют комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) полипептидного гетеродимера, который содержит измененный CH2-домен.

В некоторых других вариантах осуществления в дополнение к аминокислотной замене в положении 297 измененная CH2-область (например, измененный CH2-домен IgG1 человека) может дополнительно

включать одну или несколько (например, две, три, четыре или пять) дополнительных замен в положениях 234-238. Например, СН2-область иммуноглобулина может содержать замену в положениях 234 и 297, положениях 234, 235 и 297, положениях 234, 236 и 297, положениях 234-236 и 297, положениях 234, 235, 237 и 297, положениях 234, 236, 238 и 297, положениях 234, 235, 237, 238 и 297, положениях 236-238 и 297 или любую комбинацию двух, трех, четырех или пяти аминокислот в положениях 234-238 в дополнение к положению 297. В дополнение или альтернативно, измененная СН2-область может содержать одну или несколько (например, две, три, четыре или пять) делеций аминокислот в положениях 234-238, таких как в положении 236 или положении 237. Дополнительная мутация (мутации) уменьшает или устраняет активность антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или способность связываться с Fc-рецептором полипептидного гетеродимера, который содержит измененный СН2-домен. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки в одном или нескольких положениях 234-238 были заменены одним или несколькими остатками аланина. В других вариантах осуществления только один из аминокислотных остатков в положениях 234-238 был удален, в то время как одна или несколько оставшихся аминокислот в положениях 234-238 могут быть заменены другой аминокислотой (например, аланином или серином).

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к одной или нескольким (например, 2, 3, 4 или 5) аминокислотным заменам в положениях 234-238, мутированная СН2-область (например, измененный СН2-домен IgG1 человека) в слитом белке данного раскрытия может содержать одну или несколько (например, 2, 3, 4, 5 или 6) дополнительных аминокислотных замен (например, замещенных аланином) в одном или нескольких положениях, участвующих в фиксации комплемента (например, в положениях I253, H310, E318, K320, K322 или P331). Примеры мутированных областей СН2 иммуноглобулина включают СН2-области IgG1, IgG2, IgG4 человека и IgG2a мыши с заменами аланина в положениях 234, 235, 237 (если присутствуют), 318, 320 и 322. Примером мутированной СН2-области иммуноглобулина является СН2-область мышьиной IGHG2c с аланиновыми заменами в L234, L235, G237, E318, K320 и K322.

В еще других вариантах осуществления в дополнение к аминокислотной замене в положении 297 и дополнительному удалению (ям) или замене (заменам) в положениях 234-238 измененная СН2-область (например, измененный СН2-домен IgG1 человека) может дополнительно содержать одну или несколько (например, две, три, четыре, пять или шесть) дополнительных замен в положениях 253, 310, 318, 320, 322 и 331. Например, СН2-область иммуноглобулина может содержать (1) замену в положении 297, (2) одну или несколько замен или делеций или их комбинацию в положениях 234-238 и одну или несколько (например, 2, 3, 4, 5 или 6) аминокислотных замен в положениях I253, H310, E318, K320, K322 и P331, таких как одна, две, три замены в положениях E318, K320 и K322. Аминокислоты в вышеуказанных положениях могут быть замещены аланином или серином.

В некоторых вариантах осуществления полипептид СН2-области иммуноглобулина содержит: (i) аминокислотную замену в аспарагинах в положении 297 и одну аминокислотную замену в положениях 234, 235, 236 или 237; (ii) аминокислотную замену в аспарагине в положении 297 и аминокислотные замены в двух положениях 234-237; (iii) аминокислотную замену в аспарагине в положении 297 и аминокислотные замены в трех положениях 234-237; (iv) аминокислотную замену в аспарагине в положении 297, аминокислотные замены в положениях 234, 235 и 237 и делецию аминокислот в положении 236; (v) аминокислотные замены в трех положениях 234-237 и аминокислотные замены в положениях 318, 320 и 322; или (vi) аминокислотные замены в трех положениях 234-237, аминокислотную делецию в положении 236 и аминокислотные замены в положениях 318, 320 и 322.

Иллюстративные измененные СН2-области иммуноглобулина с аминокислотными заменами в аспарагине в положении 297 включают: СН2-область человеческого IgG1 с заменами аланина в L234, L235, G237 и N297 и делецию в G236 (SEQ ID NO: 325 из патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки), СН2-область человеческого IgG2 с аланиновыми заменами в V234, G236 и N297 (SEQ ID NO: 326 патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки), СН2-область человеческого IgG4 с заменами аланина в F234, L235, G237 и N297 и делецией G236 (SEQ ID NO: 322 из патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки), СН2-область человеческого IgG4 с заменами аланина в F234 и N297 (SEQ ID NO: 343 из патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена в данный документ посредством ссылки), СН2-область человеческого IgG4 с аланиновыми заменами в L235 и N297 (SEQ ID NO: 344 из патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена в данный документ посредством ссылки), СН2-область человеческого IgG4 с заменами аланина в G236 и N297 (SEQ ID NO: 345 из патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки) и СН2-область человеческого IgG4 с заменами аланина у G237 и N297 (SEQ ID NO: 346 из патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена посредством ссылки в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к аминокислотным заменам, описанным выше, измененная СН2-область (например, измененный СН2-домен IgG1 человека) может содержать одну или несколько дополнительных аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, отличных от указанных выше положений. Такие аминокислотные замены могут быть консервативными или некон-

сервативными аминокислотными заменами. Например, в определенных вариантах осуществления P233 может быть заменен на E233 в измененной CH2-области IgG2 (см., Например, SEQ ID NO: 326 патента США 2013/0129723, указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки). В дополнение или альтернативно, в некоторых вариантах измененная CH2-область может содержать одну или несколько аминокислотных вставок, делеций или обе из этих типов мутаций. Вставка(и), делеция(и) или замена(и) могут быть в любом месте CH2-области иммуноглобулина, таким образом как на N- или C-конце CH2-области иммуноглобулина дикого типа, возникающая в результате связывания CH2-области с другой областью (например, связывающим доменом или гетеродимеризационным доменом иммуноглобулина) через шарнир.

В определенных вариантах осуществления измененная CH2-область в полипептиде по данному изобретению содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична CH2-области иммуноглобулина дикого типа, такой как CH2-область человеческого IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа или IgG2a мыши (например, IGHG2c).

Измененная CH2-область иммуноглобулина в CD123-связывающем полипептиде по данному изобретению может происходить из CH2-области различных изоформ иммуноглобулинов, таких как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 и IgD, из различных видов (включая человека, мышь, крысу и других млекопитающих). В определенных вариантах осуществления измененная CH2-область иммуноглобулина в слитом белке по данному изобретению может происходить из CH2-области человеческого IgG1, IgG2 или IgG4 или мышинного IgG2a (например, IGHG2c), последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 115, 199, 201 и 320 патента США 2013/0129723 (указанные последовательности включены в данное описание посредством ссылки).

В определенных вариантах осуществления измененный CH2-домен представляет собой CH2-домен IgG1 человека с аланиновыми заменами в положениях 235, 318, 320 и 322 (то есть CH2-домен IgG1 человека с заменами L235A, E318A, K320A и K322A) (SEQ ID NO: 595 US 2013/0129723, указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки) и, необязательно, мутацией N297 (например, на аланин). В некоторых других вариантах осуществления измененный CH2-домен представляет собой CH2-домен IgG1 человека с аланиновыми заменами в положениях 234, 235, 237, 318, 320 и 322 (т. е. CH2-домен IgG1 человека с заменами L234A, L235A, G237A, E318A, K320A и K322A) (SEQ ID NO: 596 в US 2013/0129723, указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки) и, возможно, мутацию N297 (например, на аланин).

В определенных вариантах осуществления измененный CH2-домен представляет собой измененный CH2-домен IgG1 человека с мутациями, известными в данной области, которые усиливают иммунологическое действие, такое как АККЦ, ADCP, CDC, фиксацию комплемента, связывание с Fc-рецептором или любую их комбинацию.

CH3-домен, который может образовывать константную область иммуноглобулина полипептида по данному изобретению, может представлять собой CH3-домен иммуноглобулина дикого типа или его измененный CH3-домен иммуноглобулина из определенных классов или подклассов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM) различных видов (включая человека, мышь, крысу и других млекопитающих). В некоторых вариантах осуществления CH3-домен представляет собой CH3-домен человеческого иммуноглобулина дикого типа, такой как домены CH3 дикого типа человеческого IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM, представленные в SEQ ID NO: 116, 208-210, 204-207 и 212, соответственно, из патента США 2013/0129723 (указанные последовательности включены в данное описание посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления CH3-домен представляет собой CH3-домен IgG1 человека дикого типа, представленный в SEQ ID NO: 116 из патента США 2013/0129723 (указанная последовательность включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления CH3-домен представляет собой измененный CH3-домен иммуноглобулина человека, такой как измененный CH3-домен, основанный или полученный из CH3-домена дикого типа человеческого IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, или IgM антитела. Например, измененный CH3-домен может быть CH3-доменом IgG1 человека с одной или двумя мутациями в положениях H433 и N434 (положения нумеруются в соответствии с нумерацией EU). Мутации в таких положениях могут быть вовлечены в фиксацию комплемента. В некоторых других вариантах измененный CH3-домен может представлять собой CH3-домен IgG1 человека, но с одной или двумя аминокислотными заменами в положении F405 или Y407. Аминокислоты в таких положениях участвуют во взаимодействии с другим CH3-доменом. В некоторых вариантах осуществления измененный CH3-домен может представлять собой измененный CH3-домен IgG1 человека с удаленным последним лизином. Последовательность этого измененного CH3-домена изложена в SEQ ID NO: 761 в патенте США 2013/0129723 (указанная последовательность включена в данное описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающие полипептиды, образующие полипептидный гетеродимер, содержат пару CH3, которая содержит так называемые мутации "выступы в отверстия" (см. Marvin and Zhu, *Acta Pharmacologica Sinica* 26: 649-58, 2005; Ridgway et al, *Protein Engineering*

9: 617-21, 199 б). Более конкретно, мутации могут быть введены в каждый из двух СН3-доменов каждой полипептидной цепи, так что стерическая комплементарность, необходимая для ассоциации СН3/СН3, обязывает эти два СН3-домена пароваться друг с другом. Например, СН3-домен в одном одноцепочечном полипептиде полипептидного гетеродимера может содержать мутацию Т366W (мутацию "выступ", которая заменяет небольшую аминокислоту более крупной) и СН3-домен в другом одноцепочечном полипептиде полипептидный гетеродимер может содержать мутацию Y407A (мутация "отверстие", которая заменяет большую аминокислоту на меньшую). Другие типичные мутации "выступы в отверстия" включают (1) мутацию Т366Y в одном СН3-доме и Y407T в другом СН3-доме и (2) мутацию Т366W в одном СН3-доме и мутации Т366S, L368A и Y407VB другом СН3-доме.

СН4-домен, который может образовывать константную область иммуноглобулина CD123-связывающих полипептидов по данному изобретению, может представлять собой СН4-домен иммуноглобулина дикого типа или его модифицированный СН4-домен иммуноглобулина из молекул IgE или IgM. В некоторых вариантах осуществления СН4-домен представляет собой СН4-домен человеческого иммуноглобулина дикого типа, такой как СН4-домены дикого типа молекул IgE и IgM человека, представленные в SEQ ID NO: 213 и 214, соответственно, из патента США 2013/0129723 (указанные последовательности включены в данное описание посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления СН4-домен представляет собой измененный СН4-домен иммуноглобулина человека, такой как измененный СН4-домен, основанный на или полученный из СН4-домена молекул человеческого IgE или IgM, которые имеют мутации, которые увеличивают или уменьшают иммунологическую активность, о которой известно, что она связана с Fc-областью IgE или IgM.

В некоторых вариантах осуществления константная область иммуноглобулина CD123-связывающих полипептидов по данному изобретению содержит комбинацию СН2, СН3 или СН4-доменов (т.е. более одного домена константной области, выбранного из СН2, СН3 и СН4). Например, константная область иммуноглобулина может содержать СН2 и СН3-домены или СН3 и СН4-домены. В некоторых других вариантах осуществления константная область иммуноглобулина может содержать два СН3-домена и не содержать СН2 или СН4-доменов (т.е. только два или более СН3). Множество доменов константной области, которые образуют константную область иммуноглобулина, могут быть основаны или происходить от одной и той же молекулы иммуноглобулина или от одного и того же класса или подкласса молекул иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления константная область иммуноглобулина представляет собой СН2СН3 IgG (например, СН2СН3 IgG1, СН2СН3 IgG2 и СН2СН3 IgG4) и может быть СН2СН3 человеческой (например, человеческим IgG1, IgG2 и IgG4 человека). Например, в некоторых вариантах осуществления константная область иммуноглобулина содержит (1) СН2 и СН3-домены IgG1 человека дикого типа, (2) СН2 IgG1 человека с заменой N297A (т.е. СН2 (N297A)) и СН3 IgG1 человека дикого типа или (3) СН2 IgG1 человека (N297A) и измененный СН3 IgG1 человека с удаленным последним лизином.

Альтернативно, множественные домены константной области могут быть основаны или происходить от разных молекул иммуноглобулина или от разных классов или подклассов молекул иммуноглобулина. Например, в некоторых вариантах осуществления константная область иммуноглобулина содержит как человеческий СН3-домен IgM, так и СН3-домен IgG1 человека. Множество доменов константной области, которые образуют константную область иммуноглобулина, могут быть непосредственно связаны вместе или могут быть связаны друг с другом через одну или несколько (например, около 2-10) аминокислот.

Иллюстративные константные области иммуноглобулина приведены в SEQ ID NO: 305-309, 321, 323, 341, 342 и 762 US 2013/0129723 (указанные последовательности включены в данное описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления константные области иммуноглобулина обоих CD123-связывающих полипептидов полипептидного димера являются идентичными друг другу. В некоторых других вариантах константная область иммуноглобулина одной полипептидной цепи димерного белка отличается от константной области иммуноглобулина другой полипептидной цепи димера. Например, одна константная область иммуноглобулина гетеродимерного белка может содержать СН3-домен с мутацией "выступ", тогда как другая константная область иммуноглобулина гетеродимерного белка может содержать СН3-домен с мутацией "отверстие".

Данное раскрытие относится к CD123-связывающим белкам и полипептидам, которые могут содержать любую из последовательностей, продемонстрированных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающие белки и полипептиды могут содержать сигнальную последовательность. Последовательности для различных клонированных последовательностей и компонентов также представлены в табл. 3. Аминокислотные последовательности, приведенные для полипептидных конструкций, не включают лидерные последовательности иммуноглобулина человека или кролика. Показанные последовательности CDR и положения аминокислотных замен являются теми, которые определены с использованием критериев IMGТ (Brochet, X, et al., Nucl. Acids Res. (2008) 36, W503-508). Таким образом, первый остаток в FR1 варибельного домена или области тяжелой или легкой цепи считается положением 1.

Таблица 3. Последовательности и компоненты связывающих полипептидов

Название	Нуклеотидная последовательность	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO: нуклеотид (аминокислота)
вариабельный домен легкой цепи ОМТ1	gacatcgtgatgaccagctctccagactcc ctggctgtgtctctggcgagagggccac catcaactgcaagtccagccacagtgttta tacagctccaacaataagaactacttagctt ggtagcagcagaaccaggacagcctcct aagctgctcattactggcctctaccgg gaatccgggtccctgaccgattcagtg cagcgggtctgggacagattcactctcac catcagcagcctgaggctgaagatgtgg cagtttactgtcagcaatattatagctc ctccgaccacttccggcggaggaccaag gtggagatcaaa	divmtqspdslavslgeratincksshsvly ssnknlylawyqqkpgqppklliywastr esgvpdrfsgsgtdftltisslqaedvavy ycqqyystpftfgggkveik	SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:2)
Вариабельный домен тяжелой цепи ОМТ1	gaggtgcagctgttgagctcggggagg ctggtagcagcctgggggtccctgagact ctcctgtgcagcctctggattaccittagc agctatggcatgagctgggtccgaggc tccagggaaggcctggagggtctca gctattagtgtagtggtgtagcactact acgcagactccgtgaaggccggtcacc atctccagagacaattccaagaacacgctg tatctgaaatgaacagcctgagagccga ggacacggcctatattactgtcgaag	evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssy gmswvrqapgkglegvsaisgsgstyya dsvkgrftisrdnskntlylqmnsraedtav yycakeklryfdwlsdafdiwgqgtmvtv ss	SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:4)

	aaaagftacgatatatttgactgggtatccgat gcttttgatatactggggccaaggacaatg gtcaccgtctcttca		
OMT1 CDR L1	cacagtgtttatacagctccaacaataaga actac	HSVLYSSNNKNY	SEQ ID NO:5 (SEQ ID NO:6)
OMT1 CDR L2	tgggcatct	WAS	SEQ ID NO:7 (SEQ ID NO:8)
OMT1 CDR L3	cagcaatattatagactcctccgacct	QYYSTPPTT	SEQ ID NO:9 (SEQ ID NO:10)
OMT1 CDR H1	ggattcaccttagcagctatggc	GFTFSSYG	SEQ ID NO:11 (SEQ ID NO:12)
OMT1 CDR H2	attagtggtagtggtagcaca	ISGSGGST	SEQ ID NO:13 (SEQ ID NO:14)
OMT1 CDR H3	gcaaaagaaagttacgatatatttgactggt tatccgatgctttgatatac	AKEKLRYFDWLSDAFDI	SEQ ID NO:15 (SEQ ID NO:16)
Вариабельн ый домен легкой цепи DB8	gacatccagatgacccagctcctccatcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcactgcccggcaagtcagagcattagc agctatctgaattggtatcagcagaacca gggaaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatccagttgcaaagtggggtcccatca agggtcagtgccagtgatctgggacaga	diqumtqspsslsasvdrvtitcrasqsissyl nwyqqkpgkapkliyaasslqsgvpsrfs gsgsgtdfttisslqpedfatyycqqsystpl tfgggtkveik	SEQ ID NO:17 (SEQ ID NO:18)

	tttctctcaccatcagcagctctgcaacct gaagatttgcaactfactactgtcaacaga gttacagtaccctctcacttctcgcgag gtaccaagtgagatcaaa		
Вариабельный домен тяжелой цепи DB8	caggcagctggcagctgggctga ggggaagaagcctgggctcagtgaa gttctctcaaggcatctggatacatctca ccgactactatgactgggtgcgtcagg cccctggacaaggcctgagtgatggga tgatgagccctaacagtggaacacagg ctatgcacagaagttccaggccgtcac catgaccccgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctgcttct gaggacacggcctgtattactgtcgag agatgcggcggattacgggtgactacgtgc tttgatatctgggccaaggacaatggt caccgtcttca	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgyift dyymhwvrqapqglewmgwmspns gntgyaqkfgrvmttrdtststvmelssl rsedtavyycardaadydyvafdiwgqg tmvtvss	SEQ ID NO:19 (SEQ ID NO:20)
DB8 CDR L1	cagagcattagcagctat	QSISSY	SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:22)
DB8 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:23 (SEQ ID NO:24)
DB8 CDR L3	caacagagttacagtaccctctcact	QSYSTPLT	SEQ ID NO:25 (SEQ ID NO:26)
DB8 CDR H1	ggatacatctcaccgactactat	GYIFTDYY	SEQ ID NO:27 (SEQ ID NO:28)
DB8	atgagccctaacagtggaacaca	MSPNSGNT	SEQ ID

CDR H2			NO:29 (SEQ ID NO:30)
DB8 CDR H3	gcgagagatgcggcggattacggtgacta cgttgctttgatac	ARDAADYGDYVAFDI	SEQ ID NO:31 (SEQ ID NO:32)
Вариабельн ый домен легкой цепи DB60	gacatccagatgacccagctcctcactctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcactgccgggcaagtcagagcattagc agctatctgaattggtatcagcagaacca gggaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatccagtttcaaagtggggtccatca aggttcagtgccagtgatctgggacaga ttcactctcaccatcagcagctcgaacct gaagatttgcaactfactactgtcaacaga gttacagtaccctctcacttccggcggag glaccaaggaggagalcaaa	dqmtqspsslsasvdrviticrasqsisyl nwyqqkpkapkllyaasslqsgvpsrfs gsgsgtdfsltisslqpedfatyycqqsyspl tfgggkveik	SEQ ID NO:17 (SEQ ID NO:18)
Вариабельн ый домен тяжелой цепи DB60	caggtgcagctggtgcagctggtggctga ggtgaagaagcctgggcctcagtggaag gttctctgcaaggcatctggatacacctca ccagctactatgactggtgctcagcagg cccctggacaaggccttgatggatgggg tggatcaaccctaacagtggtgacacaag ctatgcacagaagttccaggccgtgtcac catgacccgcgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctgcttct gaggacacggcctgtattactgtgcgca ggatagtagtggtccggcctttgatac tggggccaagggacaatggtcacctctc ttca	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgyft syymhwvrqapqglewmgwinpnsq dtsyaqkfqgrvmttrdtststvmelsslrs edtavyycaqdssgsgafdiwgqtmvtv ss	SEQ ID NO:33 (SEQ ID NO:34)
DB60 CDR L1	cagagcattagcagctat	QSISSY	SEQ ID NO:21 (SEQ ID

			NO:22)
DB60 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:23 (SEQ ID NO:24)
DB60 CDR L3	caacagagttacagtaccctctcact	QQSYSTPLT	SEQ ID NO:25 (SEQ ID NO:26)
DB60 CDR H1	ggatacaccttcaccagctactat	GYTFTSYY	SEQ ID NO:35 (SEQ ID NO:36)
DB60 CDR H2	atcaaccctaacagtggtgacaca	INPNSGDT	SEQ ID NO:37 (SEQ ID NO:38)
DB60 CDR H3	gcgacagatagtagtggtccgggcttt gatatac	AQDSSGSGAFDI	SEQ ID NO:39 (SEQ ID NO:40)
Вариабельный домен легкой цепи DB65	gacatccagatgaccagctccatcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagatcacc atcacttgccgggcaagtacagacattagc agctatctgaattggtatcagcagaaaacca gggaaagccctaagctcctgatctatgct gcatccagttgcaaaagtggtcccatca aggttcagtgccagtgatctgggacaga ttcactctcaccatcagcagctgcaacct gaagatttgcaacttactactgtcaacaga gttacagtaccctctcactttcggcggag gtaccaagtgagatcaaa	dqmtqspsslsasvdrviticrasqsissyl nwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfs gsgsgtdfilitisslqpedfatyycqqsystpl tfgggtkveik	SEQ ID NO:17 (SEQ ID NO:18)
Вариабельный домен	caggtgcagctggtgcagctgggctga ggtgaagaagcctgggcctcagtgaaag	qvqlvqsgaevkpgasvkvscasgyftf gyymhwvrqapqglewmgwmnpns	SEQ ID NO:41

тяжелой цепи DB65	gtttcctgcaaggcatctggatacacctca ccggctactatgactgggtgctcagg cccctggacaaggcctgagtgatggga tgatgaaccctaacagtggtaacacagg ctatgcacagaagtccaggccgtgtcac catgaccgcgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctgcgtct gaggacacggccgtattactgtcgaa agaggaaccgattttggagtgttatggat gcttttgatatctgggccaaggacaatg gtcaccgtctcctca	gntgyaqkfqgrvtmtrdtststvmelssl rsedtavyycakeepifgvvmdafdiwgq gtmvtvss	(SEQ ID NO:42)
DB65 CDR L1	cagagcattagcagctat	QSISY	SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:22)
DB65 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:23 (SEQ ID NO:24)
DB65 CDR L3	caacagagttacagtaccctctcact	QSYSTPLT	SEQ ID NO:25 (SEQ ID NO:26)
DB65 CDR H1	ggatacaccttcaccggctactat	GYFTGYY	SEQ ID NO:43 (SEQ ID NO:44)
DB65 CDR II2	atgaaccctaacagtggtaacaca	MNPNSGNT	SEQ ID NO:45 (SEQ ID NO:46)
DB65 CDR H3	gcgaaagaggaaccgattttggagtgtt atggatgctttgatatc	AKEEPIFGVVMDAFDI	SEQ ID NO:47 (SEQ ID

			NO:48)
Вариабельный домен легкой цепи DB82	gacatccagatgaccagctccatcctcc ctgtctgcatctgtaggaccgctcacc atcacttgcgggcaagtcagaccataaa caactattggaactggtatcagcagaaacc agggaagcccctaagctcctgatctattct gcatctactttgcaaagtggggtccatca cgfttcagtgaggcagtgatctggacagat ttcactctaccatcagcagctgcaacctg aagattttgcaacttactactgtcaccagag ttacactcacctctcactttcggcggaggt accaaggtggagatcaaa	diqmtqspsslsasvgrviticrasqtinny lnwyqkpgkapkliysastlqsgvpsrfs gsgsgdfiltisslqpedfatyychqsytspl tfgggtkveik	SEQ ID NO:49 (SEQ ID NO:50)
Вариабельный домен тяжелой цепи DB82	gaggtgcagctggtggagtctgggggag gcttggtacagcctgggggtccctgcgc ctctcctgtgcagcctctgattcaccttag cagctatgcatgagctgggtccgccagg ctccagggaagggctggagtgggtctca gttattagtccaatagtctgcttaggcc atcggactctgtgaagggccggtcacc atctcccgcgacaattccaagaacacgctg tatctgcaaatgaacagcctgcgcgccga ggacacggcctatattactgtgcgagagt gggctatagcagctcggctgatctttgat atctgggccaaggacaatggtcacctg ctcctcg	evqlvesggglvppgslrlscaasgflfssy amswvrqapgkglewvsvisansaglggh adsvkgrfuisrdnskntlylqmnsraedta vyycarvgysssadafdiwgqgtmvtvss	SEQ ID NO:51 (SEQ ID NO:52)
DB82 CDR L1	cagaccataaacaactat	QTINNY	SEQ ID NO:53 (SEQ ID NO:54)
DB82 CDR L2	tctgcatct	SAS	SEQ ID NO:55 (SEQ ID NO:56)
DB82	caccagagttacactcacctctcact	HQSYTSPLT	SEQ ID

CDR L3			NO:57 (SEQ ID NO:58)
DB82 CDR H1	ggattcacctttagcagctatgcc	GFTFSSYA	SEQ ID NO:59 (SEQ ID NO:60)
DB82 CDR H2	attagtccaatagtctggtcta	ISANSAGL	SEQ ID NO:61 (SEQ ID NO:62)
DB82 CDR H3	gcgagagtgaggctatagcagctcggtga tgctttgatatc	ARVGYSSSADAFDI	SEQ ID NO:63 (SEQ ID NO:64)
Вариабельн ый домен легкой цепи DB83	gatgttgatgactcagctccactcctcct gcccgtcacccctggagagccggcctcc atctcctgagctctagtcagagcctcctg catagtaatggagacaactattggattggt acctgcagaagccaggcagctccaca gctcctgatctattgggttctaactgggcct ccggggtccctgaccgttccagtggcagtg gatcagccacagattttactgaaaatca gccgtgtggagctgaggatgtggggtt attactgatgcaagctacacactggccac tcacttccggcctggtaccaagtggatat caaa	dvvmtqsplslpvtpepasiscrssqllhs ngdnyldwylqkpgqspqlliylnrasg vpdrfsgsgstfdflkisirveaedvgvyy mqathwpltfpgtkvdik	SEQ ID NO:65 (SEQ ID NO:66)
Вариабельн ый домен тяжелой цепи DB83	caggtgcagctggtgcagctggggctga ggtgaagaagcctgggcctcagtgaag gttcctgcaaggcctctggatacacctca ctagctatgctatgattgggtcgtcagg cccctggacaaggccttggatggatggga cttgtgatcctgaagatggtgaaacaatat atgcagagaagtccaggccgtgtcacc	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvsckasgyft syamhwvrqapggglewmgldvpedge tiyaekfgrvtmtrdtststvmelsslrse dtavyycarrtyyydssgsryafdiwgqgt vtvss	SEQ ID NO:67 (SEQ ID NO:68)

	atgaccgcgacacgtccacgagcacagt ctacatggagctgagcagcctgcttctga ggacacggccgttattactgtcgagac gaacgtattactatgatagtagtggtccc ttatgctttgatatctgggccaaggacc acggtcaccgtcttca		
DB83 CDR L1	cagagcctcctcatagtaatggagacaa ctat	QSLLSHNGDNY	SEQ ID NO:69 (SEQ ID NO:70)
DB83 CDR L2	ttgggttct	LGS	SEQ ID NO:71 (SEQ ID NO:72)
DB83 CDR L3	atgcaagctacacactggccactcact	MQATHWPLT	SEQ ID NO:73 (SEQ ID NO:74)
DB83 CDR H1	ggatacacctcactagctatgct	GYTFTSYA	SEQ ID NO:75 (SEQ ID NO:76)
DB83 CDR H2	gttgatcctgaagatggtgaaaca	VDPEDGET	SEQ ID NO:77 (SEQ ID NO:78)
DB83 CDR H3	gcgagacgaacgtattactatgatagt ggttcccgttatgctttgatatc	ARRTYYYDSSGSRYA FDI	SEQ ID NO:79 (SEQ ID NO:80)
Вариабельн ый домен легкой цепи DB86	gacatccagatgccagctcctcctcc ctgtctgcatctgtaggagaccgctcacc atcacttcccggcaagtcaggcatcag aaatgattagggtggtatcagcagaaacc	diqumtqspsslsasvdrviticrasqgirnd lgwyqqkpgkapklliyaastlqsgvpsrfs gsgsgtdfilitisslqpedfatyyccqsygap ltfgggtkveik	SEQ ID NO:81 (SEQ ID NO:82)

	agggaaagcccctaagctcctgatctatgc tgcacccacttgcaatcaggggtcccatca cgtttcagtgagcagtgatctgggacagat ttactctcaccatcagcagctgcaacctg aagattttgcaacttactactgtcaacagag ttacggtgccccctcacttccggcgagg taccaaggtggagatcaaa		
Варибельный домен тяжелой цепи DB86	caggtgcagctggtgcagctgggctga ggtgaagaagcctggggcctcagtggaag gtttcctgcaaggcatctggatatatgtca gtggcattctgcacactgggtgcgtcagg ccccctggacaaggcctgagtgatggga tggatgaaccctaacagtggtaacacagg ctatgcacagaagttccaggccgtgtcac catgaccgccgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctgcttct gaggacacggccgtgtattactgtcgag agatagcagtggtgtacgatgtcttga ctactggggccagggaccctgtcacc gtctcctca	qvqlvqsgaevkkgasvkvskasgym fsghsahwvrqapggglewmgwmnpn sgntgyaqkfgrvmttrdststsvymelss lrsedtavyycardssgwydvfdywgqgtl vtvss	SEQ ID NO:83 (SEQ ID NO:84)
DB86 CDR L1	cagggcatcagaaatgat	QGIRND	SEQ ID NO:85 (SEQ ID NO:86)
DB86 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:87 (SEQ ID NO:88)
DB86 CDR L3	caacagagttacggtgccccctc	QQSYGAPLT	SEQ ID NO:89 (SEQ ID NO:90)
DB86 CDR H1	ggatatatgttcagtgccattct	GYMFSGHS	SEQ ID NO:91

			(SEQ ID NO:92)
DB86 CDR H2	atgaaccctaacagtggaacaca	MNPNSGNT	SEQ ID NO:93 (SEQ ID NO:94)
DB86 CDR H3	gcgagagatagcagtggtgtacgatgtctttgactac	ARDSSGWYDVFYD	SEQ ID NO:95 (SEQ ID NO:96)
Варибельный домен легкой цепи DB280	gacatccagatgacccagctcctccctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagttagagcattagcagctatctgaattggtatcagcagaaccaaaggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtgccagtgatctgggacagatttcaactcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctctcacttccggcgaggtaccaaggtggagatcaaa	dqmtqspsslsasvdrvitcrasqsissyl nwyqqkpkpkaplliyaasslqsgvpsrfs gsgsgtdflltisslqpedfatyycqqsyspl tfgggtkveik	SEQ ID NO:17 (SEQ ID NO:18)
Варибельный домен тяжелой цепи DB280	caggtgcagctggtgagctctgggctgaaggatgaagaagcctgggacctcagtgaaagtttctgcaaggcatctggatacagcctcaactatactatagcactgggtgctcaggcccctggacaaggcctgagtgatgggatggatgaaccctaacagtggtaacacagctatgcacagaagttccaggccgtgtcacatgacccgacacgtccacgagcagatgtctacatggagctgagcagcctgctgtgaggacacggcctgtattactgtgagcctcgattgtagtggtgtagctgtactccgaatgatgcttttgatctgggccaaggaccacggtcaccgtcctca	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgyslnlyymhwvrqapggglewmgwmnpsgntgyaqkfqgrvtmtrdtststvmelsslrsedtavyycaslscsgscyseydafdiwgggtvtvss	SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98)

DB280 CDR L1	cagagcattagcagctat	QSISSY	SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:22)
DB280 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:23 (SEQ ID NO:24)
DB280 CDR L3	caacagagttacagtaccctctcact	QSYSTPLT	SEQ ID NO:25 (SEQ ID NO:26)
DB280 CDR H1	ggatacagcctcaactatactat	GYSLNLYY	SEQ ID NO:99 (SEQ ID NO:100)
DB280 CDR H2	atgaaccctaacagtggtaacaca	MNPNSGNT	SEQ ID NO:101 (SEQ ID NO:102)
DB280 CDR H3	ggagacctcgattgtagtggtagctgc tactccgaatgatgctttgatac	ASLDCSGGSCYSEYDAFDI	SEQ ID NO:103 (SEQ ID NO:104)
Вариабельн ый домен легкой цепи DB331	gacatccagatgaccagctcctcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcacttcccggcaagttagcagcattagc agctatctgaattggtatcagcagaaacca gggaaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatccagttgcaaagtgggtcccatca agggtcagtggcagtgatctggacaga ttcactctcaccatcagcagctgcaacct gaagatttgcacttactactgcaacaga gttacagtaccctctcactttcggcggag	dqmtqspsslsasvdrvttitcrasqsissyl nwyqqkpkapkllyaaasslqsgvpsrfs gsgsgtdfilitisslqpedfatyycqqsystpl tfgggtkveik	SEQ ID NO:17 (SEQ ID NO: 18)

	gtaccaaggtggagatcaaa		
Вариабельный домен тяжелой цепи DB331	cagggtgcagctgggtgcagctggggctgagggtgaagaagcctgggacctcagtgagggttctctgcaaggcatctggatacacctcaccagctactatagcactgggtgctcaggcccctggacaaggcctgagtgatgggattggatgaaccctaacagtggtaacacagctatgcacagaagttccaggccgtgtcacatgaccccgacacgtccacgagcagatgtctacatggagctgagcagcctgctctgaggacacggcctgtattactgtgcaacagatctcgggggaagcctgttcgaccctggggccaggccaccctgtcaccgtctctca	qvqlvqsgaevkkpgasvkvscasgyftsyymhwvrqapggglewmgwmnpnsgntgyaqkfqgrvmttrdtststvmelssrsedtavyycatdlagealfdpwgqgtlvvss	SEQ ID NO:105 (SEQ ID NO:106)
DB331 CDR L1	cagagcattagcagctat	QSISSY	SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:22)
DB331 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:23 (SEQ ID NO:24)
DB331 CDR L3	caacagagttacagtaccctctcact	QSYSTPLT	SEQ ID NO:25 (SEQ ID NO:26)
DB331 CDR H1	ggatacaccttcaccagctactat	GYTFTSY	SEQ ID NO:107 (SEQ ID NO:108)
DB331 CDR H2	atgaaccctaacagtggtaacaca	MNPNSGNT	SEQ ID NO:109 (SEQ ID NO:110)

DB331 CDR H3	gcaacagatctcgggggaagccttgtt cgacccc	ATDLAGEALFDP	SEQ ID NO:111 (SEQ ID NO:112)
Вариабельн ый домен легкой цепи DB415	gacatccagatgaccagctctccatcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcacttgccgggcaagtccagagcattagc agctatctgaattggtatcagcagaaacca gggaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatccagtttcaaagtgggtcccatca agggtcagtgccagtgatctgggacaga ttcactctcaccatcagcagctcgaacct gaagattttgcaacttactactgtcaacaga gttacagtagccctctcacttccggcgag gtaccaaggtgagatcaaa	dqmtqspsslsasvdrvtrtcrasqissyl nwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfs gsgsgtdftltisslqpedfatycqqsystpl tfgggtkveik	SEQ ID NO:17 (SEQ ID NO:18)
Вариабельн ый домен тяжелой цепи DB415	gaggtgcagctggtgagctcggggag gcttggtacagcctgggggtccctgctgc ctctctgtgcagcctctggaatcacctca gtagttatggcatgattgggtccgaggg ctccagggaaagggtgagtggtctca ggtattagttggaatagtgtaacagagtct atgtggactctgtgaaggccggtcacca tctcccgcacaattccaagaacacgctgt atctgcaaatgaacagcctgcgcgag gacacggcgtatattactgtgcgagagat actaatgatgcttttgatatctgggccaag ggaccacggtcacgtctctca	evqlvesggglvqpgslrlscaasgltfssy gmhwrqapkglewsvsgiswnsgnrv yvdsvkgrftisrdnsknlylqmnlraedt avyycardndafdiwgqgtvtvss	SEQ ID NO:113 (SEQ ID NO:114)
DB415 CDR L1	cagagcattagcagctat	QSISSY	SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:22)
DB415 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:23 (SEQ ID

			NO:24)
DB415 CDR L3	caacagagftacagtaccctctcact	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 25 (SEQ ID NO:26)
DB415 CDR H1	ggaatcaccttcagtagttatggc	GITFSSYG	SEQ ID NO:115 (SEQ ID NO:116)
DB415 CDR H2	attagttggaatagtgtaacaga	ISWNSGNR	SEQ ID NO:117 (SEQ ID NO:118)
DB415 CDR H3	gcgagagataactaatgatctttgatatc	ARDTNDAFDI	SEQ ID NO:119 (SEQ ID NO:120)
Вариабельн ый домен легкой цепи DB435	gacatccagatgaccagctccatcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagatcacc atcacttgcgggcaagttagagcattagc agctatctgaattggtatcagcagaaccca gggaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatccagtttgcaaaagtggtgccatca agggtcagtgagcagtgatctgggacaga ttcactctcaccatcagcagctctgcaacct gaagattttgcaacttactactgtcaacaga gttacagtaccctctcacttcggcggag gtaccaaggtgggatcaaa	dqmtqspsslsasvdrvitcrasqsissyl nwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfs gsgsgtdfttisslqpedfatyycqqstpl tfgggtkveik	SEQ ID NO:17 (SEQ ID NO:18)
Вариабельн ый домен тяжелой цепи DB435	caggtgcagctggtgcagctctgggctga ggtgaagaagcctgggacctcagtgaaag gttctctcaaggcatctggaggcaccttc agcagctatgctatcagctgggtgcctcag gcccctggacaaggcttgatggatggg ctggatccccctcaaatgtaacataaa	qvqlvqsgaevkpgasvkvscasggf ssyaiswvrqapggglewmgwitphngn ikyarefqgrvmttrdtststvmelsslrse dtavyycakdlwnaafdywgqglvtvs s	SEQ ID NO:121 (SEQ ID NO:122)

	gtatgcacgggagttccaggccgtgtca ccatgacccgcgacacgtccacgagcac agtctacatggagctgagcagcctgcgttc tgaggacacggccgtgtattactgtgcgaa agatctgaactggaacgcagcctttgacta ctggggccaggggaccctgtcaccgtct cctca		
DB435 CDR L1	cagagcattagcagctat	QSISSY	SEQ ID NO: 21 (SEQ ID NO:22)
DB435 CDR L2	gctgcatcc	AAS	SEQ ID NO:233 (SEQ ID NO:24)
DB435 CDR L3	caacagagttacagtaccctctcact	QSYSTPLT	SEQ ID NO: 25 (SEQ ID NO:26)
DB435 CDR H1	ggaggcaccttcagcagctatgct	GGTFSSYA	SEQ ID NO:123 (SEQ ID NO:124)
DB435 CDR H2	atcacccctcacaatgtaacata	ITPHNGNI	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO:126)
DB435 CDR H3	gcgaaagatctgaactggaacgcagcctti gactac	AKDLNWNAAFDY	SEQ ID NO:127 (SEQ ID NO:128)
OMT1 VHVL x TSC456	atggaagcaccagcgcagcttctctctc ctgctactctggctcccagataccaccgt gaggtgcagctgttgagctctggggagg	evqllesggglvppgslrlscaasgftfsy gmswvrqapgklegvsaisgsgstyya dsvkgrftisrdnskntlylqmnsraedtav	SEQ ID NO:129 (SEQ ID

<p>scFv-Fc- scFv TRII29</p>	<p>cttggtagacctgggggtccctgagact ctcctgtgcagcctctggattcacctttagc agctatggcatgagctgggtccgccaggc tccagggaaggggctggaggggctca gctattagtggtagtgggtgtagcacatact acgcagactccgtgaaggccggttcacc atctccagagacaattccaagaacacgctg tatctgcaaatgaacagcctgagagccga ggacacggccgtatattactgtcgaaag aaaagtacgatattttgactggttatccgat gcttttgatactgggccaaggacaatg gtcaccgtctctcaggtggagggcgttca ggcggagggtggtccggcgggtggcggct ccggtggcggcgatctgacatcgtgatg accagctccagactccctggctgtgtctc tggcgagagggccaccatcaactgcaa gtccagccacaggttttatacagctccaac aataagaactacttagctgtgtaccagcag aaaccaggacagcctcctaagctgctcatt tactggcatctaccgggaatccgggtg ccctgaccgattcagtgccagcgggtctg ggacagattcactctaccatcagcagcc tgcaaggctgaagatgtggcagtttattactg tcagcaatattatagctcctccgaccactt tcggcggagggaccaaggtggagatcaa atcctcgagtgagccaaatctctgacaa aactcacacatgcccaccgtgccagcac ctgaaaccgcgggtgcaccgtcagctctc ctctcccccaaaaccaaggacaccctc atgatctccggaccctgaggtcacatgc gtggtgggtgacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagtcaactgtactgtgacg gctggagggtgcataatccaagacaaag ccgaggagagcagtaacacagcacgt accgtggtgagcgtcctcaccgtcctgc</p>	<p>yycakeklryfdwlsdafdiwgqtmvtv ssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdivmtq spdslavslgeratincksshsvlyssnnkn ylawyqqkpgppklliywastresgvpd rfssgsgtdfltlisslqaedvavycqyy stpptfgggtkveiksssepksdkthtcpp cpapeaagapsvflfppkpkdlmistrpe vtcvvvdshedpevkfnwyvdgvevhn aktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlng keykcavsnkalpapiektiskakqprep qvytlpprsdeltnqvsltlvkgfypsdia vewesngqpennyktpvldsdgsfflys kltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnht qkslspsgsgsgsgsgsgsgsgspqv qlvqsgpevkkgpssvkvscasgytfsrs tmhwvrqapggglewiyyinpsaytny nqkfkdrvritadkststaymelslrseda vyycarpqvydyngfpywgqgtlvtvss ggsgsgsgsgsgsgsgsgsdiqmtqsp stlsasvdrvtmcsasssvsymnwyqq kpgkapkrwiydssklasgvprfsgsgsg tdytlfisslqppdfatyycqqwsmppftgg gtkveikrs</p>	<p>NO:130)</p>
-------------------------------------	---	---	----------------

<p>accaggactggctgaatggcaaggaatac aagtgcgcggtctccaacaaagccctccc agcccccacgagaaaacatctcaaaag ccaaaggcagccccgagaaccacaggt gtacacctgccccatccgggatgagc tgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc ctggtcaaaaggcttctatccaagcgacatc gccgtggagtgggagagcaatgggcagc cggagaacaactacaagaccacgcctcc cgtgctggactccgacggctcttctctc tacagcaagctaccgtggacaagagca ggfggcagcaggggaactcttctatgct ccgtgatcatgaggctctgcacaaccact acacgcagaagcctctccctgtctccg ggtfccggaggggggttcaagtgggg gagggtctggcggcggggaagccctca caggtgcaactggtcagagtgaccg aggftaaaaaacaggctctcgttaagg ttagctgcaaacctctggtacacatttc caggagtacaatgactgggtgagcag gctcctggacagggactcagtgatcgg gtatatcaacctctagcgcctataccaat tacaacaaaagttaaggaccgagttacc attaccgtgacaaatccaccagtacagct tatatggagctgtcatcttaggtccgagg aactgctgtttactcgcctcgcctcag gttactatgactataatggtttccctactg gggtcagggaaacctggtgactgtctctc tggcgggtgagcagcgggtgggggtgg gctlgaggcggggcaglgcggcggga ggctctgatattcagatcactcagctccta gcactctcagcggcagcgtggggatcgt gtgacaatgactgctccgctagcagtagt gtgtcttcatgaattggtatcagagaagc ccgggaaagcacctaagcgtgcatctat</p>		
--	--	--

	<p>gactctccaagctggcaagtggtgcccc tcacggttctctggctcaggttctggtactg actatacttgactatctcctccctccagccc gatgattcgctacattattgctcagcagtg gagccgtaaccaccacttccggaggcg gtaccaaagtgagatcaagaggtcataa</p>		
<p>OMT1 VLVH x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI130</p>	<p>atggaagcaccagcgcagcttctctctc ctgctactctggctcccagataccaccggt gacatcgtgatgccagctccagactcc ctggctgtctctggcgagaggccac catcaactgcaagtcaccacagctgfttta tacagctccaacaataagaactacttagctt ggtaccagcagaaccagcagacgcctct aagctgctcattactgggcatctaccggg gaatccggggtccctgaccgattcagtg cagcgggtctgggacagattcactctcac catcagcagcctcagcgtgaagatggtg cagtttattactgtcagaatattatagtactc ctccgaccacttccgggggggaccaag gtggagatcaaaagtgagggcgttcag gcggaggtggatccggcgtggtcgcgctc cgggtgcccggatctgaggtgcagctgt tggagtctggggaggcttgggtacacct ggggggtccctgagactctcctgtgcagc ctctggattcacctttagcagctatggcatg agctgggtccgccaggtccagggagg ggctggagggggtctcagctattagtgtgta gtggtgtagcacaactacgcagactcc gtgaaggccggttcacatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaat gaacagcctgagagccgagacacggc cgtatattactgtcgaagaaaagtacg atatfttgactggtatccgatgctttgatac tggggccaaggacaatggtcaccgtctc</p>	<p>divmtqspdslavslgeratincksshsvly ssnknlylawyqqkpgppklliywastr esgvpdrfsgsgtdflitisslqaedvavy ycqqyystpftfgggkveikggsgsgg gsgggsgggsevqll esggglvpggsl rlscasgftfssygmswvrqapgklegv saisgsgstyadsvkgrftisrdnskntly lqmnslraedtavyyakeklryfdwlsda fdiwqgtmvtvsssepksdkthtppcp apeaagapsvflfppkpkdltmirsrpevtc vvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnakt kpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkey kcavsnkalpapiektiskakgpprepqvy tlpprsdeltnqvsltlvkgyfypsdiave wesngqpennyktppldsdgsfflysklt vdkrwrqqgnvfscsvmhealhnyhtqk slslspgsgggsgggsgggsggspsvqlv qsgpevkkpgssvkvscasgytfrstm hwvrqapqglewiyinpsaytnynqk fkdrtvitadkststaimelsslrsedtavy carpqvydyngfpywgqgtlvtvssggg gsgggsgggsgggsgggdiqmtqspstls asvdrvtmtcsasssvsymnwyqkpg kapkrwiydssklasvpsrfsrgsgsgtdyt ltisslqpddfatyqcqqrmpptfgggk veikrs</p>	<p>SEQ ID NO:131 (SEQ ID NO:132)</p>

	<p>ctcgagtgagcccaaatcttctgacaaaac tcacacatgcccaccgtgcccagcacctg aagccgagggtgcaccgtcagcttctct tcccccaaaaccaaggacaccctcatg atctccggaccctgaggtcacatgcgtg gtggtggacgtgagccacgaagaccctg aggtcaagttcaactggtacgtggacggc gtggaggtgcataatgccaagacaaaaggc gctggaggagcagtaacaacgacgtac cgtgtgtgcagctctcaccgtctgcac caggactggctgaatggcaaggaatacaa gtgctgctgctccaacaaaagccctccag ccccatcgagaaaacctctccaagcc aaaggcgagccccgagaaccacaggtgt acacctgccccatcccggatgagctg accaagaaccaggtcagcctgacctgct ggtcaaaggcttctatccaagcagatcgc cgtggagtgaggagcaatggcgagccg gagaacaactacaagaccacgctccctg gctggactccgacggctcttctctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggt ggcagcaggggaaacttctcatgctcc gtgatgatgagctctgcacaaccactac acgcagaagagcctctccctgtctccgggt tccggaggaggggtcaggtgggggag gttctggcgggggaaagcccttcacag gtgcaactggtgcagagtgagcccaggt taaaaaccagggtcctccgftaagggttag ctgcaaacctctggctacacatttccagg agtacaatgcactgggtgagcaggctcc tggacagggactcagtgatcgggtata tcaaccatctagcctataccaattaca ccaaaagtttaaggaccgagttaccattac cgctgacaaatccaccagtacagcttatat ggagctgtcatcttaggtccgaggacac</p>		
--	---	--	--

	<p>fgctgtttactctcgcctcctcaggttc actatgactataatggtttccctactggggt cagggaaacctggtgactgtctctctggc ggtggagcagcgggtgggggtgggtctg gaggcgggtgagcagtgccggcggaggct ctgattcagatgactcagctcctagcac tctcagcggcagcgggggatcgtgtga caatgactgtctcggtagcagtagtgtgc ttacatgaattggtatcagcagaagccggg gaaagcacctaagcgtggatctatgactc ttcaaagctggcaagtgggtgtccctcacg ggtctctggtcaggttctgtactgactata cttgactatctcctccctccagccgatgat ttcgtctactattatgtcagcagtgagacc gtaaccacccactttcggaggcgggtacc aaagtggagatcaagaggtcataa</p>		
<p>DB8 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI123</p>	<p>atggaagcaccagcgcagcttctctcctc ctgctactctggtcccagataccaccggt caggtgcagctggtcagcttggggctga ggtgaagaagcctgggcctcagtgaaag gtttcctgcaagcactctggatacatctca ccgactactatagcactgggtgctcaggg cccctggacaagggcttgaaggatggga tggatgagccctaacagtgtaacacagg ctatgcacagaagttccagggccgtgtcac catgacccgcgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctgcgttct gaggacacggcgtgtattactgtgcgag agatcgccgggattacgggtgactacgttgc ttttgatatctgggccaaggacaatggt caccgtctctcagcggcggcggcagc ggcggcggcggcagcggcggcggagg ctccggcggcggcggcagcagatccag atgaccagctctccctcctctctgcat</p>	<p>qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgyift dymhwvrqapqglewmgwmspns gntgyaqkfqgrvtmtrdststvmelssl rsedtavyyccardaadydyvafdiwgqg tmvtvssggggggggggggggggsdi qmtqspsslsasvgdrvtitcrasqissyln wyqqkpkapkllyaaasslqsevpsrfs sgsgtdfltiisslqpedfatyyccqysystplf gggkveiksssepksdkthtppcpape aagapsvflfppkpkdlmirsrtpevtcvv dvshedpevkfnwyvdgvevhnaktpr eeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykca vsnkalpapiektiskakgqprepyvylpp srdeltknqvslctclvkgfypsdiavewesn gqpennyktpvldsdgsfflyskltvdks rwqqgnvfscsvmhealthhnytqkslsls pgsgggsgggsgggsggspsqvqlvqsg pevkkpgssvkvscasgytfsrstmhvw</p>	<p>SEQ ID NO:133 (SEQ ID NO:134)</p>

	<p>ctgtaggagacagatcaccatcactgcc gggcaagtcagagcattagcagctatctg aattggtatcagcagaaccagggaagc ccctaagctcctgatctatgctgatccagt ttgcaaagtgggtccatcaagggtcagt ggcatggatctgggacagattcactctc accatcagcagctgcaacctgaagatttg caacttactactgtcaacagagttacagtac ccctctcacttccggcggagtaccaaggt ggagatcaaatcctcgagtggcccaaat ctctgacaaaactcacacatgccaccgt gcccagcacctgaagccgggtgcacc gtcagtcttctctcccccaaaaccaag gacacctcatgatctccggacctga ggtcacatgctggtgggtgacgtgagcc acgaaaccctgaggtcaagttcaactggt acgtggacggcgtggaggtgcataatgcc aagacaaagcccgaggagcaatgac aacagcacgtaccgtggtcagcgtctc accgtctgcaccagactgctgaatgg caaggaatacaagtcgctgctccaaca aagccctccagccccatcgagaaaacc atctccaaagccaaggcagccccgag aaccacaggtgtacacctgccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtca gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatc caagcgacatgccgtggagtgaggagag caatggcagccggagaactacaag accacgctcccgctgactccgacgg ctcttctctctacagcaagctaccgtg gacaagcaggtggcagcaggggaac gtcttctatgctccgtgatgcatgaggctc tgcaacaactacacgcagaagagcctc tccctgtctccgggtccggaggaggggg ttcaggtggggaggttctggcggcggg</p>	<p>rqapggglewigyinpsaytynqkfkdr vtitadkfstaymelslrsedtavyycarp qvhydyngfpywgqgtlvtvssgggsg gggsgggsggggsdiqmtqspstlsasv gdrvtmtcsassvsymnwyqqkpkap krwiydssklasgvpsrfsrgsgtdytlis slqpddfatyycqwsrnpptfgggtkvei krs</p>	
--	--	--	--

	<p>ggaagcccttcacaggtgcaactggtgca gagtgaccggaggtfaaaaaccagggt cctccgtaaggttagctgcaaagcctctg gctacacatttccaggagtacaatgcactg ggtgaggcaggtcctgacagggactc gagtgatcgggtatatcaaccatctagc gcctataccaattacaacaaaagttaag gaccgagttaccattaccgctgacaaatcc accagtacagcttatatggagctgtcatctc ftaggtccgaggacactgctgtttactg cgctctcctcaggttcactatgactataat ggtttccctactggggtcagggaacctg gtgactgtctctctggcgggtgaggcagc ggtgggggtgggtctggaggcgggtggca gtggcggcggaggctctgatattcagatg actcagctcctagcactctcagcgcagc gtggggatcgtgtgacaatgactgtctcc gctagcagtagtcttcatgaattggt atcagcagaagcccgggaaagcacctaa gcgctggatctatgactctcagctggc aagtgggtccctcacggttctctggctca ggttctggtactgactatacttgactatctc ctccctccagcccgatattcgctacatt attgtcagcagtgaggccgtaaccacccc acttccggaggcgggtaccaagtggagat caagaggtcataa</p>		
<p>DB8 VLVH x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI124</p>	<p>atggaagcaccagcgcagcttctctcctc ctgctactctggctcccagataaccaccggt gacatccagatgaccagctcctcctcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcactgcccggcaagtacagcattagc agctatctgaattggtatcagcagaacca gggaaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatccagttgcaaagtggggtcccatca</p>	<p>diqumtqspsslsasvgrvutcrasqsisyl nwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfs gsgsgtdftitisslqpedfatyycqqysytpl tfgggtkveikgggsgggsgggsgggsggg gsqvqlvqsgaevkpgasvkvscasgy iftdyymhwvrqapggglewmgwmsp nsgntgyaqlfgrvmttrdtststvmels slrsedtavyycardaadygdyvafdiwgq</p>	<p>SEQ ID NO: 135 (SEQ ID NO: 136)</p>

<p>aggttcagtgccagtgatctgggacaga tttcactctcaccatcagcagctctgcaacct gaagattttgcaacttactactgtcaacaga gttacagtaccctctcacttccggcggag gtaccaagtgaggatcaaaaggcggcgg cggcagcggcggcggcggcagcggcgg gccgaggctccggcggcggcggcagcc aggtgcagctggtgagctctggggctgag gtgaagaagcctggggcctcagtgaaagt ttctcgaagcagctctggatactttcacc gactactatatgcactgggtgcctcagggc cctggacaaggcctgagtgatgggatg gatgagccctaacagtggtaacacaggct atgcacagaagtccaggccgtgcacc atgaccgcgacacgtccacgagcacagt ctacatggagctgagcagcctgcttctga ggacacggcctgtattactgtcgagag atgcggcggattacggtgactcgttgcctt tgatatctgggccaagggacaatggtca ccgtctctcagtgagcccaaatcttctga caaaactcacacatgccaccgtgccag cacctgaagccggcgggtcacctcagtc ttctcttcccccaaaaccaaggacacc ctcatgatctccggaccctgaggtcaca tgcgtggtggtgagcgtgagccagaaga ccctgaggtcaagtcaactggtacgtgga cggcgtggaggtgcataatgccaagacaa agccggggaggagcagtaacaacagca cgtaccgtggtgagcgtcctcaccgtcc tgcaccaggactggtgaatggcaaggaa tacaagtgcgggtctccaacaagccct cccagccccatcgaaaaacctctcca aagccaaaggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatccccggat gagctgaccaagaaccaggctcagcctga</p>	<p>gtmvtvsssepksdkthtccppapeaag apsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvdvs hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqdwlngkeykavsn kalpapiektiskakgqprepvytlppsrd eltknqvstclvkgfypsdiavewesngq pennykttppvldsdsfflyskltvdksrw qqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgs gggsgggsgggsgspsqvqlvqsgpev kkpqgsvkvsckasgytfsrstmhwrqa pgqglewiyinpsaytynqkfkdrvit adkststaymelslrsedtavyycarpqvh ydyngfpywgqgtlvtvssggsgggsgs gggsgggsgdiqmtqspstlsasvdrvt mtcasssvsymnwyyqqkpgkapkrwi ydsklasgvpsrfsrgsgsgtdytltlsslp ddfatyycqqsmpptfaggtkveikrs</p>	
---	---	--

	<p>cctgcctgggtcaaaggcttctatccaagcg acatgccggtggagtgaggagagaatgg gcagccgggagaacaactacaagaccacg cctcccgtgctggactccgacggctccttc ttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctc atgctccgtgatgcatgaggtctgcacaa ccactacacgcagaagagcctctccctgtc tccgggtccggaggagggggtcagggtg ggggagggtctggcggcgggggaagcc cttcacaggtgcaactggtgcagagtggga cccgaggtfaaaaaccagggtcctccgtt aaggttagctgcaaagcctctggctacaca tttccagagtacaatgcaactgggtgagg caggctcctggacagggactcgaaggat cgggtatatacccatctagcgcctatac caattacaacaaaagttaaggaccgagt taccattaccgtgacaaatccaccagtac agcttatatggagctgtcatctttaaggctc gaggacactgctgtttactgcgctcgtc ctgaggtcactatgactataatggtttccct actggggtcagggaaccctgggtactgtct cttctggcgtggaggcagcgggtgggggt gggctggaggcgggtggcagtgccggcg gaggctctgatattcagatgactcagctcc tagcactctcagcggcagcgtgggggatc ggtgacaatgacttgcctccgtagcagta gttgtcttacatgaattggtatcagcagaa gcccgggaaagcacctaagcgtggatct atgactctccaagctggcaagtgtgtcc cctcacggtctctggctcagggtctggtac tgactatacttgactatctcctccctcagc ccgatgattcgtacctattattgtcagcag tggagccgtaaccaccactttcggagg cgttaccaaagtggagatcaagaggtcat</p>		
--	---	--	--

	aa		
DB8 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI137	atggaagcaccagcgcagcttctctc ctgctactctggctcccagataccaccggt caggtgcagctggcagctggggctga ggggaagaagcctgggcctcagtggaag gtttctctcaaggcatctggatacatctca ccgactatatactgactgggtcgtcagg cccctggacaaggcctgagtgatggga tggatgagccctaacagtgtaacacagg ctatgcacagaagttccaggccgtgtcac catgaccgcgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctcgttct gaggacacggcctgtattactgtcgag agatgcggcgcattacgggactactgtgc ttttgatatctgggccaaggacaatggt caccgtctctcaggtggaggcgttcagg cggaggtgatccggcgtggcggctcc ggteggcgggatctgacatccagatgac ccagctccatcctcctgtctcatctgta ggagacagagtcaccatcacttccgggc aagtcagagcattagcagctatctgaattg gtatcagcagaaccaggaaagccccta agctcctgatctatgctgcatccagttgca aagtggggtccatcaagggtcagtgga gtggatctggacagatttactctcacat cagcagctgcaacctgaagatttgaact tactactgtcaacagagttacagtaccctc tacttfcggcggaggtaccaaggtggag atcaaatcctcagtgagcccaaatctctg acaaaactcacatgccaccctgcca gcacctgaagccgggtgacaccgtcagt cttctcttcccccaaaaccaaggacac cctcatgatctcccggaccctgaggtcac atcgtggtggtggagctgagccacgaag	qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgyift dymhwvrqapqglewmgwmspns gntgyaqkfqgrvtmtrdtststvmelssl rsedtavyycardaadydyvafdiwgqg tmvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdi qmtqspsslsasvdrvtitcrasqissyl wyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfs sgsgtdftlisslqpedfatyycqqsystplf gggtkveiksssepksdkthtccppape aagapsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvv dvshedpevkfnwyvdgvevhnaktpr eeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykca vsnkalpapiektiskakgqprepvytlpp srdeltknqvslclvkgfypsdiavewes gqpennyktppvl dsdgsfflyskltvdk rwqqgnvfscvmhealhnhytqksls pgsgggsgsgsgsgsgsgspvqlvqsg pevkkpgsvkvscasgytfsrstmhww rqapqglewigyinpssaytnynqkfkdr vtitadkststymelsslrsedtavyycarp qvhydyngfpywgqgtlvtvssggsgsg ggsgsgsgsgsgsgdiqmtqspstlsasv gdrvtmtcsassvsymnwyqqkpgkap krwiydssklasgvpsrfsrgsgtdytlis slqpddfatyycqwsrnpptfgggtkvei krs	SEQ ID NO:137 (SEQ ID NO:138)

<p> acccctgagggtcaagttcaactggfctgg acggcgtggagggtgataatgccaagaca aaagcccgaggaggagcagtacaacagc acgtaccgtgtgtcagcgtcctcaccgtc ctgcaccaggactggctgaatggcaagga atacaagtgccggtctccaacaaagccc tccagccccatcgagaaaacctctcc aaagccaaagggcagccccgagaacca caggtgtacacctgccccatcccggga tgagctgaccaagaaccaggcagcctga cctgcctggtcaaggtcttccaagcg acatgccgtggagtgaggagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccag cctcccgtgctggactccgacggctcttc ttccttacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcagggaacgtttctc atgctccgtgatgcatgaggctctgcaca cactacacgcagaagagcctccctgtc tccgggtccggaggagggttcagggtg ggggaggtctgctggcggcggggaagcc cttcacaggtgcaactggtgagagtgga cccaggttaaaaaaccagggtcctccgtt aaggttagctgcaaacctctggctacaca tttcagaggtacaatgcaactgggtgagg caggctcctggacaggactcagtgatgat cgggtatatcaacctctagcgcctatac caattacaacaaaagttaaggaccgagt taccattaccgtgacaaatccaccagtac agcttatatggagctgtcatcttaggtcc gaggacactgtgtttactgcgtctgtc ctcaggttactatgactataatggtttccct actgggtcagggaacctggtgactgtct cttctggcgggtgagcagcgggtgggggt gggtctgagcgggtgagcagtgccggcg gaggtctgatattcagatgactcagctcc </p>		
---	--	--

	<p>tagcactctcagcgcaccagcgtggggatc gtgtgacaatgacttgcctcctagcagta gtgtgtcttacatgaattggtatcagcagaa gccccgggaaagcacctaagcgtggatct atgactctccaagctggcaagtgggtgcc cctcacggttctctggctcaggttctgttac tgactatactttgactatctcctccctcagc ccgatgatttcgctacattattgtcagcag tggagccgtaaccaccacttccggagg cgggtaccaaaagtgagatcaagaggtcat ga</p>		
<p>DB60 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI125</p>	<p>atggaagcaccagcgcagttctctcctc ctgtactctggctcccagataaccaccgt caggtgcagctggtgcagctggggctga gggtaagaagcctggggcctcagtgaaag gtttctgcaaggcatctggatacaccttca ccagctactatagcactgggtgcgtcagg cccctggacaagggcctgagtgatgggg tggatcaaccctaacagtggtgacacaag ctatgcacagaagttccaggccgtgtcac catgaccgcgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctcgttct gaggacacggcctgtattactgtgcgca ggatagtagtgggtccgggcttttgatac tggggccaagggacaatgtcaccgtctc ttcaggcggcggcggcagcggcggcgg cggcagcggcggcggagcctccggcgg cggcggcagcgacatccagatgaccag tctccatctccctgtctgcatcttaggag acagagtcaccatcacttccgggcaagt cagagcattagcagctatctgaattggtac agcagaaccaggaaagcccctaagct cctgatctatgctgcatccagtttcaaagt ggggtcccatcaaggttcagtgagtgagg</p>	<p>qvqlvqsgaevkkpgasvkvscasgyft syymhwvrqapqglewmgwinpnsq dtsyaqkfgrvmttrdststvmelsslr edtavyycaqdsqsgafdiwgqgtmvtv ssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdiqmtq spsslsasvdrvtiterasqsissylwyqq kpgkapklliyaasslqsgvprfsgsgsgt dftltisslqpedfatyycqssystpltfgggt kveiksssepksdkthtccppapeaaga psvflfppkpdltlmsrtpevtcvvvdvsh edpevkfhwvydgvvhnaktkpreeqy nstyrvvsvtlvhqdwlngkeykcavsnk alpapiektiskakgqprepvytlppsrd ltnqvsltelvkgfypsdiavewesngqp ennykttppvldsdgsfflyskltdksrwq qgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgsg ggsgsgsgsgsgsgspvqlvqsgpevk kpgssvkvscasgytfsrstmhwwvrqap gqglewiyinpsaytnynqkfkdrvtita dkststaymelssrsedtavyycarpqvyhy dyngfpywgqgtlvtvssggsgsgsgsgsg ggsgsgsgsdiqmtqspstlsasvdrvt mtcsasssvsymnwyqqkpgkapkrwi</p>	<p>SEQ ID NO: 139 (SEQ ID NO: 140)</p>

<p>atctgggacagatttactctcaccatcagc agtctgcaacctgaagatttgcaacttact actgtcaacagagttacagtaccctctca cttcggcggaggtaccaaggtggagatc aaatcctcagtgagcccaatctctgac aaaactcacatgcccaccgtgccacc acctgaagccgcgggtgaccgtcagtct tcctttccccaaaaccaaggacaccc tcatgatctcccgaccctgaggtcacat gctgtgtgtggcgtgagccacgaaga ccctgaggtcaagttcaactgtactgtga cggcgtggaggtgataatgccaaagaca agccggggaggagcagtacaacagca cgtaccgtgtgtcagcgtctcaccgtcc tgcaccaggactggctgaatggcaaggaa tacaagtgcgcggtctccaacaagccct cccagccccatcgagaaacatctcca aagccaaaggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatccgggat gagctgaccaagaaccaggtcagcctga cctgcctggtcaaaggcttctatcaagcg acatgccgtggagtgaggagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacg cctccgtgtggaactccgacggctcttc ttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaactcttctc atgctccgtgatgatgaggtctgcacaa ccactacgcagaagacctctccctgtc tccgggtccggaggagggttcagggtg ggggaggttctggcggcgggggaagcc cttcacaggtgcaactggtgcagagtga cccgaggttaaaaaccaggtcctccgtt aaggttagctgcaaagcctctggctacaca tttccagagtacaatgcactgggtgagg caggctcctggacaggactcagtgat</p>	<p>ydsklasgvpsrfsrgsgtdytltiisslqp ddfatyycqwsrnpptfgggtkveikrs</p>
--	--

	<p>cgggfatatcaacccatctagcgcctatac caattacaacaaaagtftaaggaccgagt taccattaccgctgacaaatccaccagtac agcttatatggagctgtcatctttaggtcc gaggacactgctgtttactgctcctc ctcaggttcactatgactataatgftttccct actggggtcagggaaacctggtgactgtct cttctggcggggaggcagcgggtgggggt gggtctggaggcgggtggcagtgccggcg gaggctctgataatcagatgactcagtctcc tagcactctcagcggcagcgtgggggac gtgtgacaatgactgtccgctagcagta gtgtgtctcatgaattggtatcagcagaa gccccggaaaacacctaagcgtggatct atgactctccaagctggcaagtggtgtcc cctcacggttctctggctcaggttctgtac tgactatacttgactatctcctccctcagc ccgatattcgctacattattgtcagcag tggagccgtaaccaccactttcggagg cgggtaccaaaagtggagatcaagaggtcat aa</p>		
<p>DB65 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI126</p>	<p>atggaagcaccagcgcagcttctctcctc ctgctactctggctccagataccaccggt caggtgcagctggtgcagctggggctga ggtgaagaagcctggggcctcagtgaaag gtttctctcaaggcatctggatacacctca ccggctactatagcactgggtgcgtcagg cccctggacaaggcctgagtgatggga tggatgaaccctaacagtgtaacacagg ctatgcacagaagtccaggccgtgtcac catgaccgcgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctgcttct gaggacacggcgtgtattactgtcgaa agaggaaccgattttggagtggtatggat</p>	<p>qvqlvqsgaevkpkpgasvkvscasgyft gyymhwvrqapqglewmgwmpns gntgyaqkfqgrvtmtrdtststvmelssl rsedtavyycakeepifgvvmdafdiwgq gtmvtvssggsgggsgggsgggsgggsg diqmtqspsslsasvdrvtitcrasqissyl nwyqqkpkapkllyaaasslqsgvpsrfs gsgsgtdfilitisslqpedfatyycqysystpl tfgggtkveiksssepksdkthtppcpap eaagapsvflfppkpdftlmisrtpetcvv vdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktp reeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc avsokalpapiektiskakgqprepqvylp</p>	<p>SEQ ID NO:141 (SEQ ID NO:142)</p>

<p>gcttttgatatctgggccaaggacaatg gtcaccgtctcctcaggcggcgcgca ggcgggcgggcgagcggcgcgga ggctccggcgggcgagcagcatcc agatgaccagctctccatcctcctgtgc atctgtaggagacagagtccatcactg ccgggcaagttagagcattagcagctatct gaattggatcagcagaaccaggaaag ccctaagctcctgatctatgctcatccag tttcaaatgggtccatcaaggtcagt ggcagtgatctgggacagattcactctc accatcagcagctgcaacctgaagatttg caacttactctgcaacagagttacagtac ccctctcacttcggcgaggtaccaaggt ggagatcaaatcctcagtgagcccaat ctctgacaaaactcacacatgccaccgt gcccagcacctgaagccgggtgcacc gtcagctctctctcccccaaaaccaag gacaccctcatgatctccggaccctga ggtcacatgctggtggagtgagcc acgaagaccctgaggtcaagttcaactggt acgtggagcgcgtggagtgcataatgcc aagacaaagccgaggagagcagtac aacagcagctaccgtgtgagcagctcctc accgtcctgaccagactgctgaatgg caaggaatacaagtgcggtctccaaca aagccctccagccccatcgagaaaacc atctcaaaagccaaggcagccccgag aaccacaggtgtacacctgccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtca gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatc caagcgacatgccgtggagtgaggagag caatggcagccggagaacaactacaag accacgctcccgtgctgactccgacgg ctcttctctctacagcaagctcaccgtg</p>	<p>psrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewes ngqpennyktppldsdgsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhealthnhtqkslsls pgsgggsgggsgggsggspsqvlvqsg pevkkpgssvkvsckasgytfsrstmhww rqapggglewiyinpsaytynqkfkdr vtitadkststaimelsslrsedtavyycarp qwhydyngfpywgqgtlvtvssggggsg ggsgggsgggsgdiqmtqspstlsasv gdrvtmtcsassvsymnwyyqqkpgkap krwiydssklasgvpsrfsrgsgtdytltis slqpddfatyycqwsrnpptfgggtkvei krs</p>	
--	--	--

	<p>gacaagagcaggtggcagcaggggaac gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc tgacaaccactacacgcaagaagcctc tcctgtctccgggtccggaggaggggg ttcaggtggggagggttctggcggcggg ggaagccctcacaggtgcaactggtgca gagtgaccagggttaaaaaaccagggt cctccgtaaggtagctgcaaagcctctg gctacacatttccaggagtacaatgcaactg ggtgagcaggtcctcctggacagggactc gagtgatcgggtatataccaatctagc gectataccaattacaacaaaagtttaag gaccgagttaccattaccgtgacaaatcc accagtacagcttatatggagctgcatctc ttagtcaggagactgctgtttactg cgctcgtcctcaggtcactatgactataat ggfttccctactgggtcagggaacctg gtgactgtctctctggcgggtggaggcagc ggfeggggtgggtctggaggcgggtgca gtggcggcggaggctctgatattcagatg actcagctcctagcactctcagcggccage gtggggatcgtgacaaatgactgctcc gctagcagtagtcttaccatgaattggt atcagcagaagccgggaaagcacctaa gctgctgatctatgacttccaagctggc aagtggtgtcccctcacggtctctggctca ggftctggtactactatacttgactatctc ctccctcagccgatgattcgtactatt attgtcagcagtgagccgtaaccaccc acttccggaggcgtaccaagtggagat caagaggcataa</p>		
<p>DB82 VLVH x TSC456</p>	<p>atggaagcaccagcagcttctctcctc ctgctactctggctcccagataaccaccgt gacatccagatgaccagctcctcctcc</p>	<p>diquqtspsslsvgdvrtitcrasqinny lnwyqqkpgkapkliysastlqsgvpsrfs gsgsgdfltlisslqpedfatyychqsytspl</p>	<p>SEQ ID NO:143 (SEQ ID</p>

<p>scFv-Fc- scFv TRI127</p>	<p>ctgtctgcatctgtaggagaccgctcacc atcacttgcgggcaagtcagaccataaa caactattgaaactggtatcagcagaaacc agggaaagcccctaaagctcctgatctattct gcatctactttgcaaaagtggggtcccatca cgtttcagtgccagtgatctgggacagat ttcactctcaccatcagcagctcgaacctg aagatttgcacttactctgtcaccagag ttacactcactctcactttcggcggaggt accaaggtggagatcaaaaggcggcggc gcagcggcggcggcggcagcggcggc ggaggctccggcggcggcggcagcgg gtgcagctggtgagctctggggagcctt ggtagcctgggggtccctgcgctct cctgtgcagcctctgattcaccttagcag ctatgccatgagctgggtccgccaggctc cagggaaaggctggaagtgggtctcagft attagtccaatagtctgtctaggccatg cggactctggaaggccggtcaccatct cccgcgacaattccaagaacacgctgtatc tgcaaatgaacagcctgcgcccaggga cacggccgtatattactgtgcgagagtg ctatagcagctcggctgatctttgatct ggggccaaggacaatggtcaccgtctcc tcgagtgcgccaatctctgacaaaact cacacatgccaccgtgccagcacctga agcccggggtgcaccgtcagctctctctt cccccaaaaccaaggacaccctcatga tctccggaccctgaggtcacatgcgtg gtggtgacgtgagccacagagacctg aggtcaagttcaactggtacgtggacggc gtggaggtgcataatgccaagacaaagcc gcgggaggagcagtaacaagcagctac cgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgcac caggactggctgaatgcaaggatacaaa</p>	<p>tfgggtkveikgggsgggsgggsggg gsevqlvesggglvqpggslrlscaasgffs syamswvrqapgglewvsvisansagl ghadsvkgrftisrdnsntlylqmnsbrae dtavyyicarvgyssadafdiwgqtmvt vsssepksdkthtppcpapeaagapsvf lfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedp evkfhwyvdgvevhnaktkpreeqynst yrvsvltvlhqdwlngkeykcavsnkalp apiektiskakqprepvytlppsrdeltk nqvsltclvkgfypsdiavewesngqpen nyktpplvdsdgsfllyskltdksrwqqg nvfscsvmhealhnhytqkslslspgsgg sgggsgggsgpsqvqlvqsgpevkkp gssvkvscasgytfsrstmhwvrqapgq glewiyinpsaytynqkfkdrvitadk ststymelsslrsedtavyycarpqvhydy ngfpywgqgtlvtsggggsgggsggg sggggsdiqmtqspstlsasvgdrvtmtc sasssvsymnwyqqkpgkapkrwydss klasgvpsrfsrgsgtdytltlsslpddf at yycqqwsrnpptfgggtkveikrs</p>	<p>NO:144)</p>
-------------------------------------	--	--	----------------

	<p>gtgcgagggtccaacaagccctcccag ccccatcgagaaaacctctcaaaaggcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgt acacctgccccatcccggatgagctg accaagaaccaggtcagcctgacctgcct ggctaaaggcttatccaagcgacatcgc cgtggagtgaggagagaatgggcagccg gagaacaactacaagaccagcctccgt gctggactccgacggctccttctcctac agcaagctcaccgtgacaagagcaggt ggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggtctgcacaaccactac acgcagaagagcctctccctgtcgggt tccggaggagggggttcaggtggggag gttctggcggcggggaagccctcacag gtgcaactggcagagtgaccgaggt taaaaaaccaggtcctcgttaaggttag ctgcaaagcctctgctacacatttcagg agtacaatgactgggtgagcagcctcc tggacagggactcagtgatcgggtata tcaacctctagcgcctataccaattaca ccaaaagttaaggaccgagttaccattac cgctgacaaatccaccagtacagcttat ggagctgtcatcttaggtccgaggacac tgctgttattactgcgctcctcaggttc actatgactataatgfttccctactgggt cagggaaccctgggtactgtcttctggc ggggaggcagcgggggggtgggtctg gagcgggtgagcagtgccggcggaggct ctgatattcagatgactcagtcctagcac tctcagcggcagcgtggggatcgtgtga caatgactgtctccctagcagtagtgtgc ttacatgaattggtatcagagaagcccgg gaaagcacctaagcgtggatctatgactc ttcaagctggcaagtgtgtccctcacg</p>		
--	--	--	--

	<p>gttctctggctcagggtctgtactgactata ctttgactatctcctccctccagcccgatgat ttcgctacctattattgtcagcagtgagacc gtaaccacccactttcggaggcgtacc aaagtggagatcaagaggtcataa</p>		
<p>DB83 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI134</p>	<p>atggaagcaccagcgcagcttctctcctc ctgctactctggctcccagataccaccggt caggtgcagctggctcagctctgggctga ggtgaagaagcctgggctcagtgaaag gttctctcaagcactctggatacacctca ctagctatgctatgcaattggctcgtcagg cccctggacaaggctgagtgatgggga ctgttgatcctgaagatggtgaaacaatat atgcagagaagttccaggccgtgtcacc atgaccgcgacagctccacgagcacagt ctacatggagctgagcagcctgcttctga ggacacgcccgtgtattactgtgcgagac gaacgtattactatgatagtagtggtcccg ttatgctttgatctctgggccaaggacc acggctaccgtctctcagcggcggcggg cagcggcggcggcggcagcggcggcgg gaggctccggcggcggcggcagcagatgt tgtgatgactcagctccactctccctgcc gtcaccctggagagccggcctccatctc ctgaggtctatgtagagcctcctcatag taatggagacaactattggattggtacctg cagaagcaggcagctccacagctcct gatctatttgggttctaatcggcctccggg gtccctgaccgttctcagtgagtgatca ggcacagattttactgaaaatcagccgt gtggaggctgaggatgtgggtttattact gcatgcaagctacacactggccactcact tcggccctggtaccaaagtggatatcaaat cctcagtgagcccaaatctctgacaaaa</p>	<p>qvqlvqsgaevkpkgasvkvscasgytft syamhwvrqapggglewmgldpedge tiyaekfqrvmttrdtststvmelsslrse dtavyycarrryydssgsryafdiwgqgtt vtvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdvv mtqspslpvtppgepasiscrssqllhsngd nyldwylqkpgqspqlliygsnrasgvpd rfsrgsgsgdftlkisrveaedvgvyymqa thwplftgpgtkvdiksssepksdtkhtcp pcpapeaagapsvflfppkpdtlmisrtp evtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevh naktkpreeqnystyrvsvltvlhqdwln gkeykcavsnkalpapiektiskakgpre pqvytlppsrldeltnqvsltelvkgfypsdi avewesngqpennyktppldsdgsffly skltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhy tqkslslspgsgsgsgsgsgsgsgspqv qlvqsgpevkpkgskvscasgytfsrs tmhwvrqapggglewmglyinpsaytny nqkfkdrvtitadkststymelsslrseda vyycarpqvhydyngfpywgqgtlvtvss ggsgsgsgsgsgsgsgsgsgdiqmtqsp stlsasvdrvtmtcsassvsymnwyqq kpgkapkrwiydsklasgvpsrfsrgsgg tdytlitisslpddfatyycqqrwnpftgg gkveikrs</p>	<p>SEQ ID NO:145 (SEQ ID NO:146)</p>

ctcacacatgccaccgtgccagcacct gaagccgcgggtgaccgtcagctctct ctcccccaaaaccaaggacaccctcat gatctccggaccctgaggtcacatgct ggtggtggacgtgagccacgaagaccct gaggtcaagttcaactggtacgtggacgg cgtggagggtcataatccaagacaagc cgccggaggagcagtacaacagcacgta ccgtgtgtcagcgtcctcaccgtctgca ccaggactggctgaatggcaaggaataca agtgcgcggtctccaacaaagccctcca gccccatcgagaaaaccatctcaaaagc caaagggcagccccgagaaccacaggtg tacacctgccccatccgggatgagct gaccaagaaccaggtcagcctgacctgcc tggtaaaaggcttctatccaagcgacatcg ccgtggagtgggagcaatgggcagcc ggagaacaactacaagaccagcctccc gtgctggactccgacggctccttctcctt acagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaactcttctcatgctc cgtgatgcatgaggctctgcacaaccacta cacgcagaagagcctctccctgtctccgg gttccggaggaggggttcaggtggggg aggctctggcggggggaagccctcac aggtgcaactggtgcagagtgaccgga ggttaaaaaccagggtcctccgttaaggt tagctgcaaagcctctggctacacatttcc aggagtacaatgactgggtgaggcagg ctcctggacaggactcgaatggatcggg tataatcaaccatctagcgcctataccaatt acaacaaaaagttaaggaccgagttacca ttaccgtgacaaatccaccagtacagctt atatggagctgtcatctcttaggtccgagga cactgctgtttactctgcctcgtcctcagg		
--	--	--

	<p>ttcactatgactataatggtttccctactgg ggtcagggaaccctggtgactgtctctct ggcggtggaggcagcgggtgggggtggg tctggagcgggtggcagtgccggcggag gctctgatattcagatgactcagctcctag cactctcagcggcagcgtggggatcgtg tgacaatgacttgctccgtagcagtagtgt gtcttacatgaattggtatcagcagaagcc cgggaaagcacctaagcgtggtatctatg actctccaagctggcaagtgtgtccct cacggttctctggctcaggttctggfactga ctatacttgactatctcctccctcagcccg atgattcgcctacattattgtcagcagtg agccgtaaccaccacttccggagcggg taccaagtggagatcaagaggtcataa</p>		
<p>DB86 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRII28</p>	<p>atggaagcaccagcagctctctctctc ctgctactctggctccagataaccaccgt caggtgcagctggtcagctggggctga ggtgaaagcctgggcccctcagtgaa gtttctgcaaggcatctggatataatgtca gtggccattctgcacactgggtgcgtcagg cccctggacaaggcctgagtgatggga tggatgaaccctaacagtgtaacacagg ctatgcacagaagttccaggccgtgtcac catgaccgcgacacgtccacgagcaca gtctacatggagctgagcagcctgcttct gaggacagcggcgtgtattactgtcggag agatagcagtggtgtacgatgtcttga ctactggggccaggggaccctgtcacc gtctcctcaggtggaggcgttcaggcgg aggtggatccggcgtggcggctccggt ggcggcgatctgacatccagatgacca gtctcatcctcctgtctgcatctgtagga gaccgctcaccatcactgccgggcaag</p>	<p>qvqlvqsgaevkpgasvkvscasgym fsghsahwvrqapggglewmgwmpn sgentgyakfqrvtmtrdststvmelss lrsedtavyyccardssgwydvfdywgqtl vtvsagggsagggsagggsagggsdiq mtqspsslsasvdrvtitcrasqgirndlg wyqqkpgkapklliyaastlqsgvpsrfs sgsdftltisslqpedfatyycqqsygaplt fgggtkveiksssepksdkthtccpppap eaagapsvflfppkpdltlmsrtpevtcv vdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkp reeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykc avsnkalpapiektiskakgqprepvytlp psrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewes ngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls psggggsagggsagggspsqvqlvqsg pevkkpgssvkvscasgytfsrstmhww rqapggglewiyinpssaytnynqkfkdr</p>	<p>SEQ ID NO:147 (SEQ ID NO:148)</p>

<p>tcaggcgcacagaaatgatttaggttgat cagcagaaaccagggaagcccctaagc tcctgatctatgctgcatccactttgcaatca ggggtccatcacgtttcagtgagcagtgga tctgggacagatttactctcaccatcagca gtctgcaacctgaagattttgcaacttacta ctgtcaacagagttacgggtgccccctcac tttcgcgagggtaccaagggtgagatca aatcctcgagtgagcccaaatcttctgaca aaactcacacatgccaccgtgccagca cctgaagccgagggtgcaccgtcagctt cctctcccccaaaacccaaggcacacct catgatctccggaccctgaggtcacatg cgtggtggtgagcgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactgtactgtggac ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgaggaggaagcagfacaacagcac gtaccgtggtgagcgtcctcaccgtcct gcaccagactggctgaatggcaaggaat acaagtgcgggtctcaacaagccctc ccagccccatcgagaaaaccatctcaa agccaaggaggagccccgagaaccaca ggtgtacaccctgccccatccgggatg agctgaccaagaaccagggtcagcctgacc tgctgtgtaaaaggcttctatccaagcgac atcgccgtggagtgaggagcaatgggc agccggagaactacaagaccagcc tcccgtgctggactccgacggctccttctc ctctacagcaagctcaccgtggacaagag caggtggcagcaggggaacgtcttctcat gctccgtgatgcatgaggctctgcacaacc actacacgcagaagagcctcctcctgtctc cgggttccggaggagggggtcaggtgg gggaggttctgaggcgggggaagccct tcacaggtgcaactggtgcagagtgacc</p>	<p>vtitadkststaymelsslrstedtavyyarp qvydyngfpywgqtlvtvssggggsg ggsgggsgggsgdiqmtqspstlsasv gdrvtmcsassvsymnwyqqkpgkap krwiydssklasgvpsrfsrgsgsdytlis slqpddfatyycqwsrnpptfgggtkvei krs</p>
---	--

	<p>cgaggtaaaaaaccaggctcctccgftaa ggtagctgcaaagcctctggctacacattt tccaggagtacaatgcactgggtgaggca ggctcctggacagggactcagtgatcg ggtatatcaacccatctagcgcctatacca attacaacaaaagtttaaggaccagfta ccattaccgctgacaaatccaccagtag cttatatggagctgtcatcttaggtccga ggacactgctgtttactgcgctcgtcctc aggtcactatgactataatggtttccctact ggggtcaggaaccctggtgactgtctctt ctggcggaggagcagcgggtggggggg gtctggaggcgggtggcagtgccggcggga ggctctgatattcagatgactcagtcctta gcactctcagcgcagcgtgggggatcgt gtgacaatgactgtctccgtagcagtagt gtgtcttacatgaattggtatcagcagaagc ccgggaaagcacctaagcgtggatctat gactttcaagctggcaagtgggtccc tcacggttctctggctcaggttctggactg actatactttgactatctcctccctcagccc gatgatttcgctacattattgtcagcagtg gagccgtaaccaccactttcggaggcg gtaccaaagtggagatcaagaggtcataa</p>		
<p>DB280 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI131</p>	<p>atggaagcaccagcgcagcttcttctc ctgctactctggctcccagataaccagggt cagggtcagctggtgagctggggctga ggtgaagaagcctggggcctcagtgaaag gtttctcaaggcatctggatacagcctc aactatactatgactgggtcgtcagg cccctggacaaggccttgagtgatggga tggatgaaccctaacagtgtaacacagg ctatgcacagaagttccaggcgtgtcac catgaccgcgacacgtccacgacaca</p>	<p>qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgysl nlyymhwvrqapggglewmgwmnpn sgntgyaqkfggrvtmtrdtststvmelss lrsedtavyycaslcsggscyseydafdiw gqgtvtvssggsgggsgggsgggsgggg sdiqmtqspsslsasvdrvtiterasqsis ylnwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsr fsgsgtdfilitisslqpedfatyycqysyst pltfgggkveiksssepksdkthtppcp apeaagapsvflfppkpkdtlmiisrtpevtc</p>	<p>SEQ ID NO:149 (SEQ ID NO:150)</p>

<p>gtctacatggagctgagcagcctgcgttct gaggacacggccgtgtattactgtgag cctcgattgtagtggtgtagctgactacc gaatatgatcttttgatatctgggccaag ggaccacggctaccgtctcctcaggcggc ggcggcagcggcgccggcgagcgg cggcgaggctccggcgcgcgagcag cgacatccagatgaccagctcctcctc cctgtctgcatctgtaggagacaggtcac catcactgccggcaagtacagcattag cagctatcgaattggtatcagcagaacc agggaaagcccctaagctcctgatctatgc tgatccagtttcaaagtgggtccatc aaggtcagtgagcagtgatctgggacag attcactctaccatcagcagctcgaacc tgaagattttcaactactactgtcaacag agttacagtaccctctcactttcggcga ggtaccaagggtgagatcaaatcctcag tgagcccaaatcttctgacaaaactcac atgccaccgtgccagcacctgaagccg cgggtgaccgtcagcttctcttcccc aaaaccaaggacaccctcatgatctccc ggaccctgaggtcacatgctggtggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtca agttcaactggtacgtggacggcgtggag gtgcataatgccaagacaaaaccgagg aggagcagtacaacagcacgtaccgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagga ctggctgaatggcaaggaatacagtgcg cggctccaacaaagccctcccagcccc atcgagaaaaccatctcaagccaaagg gcagccccgagaaccaggtgtacacc ctgccccatcccggatgagctgaccaa gaaccaggtcagcctgacctgcctgtca aaaggctctatccaagcagatcgccgtgg</p>	<p>vvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnakt kpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkey kcavsnkalpapiektiskakgqprepvy tlppsrdeltnqvslclvkgfypsdiave wesngqpennykttppvlldsfflysklt vdksrwqqgnvfscsvmhealthnytk slslspgsgggsgggsgggsgpsqvqlv qsgpevkpssvkvsckasgytfsrstm hwvrqapqglewiyinpsaytnynqk fkdrvtitadkststaimelsslrsedtavy carpqvhydyngfpywgqgtlvtvssggg sgggsgggsgggsgggdiqmtqspstls asvdrvtmtcsassvsymnwyyqkpg kapkrwiydssklasgvpsrfsrgsgtdyt ltisslqpddfatyycqwsrnpptfgggk veikrs</p>	
--	---	--

<p> agtgggagagcaatgggcagccggaga acaactacaagaccacgcctcccgtctg gactccgacgctccttctctacagca agctcaccgtggacaagagcaggtggca gcaggggaacgtcttctcatgctccgat gcatgaggctctgcacaaccactacacgc agaagagcctctccctgtctccgggtccg gaggagggggtcaggtgggggaggttc tggcggcgggggaagcccttcacagtg caactggtgcagagtggaaccgaggttaa aaaaccagggtcctccgftaaggftagctg caaagcctctggctacacatttccaggagt acaatgcactgggtgaggcaggtcctgg acagggactcagtgatcggtatataca acccatctagcctataccaattacaacc aaaagtttaaggaccgagttaccattaccg ctgacaaatccaccagtaagcttatatgg agctgtcatctttaggtccgagacactg ctgtttactctgcctcctcaggttcac tatgactataatggtttccctactgggtca gggaaaccctggtactgtcttctggcgg tggaggcagcgggtgggggtggtctgga ggcgggtggcagtgccggcggagcctctg atattcagatgactcagctcctcagcacttc agcgcagcgtgggggacgtgtgacaat gactgtctccgtagcagtagtgtcttac atgaattggtatcagcagaagccgggaa agcacctaagcgtggatctatgactctcc aagctggcaagtgtgtcccctcacggttc tctggctcaggtctggtactgactatacttt gactatctcctccagcccgatgatttc gctacattattgtcagcagtgagccgta acccaccacttccgaggcggtaacaaa gtggagatcaagaggtcataa </p>		
---	--	--

DB331 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI132	atggaagcaccagcgcagcttctctcctc ctgctactctggctcccagataaccaccggt cagggtcagctggcagctctgggctga ggggaagaagcctgggctcagtgaaag gttctctcaaggcatctggatacacctca ccagctactatagcactgggtgctcagg cccctggacaaggcctgagtgatggga tgatgaaccctaacagtgtaacacagg ctatgcacagaagtccaggcctgtcac catgacccgcgacacgtccacgacaca gtctacatggagctgagcagcctcgttct gaggacacggcctgtattactgtgcaac agatctcgggggaaagcctgttcgacc cctgggcccaggcaccctgtcaccgtc tcctcagcggcggcggcagcggcggc ggcggcagcggcggcggaggtccggc ggcggcggcagcagatccagatgacc agtctccatcctcctgtctgcatctgagg agacagagtcaccatcactgcccggcaa gtcagagcattagcagctatctgaattgga tcagcagaaccagggaagcccctaag ctcctgatctatgctcatcagttgcaaa gtgggtcccataaggtcagtgagcagt ggatctgggacagattcactcaccatca gcagtctgcaacctgaagatttgcaacta ctactgtcaacagagttacagtacccttc actttcggcggggtaccaaggtgagat caaatcctcagtgagcccaatctctga caaaactcacatgcccaccgtgccag cacctgaagccgggtgacacgtcagtc ttccttcccccaaaaccaaggacacc ctcatgatctccggaccctgaggtcaca tgcgtggtggtgacgtgagcccaaga ccctgaggtcaagttcaactgtacgtgga cggcgtggaggtcataatgccaagacaa	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgyft syymhwvrqapqglewmgwmnpns gntgyaqkfqgrvmttrdtststvmelssl rsedtavyycatdlagealfdpwgqgtlvtv ssgggsgggsgggsgggsgggsgdiqmtq spsslsasvdrvttitcrasqssylnwyqq kpgkapklliyaasslqsgvpsrfsrgsgst dflltisslqpedfatyycqqsystpltfgggt kveiksssepksdkthtppcpapeaaga psvflfppkpkdtlmisrtpvctvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqy nstyrvsvltvlhqdwlngkeykcavsnk alpapiektiskakgpprepqvylppsrde ltkqvsltclvkgfypsdiavewesngqp ennykttppvl dsdgsfflyskltvdksrwq qgnvfscsvmhealhhnytqkslslspgsg ggsgggsgggsgggsgpsvqlvqsgpevk kpgssvkvscasgytfrstmhwvrqap ggglewiyinpsaytnynqkfkdrvita dkststaymelsslrsedtavyycarpqvhy dynghfywgqgtlvtvssgggsgggsgg ggsgggsgdiqmtqspstlsasvdrv mtcsasssvsymnwyqqkpgkapkrwi ydssklasgvpsrfsrgsgstgdytlltisslqp ddfatyycqqsrmptfgggtkveikrs	SEQ ID NO:151 (SEQ ID NO:152)
---	--	--	--

agccgcgggagagcagtacaacagca cgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcc tgcaccaggactggctgaatggcaaggaa tacaagtgcgcggtctccaacaaagccct cccagccccatcgagaaaaccatctcca aagccaaaggcagccccgagaaccac aggtgtacaccctccccatccgggat gagctgaccaagaaccaggtcagcctga cctgcctggtcaaaggcttctatccaagcg acatcgcctgagtgaggagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacg cctcccgtgctggactccgacggctcttc ttccttacagcaagctaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctc atgtcctgatgatgaggtctgcacaa ccactacacgagaagagcctctcctgtc tccgggtccggaggagggggtcaggtg ggggagggtctgcccgggggaagcc cttcacaggtgcaactggtgcagagtgga cccagggttaaaaaccagggtctccggt aagggttagctgcaaagcctctggctacaca tttccaggagtacaatgcactgggtgagg caggctcctggacagggactcagtgat cgggtatatcaacccatctagcgcctatac caattacaacaaaagttaaggaccgagt taccattaccctgacaaatccaccagtac agcttatatggagctgtcatcttaggtcc gaggacactgctgttatactgcgctcgtc ctcaggtcactatgactataatggtttccct actggggtcaggaaccctgggtactgtct cttctggcgtggaggcagcgggtgggggt gggtctggagcgggtggcagtgccgcg gaggctctgataatcagatgactcagctcc tagcactctcagcggcagcgtgggggatc gtgtgacaatgactgctccgctagcagta		
--	--	--

	<p>gtgtgtcttacatgaattggtatcagcagaa gccccggaaagcacctaagcgtggatct atgactctccaagctggcaagtgggtgcc cctcacggftctctggctcaggtctgttac tgactatacttgactatctcctccctcagc ccgatattcgtactattattgtcagcag tggagccgtaaccaccacttccggagg cgggtaccaagtggagatcaagaggtcat aa</p>		
<p>DB415 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRI138</p>	<p>atggaagcaccagcgcagcttctctctc ctgctactctggctccagataccaccggt gaggtgcagctggagctctgggggag gcttgtagcagcctgggggctccctgcgc ctctcctgtgcagcctctggaatcacctca gtagttatggcatgattgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtggtctca ggtattagttggaatagtgtaacaagctct atgtgactctgtgaagggccggtcacca tctccgcgacaattccaagaacacgctgt atctgcaaatgaacagcctgcgcgagag gacacggcctatattactgtgcgagagat actaatgatgctttgatatctgggccaag ggaccacggcaccgtctcctcaggtgga ggcgggtcagcgggaggtgatccggcg gtggcggctccggtggcggcgatctga catccagatgaccagctcctcctccct gtctgcatctgtaggagacagagtcacat cacttgccggcaagtcagagcattagca gctatctgaattggtatcagcagaaaccag ggaaagcccctaagctcctgatctatctg catccagttgcaaatggggtccatcaa gggtcagtgagcagtgatctgggacagatt tcacttcaccatcagcagctgcaacctg aagatttgcacttactactgtcaacagag</p>	<p>evqlvesggglvqpggsrlscaasgitfssy gmhwwrqpapkglewsvgiswnsgnrv yvsvkgrftisrdnsntlylqmnsfraedt avyycardndafdiwqggtvtvssgggg sgggsgggsgsgggsdiqmtqspsslsa svgdrvtitcrasqsisynwyqqkpgka pkliyaasslqsgvpsrfsrgsgsdflltiss lqpedfatyycqqsystplfgggkveikss sepksdkthtppcpapeagapsvflfp pkpkdtlmisrtpcvvvdvshedpev kfhwyvdgvevhnaktprreeqynstyrv vsvltvlhqdwlngkeykavsnkalpapi ektiskakqpprepqvylpprsdeltnqv slclvkgfypsdiavewesngqpennykt tppvl dsdgsfflyskltvdkrwwqgnvfs csvmhealhnhytqkslslspgsgggsg ggsgsggsgspvqlvqsgpevkkpgss vkvsckasytfsrstmhwwrqpapggle wigyinpsaytnynqkfkdrvitiadksts taymelsrsedtavyycarpqvhydyng fpywqggtlvvssggggsgggsggggs ggggsdiqmtqspstlsasvdrvmtcsa sssvsymnwyqqkpgkapkrwiydsskl asgvpsrfsrgsgsdytltlisslqpdffaty ycqqswnpftfgggkveikrs</p>	<p>SEQ ID NO:153 (SEQ ID NO:154)</p>

ttacagtaccctctcacttfcggcggaggt accaaggtggagatcaaatcctcgagtga gccc aaatcttctgacaaaactcacacatg cccaccgtgccagcacctgaagccgcg ggtgcaccgtcagttctcttcccccaa aaccaaggacacccatgatctccggg accctgaggtcacatgcgtgggtgga cgtgagccacgaagacctgaggtcaagt tcaactggtacgtggacggcgtggagtg cataatgccaagacaaagccgaggagg agcagtacaacagcacgtaccgtgtgtc agcgtcctaccgtcctcaccaggactg gctgaatggcaaggaatacaagtgcgcg gtctcaacaaagccctcccagccccat cgagaaaaccatctcaagccaaagg cagccccgagaaccacaggtgtacacct gccccatccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctgtcaa aggcttctatccaagcgcacatgccgtgga gtgggagagcaatggcagccggagaa caactacaagaccagcctccgtgctgg actccgacggctcttctctacagcaa gctaccgtggacaagagcaggtggcag caggggaacgttctctcatgctccgtgatg catgaggctctgcacaaccactacagca gaagagcctctccctgtctccgggtccgg aggagggggtcaggtggggaggttct ggcggcggggaagccctcacaggtgc aactggtcagagtgaccggaggttaa aaaccaggtcctccgftaagggttagctgc aaagcctctggctacacatttccaggagta caatgactgggtgaggcaggctcctgga cagggactggagtgatcgggtatataa cccatctagccctataccaattacaacca aaagtttaaggaccgagttaccattaccgct		
---	--	--

	<p>gacaaatccaccagtaacagcttatatggag ctgtcatctcttaggtccaggacactgctg ttfataactcgcctcgtcctcaggtcactat gactataatgggtttccctactggggtcagg gaaccctgggtgactgtctcttctggcggfg gagcagcgggtgggggtgggtctggagg cgggtggcagtgccggcggaggctctgat attcagatgactcagctcctagcactctca gcgccagcgtgggggatcgtgtgacaatg acttctccgctagcagtagtcttctacat gaattggatcagcagaagcccgggaag cacctaagcgtggatctatgactcttcaa gctggcaagtgggtgccctcacggttctct ggctcagggtctggfactgactatacttga ctatctcctccctccagcccgatatttcgct acctattattgacagcagtgaggccgtaac cccccactttcggaggcggtaacaaagt ggagatcaagaggctatga</p>		
<p>DB435 VHVL x TSC456 scFv-Fc- scFv TRII39</p>	<p>atggaagcaccagcagcttctctctc ctgctactctggctcccagataaccacggg caggtgacagctggtcagcttggggctga gggtgaagaagcctggggcctcagtgaa gtttcctgcaagcactcggaggcaccttc agcagctatgctatcagctgggtgcgtcag gcccctggacaaggccttgatggatggg ctggatcacccctcaaatgtaacataaa gtatgcacgggagttccaggccgtgtca ccatgacccgcgacacgtccacgagcac agtctacatggagctgagcagcctgcgttc tgaggacacggcgtgtattactgtcgaa agatctgaactggaacgcagccttgaacta ctggggccaggggaccctggtcaccgtct cctcaggtggaggcgttcaggcggagg tggatccggcgggtggcggctccgggtggc</p>	<p>qvqlvqsgaevkkpgasvkvscasggtf ssyaiswvrqapggglewmgwitphngn ikyarefqrvtmtrdtststvmelsslrse dtavyycakdlwnaafdywggtlvtvs sgggsgggsgggsgggsgggsdiqmtqs psslsasvdrvtitcrasqissylnwyqqk pgkapklliyaasslqsgvpsrfsrgsgstf tltisslqpedfatyycqqsysptlfgggtkv eiksssepksdkthtppcpapeaagaps vflfppkpdtlmisrtpevtcvvvdvshe dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyn styrvsvlthqdwlngkeykcavsnka lpapiektiskakgqprepqvylppsdelt knqvstclvkgfypsdiawesngqpe nnykttpvl dsdgsfflyskltvdksrwqq gnvfscsvmhealhnhytqkslslspgsgg</p>	<p>SEQ ID NO:155 (SEQ ID NO:156)</p>

	<p>ggcggatctgacatccagatgaccagtct ccatctccctgtctgcatctgtaggagaca gaggaccatcacttccgggcaagtacag agcattagcagctatctgaattggtatcagc agaaccagggaagccctaagctcctg atctatgctgcatccagttgcaaagtgggg tcccatcaaggtcagtgccagtggtatctg ggacagatttactctcaccatcagcagctct gcaacctgaagatttgcaacttactactgt caacagagttacagtaccctctcactttcg gcggaggtaccaaggtggagatcaaatcc tcgagtgagccaaatcttctgacaaaact cacacatcccaccgtgccagcactga agccgcgggtgcaccgtcagcttctctt cccccaaaaccaaggacaccctcatga tctccggaccctgaggtcacatgcgtg gtggtggacgtgagccacgaagaccctg aggtcaagttcaactggtacgtggacggc gtggaggtgcataatgccaagacaaagcc gcgggaggagcagtaacaacagcagctac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcac caggactggctgaatggcaaggaatacaa gtgcgcgggtctccaacaagccctcccag ccccatcgagaaaaccatctccaagcc aaaggcagccccgagaaccacaggtgt acaccctgccccatcccggatgagctg accaagaaccaggtcagcctgacctgcct ggtcaaggcttctatccaagcgacatcgc cgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcctccgt gctggactccgacggctccttctctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggt ggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggtctgcacaaccactac acgcagaagacctctccctgctccgggt</p>	<p>gsgggsgggsgspsqvqlvqsgpevkk pgssvkvscasgytfsrstmhwrqapg qglewigyinpsaytnynqkfkdrvtitad kststaimelsslrsedtavyycarpqvhyd yngfpywgqgtlvsvsgggsgggsgg gsggggsdiqmtqspstlsasvgdrvtmt csassvsymnwyqqkpgkapkrwiyds sklsgvpsrfssgsgtdytlitisslpddfa tyycqwsrnpptfgggtkveikrs</p>	
--	--	---	--

	<p>tccggaggagggggtcaggtgggggag gtftctggcggcggggaagcccttcacag gtgcaactgggtcagagtggacccgaggt taaaaaccaaggctcctcgtaaggtag ctgcaaagcctctggctacacatttccagg agtacaatgactgggtgagcagcctcc tggacagggactggagtggatcgggtata tcaacctctagcgcctataccaattaca ccaaaagttaaggaccgagttaccattac cgctgacaaatccaccagtacagcttat ggagctgtcatctttagtccgaggacac tgctgttattactgcgctcgtcctcaggtc actatgactataatggtttccactggggg cagggaacctgggtgactgtctctctggc gggtggaggcagcgggtgggggtgggtctg gagcgggtggcagtgccggcggaggct ctgatattcagatgactcagtccttagcac tctcagcggcagcgtgggggatcgtetga caatgactgtctccgtagcagtagtgtgc ttacatgaattggtatcagagaagcccgg gaaagcacctaagcgtggatctatgactc ttcaaagctggcaagtgggtccctcacg gttctctggctcaggttctggtactgactata ctttgactatctctccctccagccgatgat ttcgctacctattatgacagcagtgagcc gtaaccaccactttcggaggcgggtacc aaagtgagatcaagaggtcatga</p>		
Cris7 и DRA222 VH CDR1 (Кабат)		RSTMH	(SEQ ID NO:165)
Cris7 и DRA222 VH CDR2		YINPSSAYTNYNQKFK	(SEQ ID NO:166)

(Кабат)			
Cr1s7 и DRA222 VH CDR3 (Кабат)		QVHYDYNGFPY	(SEQ ID NO:167)
Cr1s7 и DRA222 VL CDR1 (Кабат)		SASSSVSYMN	(SEQ ID NO:162)
Cr1s7 и DRA222 VL CDR2 (Кабат)		DSSKLAS	(SEQ ID NO:163)
Cr1s7 и DRA222 VL CDR3 (Кабат)		QQWSRNPPT	(SEQ ID NO:164)
Cr1s7 и DRA222 VH CDR1 (IMGT)		GYTFTRST	(SEQ ID NO:171)
Cr1s7 и DRA222 VH CDR2 (IMGT)		INPSSAYT	(SEQ ID NO:172)
Cr1s7 и DRA222 VH CDR3 (IMGT)		QQWSRNPPT	(SEQ ID NO:173)
Cr1s7 и DRA222 VL CDR1		ASSSVSY	(SEQ ID NO:168)

(IMGT)			
Cris7 и DRA222 VL CDR2 (IMGT)		DSS	(SEQ ID NO:169)
Cris7 и DRA222 VL CDR3 (IMGT)		QQWSRNPT	(SEQ ID NO:170)
I2C VH CDR1 (Кабар)		KYAMN	(SEQ ID NO:174)
I2C VH CDR2 (Кабар)		RIRSKYNNYATYYADSVKD	(SEQ ID NO:175)
I2C VH CDR3 (Кабар)		HGNFGNSYISYWAY	(SEQ ID NO:176)
I2C VL CDR1 (Кабар)		GSSTGAVTSGNYPN	(SEQ ID NO:307)
I2C VL CDR2 (Кабар)		GTKFLAP	(SEQ ID NO:308)
I2C VL CDR3 (Кабар)		VLWYSNRWV	(SEQ ID NO:309)
I2C VH CDR1 (IMGT)		GFTFNKYA	(SEQ ID NO:179)
I2C VH		IRSKYNNYAT	(SEQ ID

CDR2 (IMGT)			NO:180)
I2C VH CDR3 (IMGT)		VRHGNFGNSYISYWAY	(SEQ ID NO:181)
I2C VL CDR1 (IMGT)		TGAVTSGNY	(SEQ ID NO:310)
I2C VL CDR2 (IMGT)		GTK	(SEQ ID NO:177)
I2C VL CDR3 (IMGT)		VLWYSNRWV	(SEQ ID NO:178)
HuM291 VH CDR1 (Ka6ar)		SYTMH	(SEQ ID NO:185)
HuM291 VH CDR2 (Ka6ar)		YINPRSGYTHYNQKLKD	(SEQ ID NO:186)
HuM291 VH CDR3 (Ka6ar)		SAYYDYDGFAY	(SEQ ID NO:187)
HuM291 VL CDR1 (Ka6ar)		SASSSVSYMN	(SEQ ID NO:182)
HuM291 VL CDR2 (Ka6ar)		DTSKLAS	(SEQ ID NO:183)
HuM291 VL CDR3		QQWSSNPPT	(SEQ ID NO:184)

(Кабар)			
HuM291 VH CDR1 (IMGT)		GYTFISYT	(SEQ ID NO:191)
HuM291 VH CDR2 (IMGT)		INPRSGYT	(SEQ ID NO:192)
HuM291 VH CDR3 (IMGT)		ARSAYDYDGFAY	(SEQ ID NO:193)
HuM291 VL CDR1 (IMGT)		ASSSVSY	(SEQ ID NO:188)
HuM291 VL CDR2 (IMGT)		DTS	(SEQ ID NO:189)
HuM291 VL CDR3 (IMGT)		QQWSSNPPT	(SEQ ID NO:190)
TSC455 (анти-CD3) TSC394 F87Y scFv		QVQLVQSGPEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSRSTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSSAYTN YNQKFKDRVTITADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYYCARP QVHYDYNQFPYWGQGLVT VSSGGGGSGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSTLSASVG DRVTMTCSASSVSYMNWY QQKPGKAPKRWIYDSSKLAS GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSL QPDDFATYYCQQWSRNPPTF GGGTKVEIKRSSS	(SEQ ID NO:311)

TSC456 (анти-CD3) TSC394 E86D F87Y scFv		QVQLVQSGPEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSRSTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSSAYTN YNQKFKDRVTITADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYYCARP QVHYDYNGFPYWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSTLSASVG DRVTMTCSASSSVSYMNWY QQKPGKAPKRWIYDSSKLAS GVPSRFGSGSGTDYTLTISS LQPDDFATYYCQQWSRNPTT FGGGTKVEIKRSSS	(SEQ ID NO:312)
Домен вариабельн ой тяжелой цепи TSC455 и TSC456		QVQLVQSGPEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSRSTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSSAYTN YNQKFKDRVTITADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYYCARP QVHYDYNGFPYWGQGLVT VSS	(SEQ ID NO:159)
Домен вариабельн ой легкой цепи TSC455		DIQMTQSPSTLSASVGDRVT MTCSASSSVSYMNWYQQK PKAPKRWIYDSSKLAGVPS RFGSGSGTEYTLTISSLQPD DFATYYCQQWSRNPTFGGG TKVEIKRS	(SEQ ID NO:157)
Домен вариабельн ой легкой цепи TSC456		DIQMTQSPSTLSASVGDRVT MTCSASSSVSYMNWYQQK PKAPKRWIYDSSKLAGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPD DFATYYCQQWSRNPTFGGG TKVEIKRS	(SEQ ID NO:158)

DRA222 (анти-CD3) scFv		QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCKASGYTFTRSTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSSAYTN YNQKFKDRFTISADKSKSTAF LQMDSLRLPEDTGVYFCARPQ VHYDYNQFPYWGQGPVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSAQ DIQMTQSPSSLSASVGDRVT MTCSASSSVSYMNWYQQKP GKAPKRWIYDSSKLAGVPA RFSGSGSGTDYTLTISLQPE DFATYYCQQWSRNPPTFGGG TKLQITSS	(SEQ ID NO:313)
Домен вариабельн ой тяжелой цепи DRA222		QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCKASGYTFTRSTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSSAYTN YNQKFKDRFTISADKSKSTAF LQMDSLRLPEDTGVYFCARPQ VHYDYNQFPYWGQGPVTV SS	(SEQ ID NO:161)
Домен вариабельн ой легкой цепи DRA222		DIQMTQSPSSLSASVGDRVT MTCSASSSVSYMNWYQQKP GKAPKRWIYDSSKLAGVPA RFSGSGSGTDYTLTISLQPE DFATYYCQQWSRNPPTFGGG TKLQITS	(SEQ ID NO:160)

CD123-связывающие белки могут содержать любой из CD123-связывающих доменов, описанных выше. В некоторых аспектах CD123-связывающие белки содержат гуманизированные аминокислотные последовательности V_H или V_L или обе.

Указанные полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Указанные полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4. Указанные полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере около на 95%, по меньшей мере около на 97% идентична, по меньшей мере примерно, на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична или по меньшей мере примерно на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична или по меньшей мере примерно на 99% идентична scFv-части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132.

Полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей

состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 152.

Полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 114. Полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 114. Полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична, по меньшей мере примерно на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична или по меньшей мере примерно на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 154. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична или по меньшей мере примерно на 99% идентична scFv части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 154. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 114 или SEQ ID NO: 154.

Полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 122. Полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична, по меньшей мере на 89% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 91% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 122. Полипептиды могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична, по меньшей мере примерно на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 122. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична или по меньшей мере примерно на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 156. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97% идентична или по меньшей мере примерно на 99% идентична scFv части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 156. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 156.

Полипептиды, раскрытые в данном документе, могут иметь улучшенные характеристики по сравнению с другими CD123-связывающими доменами или полипептидами. Например, CD123-связывающий домен или полипептид может демонстрировать пониженную изоэлектрическую точку по сравнению с изоэлектрической точкой другого CD123-связывающего домена или полипептида. "Изоэлектрическая точка" или "pI" - это pH, при котором суммарный заряд равен нулю. Изоэлектрическая точка белка может быть измерена любым подходящим методом, например аналитической капиллярной изоэлектрической фокусирующей хроматографией.

CD123-связывающий домен или белок, раскрытые в данном документе, могут связываться с CD123 (например, человеческим CD123) с более высокой аффинностью, чем родительское антитело.

В одном варианте осуществления изобретения рекомбинантный полипептид включает от аминокислот до карбоксильного конца (i) человеческий или гуманизированный CD123-связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокситерминальный линкер

и (v) человеческий или гуманизированный второй связывающий домен, который специфически связывает Т-клеточный, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного комплекса, причем человеческий или гуманизированный CD123-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99 или по меньшей мере примерно на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 и причем человеческий или гуманизированный второй связывающий домен, который специфически связывает Т-клетку, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного комплекса содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или по меньшей мере примерно на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 311 или SEQ ID NO: 312.

В одном варианте осуществления изобретения рекомбинантный полипептид не содержит CD123-связывающего домена, полученного из мышиногo антитела 12F1 (SEQ ID NO: 195 и 197). Например, в одном варианте осуществления CD123-связывающий домен не содержит вариabельный домен тяжелой цепи или легкой цепи, который значительно идентичен вариabельному домену тяжелой цепи или легкой цепи 12F1 (например, является не на 95% или более идентичен вариabельным доменам тяжелой и легкой цепей 12F1) или не содержит все шесть CDR, которые содержатся в мышинoм 12F1. В одном варианте осуществления изобретения CD123-связывающий домен не конкурирует за связывание с CD123 с мышинoм антителoм 12F1 (SEQ ID NO: 195 и 197). В одном варианте осуществления изобретения рекомбинантный полипептид является перекрестно-реактивным по отношению к CD123 яванца (яванского макака), тогда как антитело 12F1 (и его гуманизированные производные) не является перекрестно-реактивным по отношению к CD123 яванца.

Таблица 4. Последовательности мышинных антител 12F1

Название	Нуклеотидная последовательность	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO: нуклеотид (аминокислота)
Вариabельный домен легкой цепи 12F1 мыши	gacatcatgatgtcccagtcctccctcctccctggcc gtgtccgtggcgagaaagttaccatgacctgcaa gtctcccagtcctgttcttcggtccaccagaa gaactacctggcctgtaccagcagaagcccggc cagtccccaagctgctgatctactggcctccacc cgggagtcggcgtgcccgaccggtcaccggct ccggctccggcaccgactcaccctggccatctct ccgtgatgcccaggacctggccgtgtactactgc cagcagtactacaactaccctggacctcggcgg cggcaccaagctggagatcaag	dimmsqspsslavsvgekftm tckssqslffgstqknylawyqq kpgqspklliywastresgvpd rftgsgsgtdflaissvmpedla vyuqqyynypwtfgggk le ik	SEQ ID NO:194 (SEQ ID NO:195)
Вариabельный домен тяжелой цепи 12F1 мыши	cagctgcaggagtcggccccggcctggtgaagc cctcccagtcctgtcctgacctgctccgtgaccg actactccatcacctccggctactactggaactgga ttcggcagttccccgcaacaagctggagtgatg ggctacatctctacgacggctccaacaactaca cccctccctgaagaaccggtatcctacacccggg	vqlqesgplvkvpsqslstsv tdysitsgyywnwirqfpgnkl ewmgyisydgsnnynpslkn risitrdtsknqfflklssvttedta tyycsrgegfyfdswgqgttlv ss	SEQ ID NO:196 (SEQ ID NO:197)
	acacctcaagaaccagttctctgaagctgtcctc cgtgaccaccgaggacaccgccactactactgct ccccgggagggcttctactgactcctggggc cagggcaccaccctgaccgtgctcctg		

В одном варианте осуществления полипептид по данному изобретению (в том числе в форме димера) связывается с CD123 человека и CD123 примата, отличного от человека (NHP - non-human primate), со специфичностью. В другом варианте осуществления изобретения полипептид связывается с CD123 яванского макака.

Данное раскрытие также включает нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), кодирующие CD123-связывающие домены, и полипептиды, описанные в данном документе. Нуклеиновые кислоты по данному изобретению включают нуклеиновые кислоты, имеющие область, которая по существу идентична полинуклеотиду, как указано в табл. 3 ниже. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота в соответствии с данным раскрытием имеет по меньшей мере 80%, обычно по меньшей мере примерно 90%, а более типично, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 98% идентичности с кодирующим полипептид полинуклеотидом, как указано в табл. 3. Нуклеиновые кислоты по данному изобретению также включают комплементарные нуклеиновые кислоты. В некоторых случаях последовательности будут полностью дополняющими (без несовпадений) при выравнивании. В других случаях может быть до 20% несоответствия в последовательностях. В некоторых вариантах осуществления изобретения предоставлены нуклеиновые кислоты, кодирующие как первую, так и вторую полипептидные цепи гетеродимерного CD123-связывающего белка, по данному изобретению. Представленные в данном документе последовательности нуклеиновых кислот могут быть использованы с применением оптимизации кодонов, вырожденных последовательностей, молчащих мутаций и других методов ДНК для оптимизации экспрессии в конкретном хозяине, и данное раскрытие охватывает такие модификации последовательности.

Данное изобретение включает рекомбинантный полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей в последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% и по меньшей мере 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 3. Данное изобретение включает рекомбинантный полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей в последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% и по меньшей мере 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 131.

Данное раскрытие относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CD123-связывающие домены, белки и полипептиды (или их части), описанные в данном документе, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153 или SEQ ID NO: 155.

Полинуклеотидные молекулы, содержащие желаемую полинуклеотидную последовательность, размножают, помещая молекулу в вектор. Можно использовать вирусные и невирусные векторы, включая плазмиды. Выбор плазмиды будет зависеть от типа клетки, в которой желательно размножение, и цели размножения. Определенные векторы полезны для амплификации и получения больших количеств желаемой последовательности ДНК. Другие векторы пригодны для экспрессии в клетках в культуре. Еще другие векторы пригодны для переноса и экспрессии в клетках у животного или человека. Выбор подходящего вектора находится в пределах квалификации в данной области. Многие такие векторы доступны на рынке. Частичный или полноразмерный полинуклеотид встраивается в вектор обычно посредством присоединения ДНК-лигазы к участку в векторе, расщепленному рестрикционным ферментом. Альтернативно, желаемая нуклеотидная последовательность может быть вставлена путем гомологичной рекомбинации *in vivo*. Обычно это достигается путем присоединения областей гомологии к вектору по сторонам (на флангах) от желаемой нуклеотидной последовательности. Области гомологии добавляются путем лигирования олигонуклеотидов или с помощью полимеразной цепной реакции с использованием, например, праймеров, включающих как область гомологии, так и часть желаемой нуклеотидной последовательности.

Для экспрессии можно использовать кассету или систему экспрессии. Для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, раскрытый в данном документе, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, функционально связанную с регуляторными последовательностями, которые контролируют транскрипционную экспрессию в векторе экспрессии, вводят в клетку-хозяин. В дополнение к транскрипционным регуляторным последовательностям, таким как промоторы и энхансеры, векторы экспрессии могут включать трансляционные регуляторные последовательности и маркерный ген, который подходит для отбора клеток, несущих вектор экспрессии. Генный продукт, кодируемый полинуклеотидом по данному изобретению, экспрессируется в любой удобной системе экспрессии, включая, например, системы бактерий, дрожжей, насекомых, амфибий и млекопитающих. В экспрессионном векторе полипептид-кодирующий полинуклеотид связан с регуляторной последовательностью, если это необходимо, для получения желаемых свойств экспрессии. Они могут включать промоторы, энхансеры, терминаторы, операторы, репрессоры и индукторы. Промоторы могут быть регулируемы (например, промо-

тор из индуцируемого стероидами вектора pIND (Invitrogen)) или конститутивными (например, промото-ры из последовательностей CMV, SV40, фактора элонгации или LTR). Они связаны с желаемой нуклеотидной последовательностью, с использованием методов, описанных выше для присоединения к векторам. Любые методы, известные в данной области техники, могут быть использованы. Соответственно, вектор экспрессии обычно обеспечивает область инициации транскрипции и трансляции, которая может быть индуцибельной или конститутивной, причем кодирующая область функционально связана под контролем транскрипции области инициации транскрипции и области терминации транскрипции и трансляции.

Кассета экспрессии ("единица экспрессии") может быть введена в различные векторы, например плазмиду, ВАС, YAC, бактериофаг, такой как лямбда, P1, M13 и т.д., вирусные векторы растений или животных (например, векторы на основе ретровирусов, аденовирусные векторы) и тому подобное, причем указанные векторы обычно характеризуются способностью обеспечивать отбор клеток, содержащих указанные векторы экспрессии. Указанные векторы могут обеспечивать свое внехромосомное поддержание, особенно в виде плазмид или вирусов, или интеграцию в хромосому хозяина. Если требуется внехромосомное поддержание, для репликации плазмиды предоставляется исходная последовательность, которая может обеспечивать низкое или высокое число копий. Для отбора доступно большое разнообразие маркеров, особенно тех, которые защищают от токсинов, более конкретно от антибиотиков. Конкретный маркер, который выбирается, выбирается в соответствии с природой хозяина, причем, в некоторых случаях, комплементация может быть использована с ауксотрофными хозяевами. Для введения конструкции ДНК можно использовать любой удобный метод, включая, например, конъюгацию, бактериальную трансформацию, осажденную кальцием ДНК, электропорацию, слияние, трансфекцию, инфицирование вирусными векторами, биолистику и тому подобное. Данное раскрытие относится к экспрессионному вектору, содержащему сегмент нуклеиновой кислоты, причем указанный сегмент нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153 или SEQ ID NO: 155.

Соответственно, белки для использования в данном раскрытии могут быть получены в генетически сконструированных клетках-хозяевах в соответствии с традиционными методами. Подходящими клетками-хозяевами являются те типы клеток, которые могут быть трансформированы или трансфицированы экзогенной ДНК и выращены в культуре и включают бактерии, грибковые клетки и культивируемые клетки высших эукариот (включая культивируемые клетки многоклеточных организмов), особенно культивируемые клетки млекопитающих. Методы манипулирования клонированными молекулами ДНК и введения экзогенной ДНК в различные клетки-хозяева раскрыты Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001), и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (4th ed., John Wiley & Sons, 1999). Например, рекомбинантные полипептиды по данному изобретению могут быть экспрессированы из клеток CHO и HEK293.

Например, для рекомбинантной экспрессии гомодимерного CD123-связывающего белка, содержащего два идентичных CD123-связывающих полипептида, как описано в данном документе, вектор экспрессии обычно включает сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид, связывающий CD123, функционально связанный с промотором. Для рекомбинантной экспрессии гетеродимерного CD123-связывающего белка, содержащего разные первую и вторую полипептидные цепи, первую и вторую полипептидные цепи можно совместно экспрессировать из отдельных векторов в клетке-хозяине для экспрессии всего гетеродимерного белка. Альтернативно, для экспрессии гетеродимерных CD123-связывающих белков первая и вторая полипептидные цепи коэкспрессируются из отдельных единиц экспрессии в одном и том же векторе в клетке-хозяине для экспрессии всего гетеродимерного белка. Вектор(ы) экспрессии переносят в клетку-хозяина общепринятыми способами, и затем трансфицированные клетки культивируют общепринятыми способами для получения кодируемого полипептида(ов) для продуцирования соответствующего CD123-связывающего белка.

Чтобы направить рекомбинантный белок в секреторный путь клетки-хозяина, в экспрессионном векторе предусмотрена секреторная сигнальная последовательность (также известная как лидерная последовательность). Секреторная сигнальная последовательность может быть последовательностью нативной формы рекомбинантного белка или может быть происходит из другого секреторируемого белка или синтезирована *de novo*. Секреторная сигнальная последовательность функционально связана с последовательностью ДНК, кодирующей полипептид, т.е. две последовательности соединены в правильной рамке считывания и расположены так, чтобы направлять вновь синтезированный полипептид в секреторный путь клетки-хозяина. Секреторные сигнальные последовательности обычно расположены 5' относительно последовательности ДНК, кодирующей полипептид, представляющий интерес, хотя некоторые сигнальные последовательности могут быть расположены в других местах интересующей последовательности.

сти ДНК (см., например, Welch et al., патент США № 5037743; Holland et al., патент США № 5143830). В некоторых вариантах секреторная сигнальная последовательность для использования в соответствии с данным изобретением имеет аминокислотную последовательность MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO: 198).

Культивируемые клетки млекопитающих являются подходящими хозяевами для продуцирования рекомбинантных белков для использования в данном описании. Способы введения экзогенной ДНК в клетки-хозяева млекопитающих включают трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция (Wigler et al., Cell 14: 725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), электропорацию (Neumann et al., EMBO J. 1: 841-845, 1982), DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию (Ausubel et al., выше) и опосредованную липосомами трансфекцию (Hawley-Nelson et al., Focus 15:73, 1993; Ciccione et al., Фокус 15:80, 1993). Получение рекомбинантных полипептидов в культивируемых клетках млекопитающих описано, например, Levinson et al. патент США № 4713339; Hagen et al., патент США № 4784950; Palmiter et al. патент США № 4579821; и Ringold, патент США № 4656134. Примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают клетки почек африканской зеленой маргашки (Vero; ATCC CRL 1587), клетки почки эмбриона человека (293-HEK; ATCC CRL 1573), клетки почки детеныша хомяка (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), клетки почек собак (MDCK; ATCC CCL 34), клетки яичника китайского хомяка (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44; CHO DXB11 (Hyclone, Логан, Юта); См. также, например, Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986), клетки гипофиза крысы (GH1; ATCC CCL82), клетки HeLa S3 (ATCC CCL2. 2), клетки гепатомы крысы (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) SV40-трансформированные клетки почки обезьяны (COS-1; ATCC CRL 1650) и мышинные эмбриональные клетки (NIH-3T3; ATCC CRL 1658). Дополнительные подходящие клеточные линии известны в данной области и доступны в публичных депозитари-ях, таких как Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection), Манассас, Вирджиния. Могут быть использованы сильные промоторы транскрипции, такие как промоторы из SV-40 или цитомегаловируса. См., например, патент США № 4956288. Другие подходящие промоторы включают промотор гена металлотioneина (патенты США №№ 4579821 и 4601978) и основной поздний промотор аденовируса.

Отбор с препаратом обычно используется для отбора культивируемых клеток млекопитающих, в которые была встроена чужеродная ДНК. Такие клетки обычно называют "трансфектантами". Клетки, которые были культивированы в присутствии селективного агента и способны передавать ген, представляющий интерес, своему потомству, называются "стабильными трансфектантами". Иллюстративные маркеры, пригодные для селекции, включают ген, кодирующий устойчивость к антибиотику неомицину, который позволяет проводить селекцию в присутствии препарата типа неомицина, такого как G-418 или тому подобного; ген *gpt* для ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, который обеспечивает рост клеток-хозяев в присутствии микофеноловой кислоты/ксантина; и маркеры, которые обеспечивают устойчивость к зеоцину, блеомицину, бластоцидину и гигромицину (см., например, Gatignol et al., Mol. Gen. Genet. 207:342, 1987; Drocourt et al., Nucl. Acids Res. 18:4009, 1990). Системы отбора могут также использоваться для повышения уровня экспрессии гена, представляющего интерес, и этот процесс называется "амплификацией". Амплификацию проводят путем культивирования трансфектантов в присутствии низкого уровня селективного агента и затем увеличения количества селективного агента для отбора клеток, которые продуцируют высокие уровни продуктов введенных генов. Иллюстративным амплифицируемым селективируемым маркером является дигидрофолатредуктаза, которая придает устойчивость к метотрексату. Также могут быть использованы другие гены устойчивости к препаратам (например, устойчивость к гигромицину, устойчивость к множественным лекарственным средствам, пурамицин-ацетилтрансфераза).

Другие клетки высших эукариот также могут быть использованы в качестве хозяев, включая клетки насекомых, клетки растений и клетки птиц. Использование *Agrobacterium rhizogenes* в качестве вектора для экспрессии генов в клетках растений было рассмотрено Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987. Трансформация клеток насекомых и продуцирование в них чужеродных полипептидов раскрыта Guarino et al., патент США 5162222 и WO 94/06463.

Клетки насекомых могут быть инфицированы рекомбинантным бакуловирусом, обычно полученным из вируса ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV). См. King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide (Chapman & Hall, London); O'Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (Oxford University Press., New York 1994); and Baculovirus Expression Protocols.. Methods in Molecular Biology (Richardson ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1995). Рекомбинантный бакуловирус также может быть получен путем использования системы на основе транспозона, описанной Luckow et al. (J. Virol. 67:4566-4579, 1993). Эта система, которая использует векторы переноса, коммерчески доступна в форме набора (набор BAC-TO-BAC; Life Technologies, Гейтсбург, Мэриленд). Вектор переноса (например, PFASTBAC1; Life Technologies) содержит транспозон Tn7 для перемещения ДНК, кодирующей интересующий белок, в геном бакуловируса, который поддерживается в *E. coli*, в виде большой плазмиды, называемой "бакмидой". См. Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71:971-976, 1990; Bonning et al., J. Gen. Virol. 75:1551-1556, 1994; and Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem.

270:1543-1549, 1995. Кроме того, векторы переноса могут включать слияние в рамке с ДНК, кодирующей удлинение полипептида или аффинный тэг, как описано выше. С использованием методов, известных в данной области, вектор переноса, содержащий последовательность ДНК, кодирующую белок, трансформируют в клетки-хозяева *E. coli*, и клетки подвергают скринингу на наличие бактерий, которые содержат прерванный ген *lacZ*, что указывает на рекомбинантный бакуловирус. Бакмидную ДНК, содержащую рекомбинантный бакуловирусный геном, выделяют с использованием общепринятых методов и используют для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*, таких как клетки Sf9. Далее вырабатывается рекомбинантный вирус, который экспрессирует белок, представляющий интерес. Рекомбинантные вирусные стоки получают способами, обычно используемыми в данной области.

Для производства белка рекомбинантный вирус может быть использован для заражения клеток-хозяев, как правило, клеточной линии, происходящей из кукурузной лиственной совки, *Spodoptera frugiperda* (например, клетки Sf9 или Sf21) или *Trichoplusia ni* (например, клетки HIGH FIVE; Invitrogen, Кардбад, Калифорния). См. в целом Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D. C, 1994). См. также патент США № 5300435. Бессывороточные среды используются для роста и поддержания клеток. Подходящие составы сред известны в данной области и могут быть получены от коммерческих поставщиков. Клетки выращивают от плотности инокуляции около $2-5 \times 10^5$ клеток до плотности $1-2 \times 10^6$ клеток, после чего добавляют рекомбинантный вирусный сток в множественности инфекции (MOI - multiplicity of infection) от 0,1 до 10, чаще около 3. Используемые процедуры обычно описаны в доступных лабораторных руководствах (см., например, King and Possee, выше; O'Reilly et al., выше; Richardson, выше).

Грибковые клетки, включая дрожжевые клетки, также могут быть использованы в данном описании. В этом отношении виды дрожжей включают, например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Pichia methanolica*. Способы трансформации клеток *S. cerevisiae* экзогенной ДНК и получения из них рекомбинантных полипептидов описаны, например, в Kawasaki, патент США № 4599311; Кавасаки и соавт. Патент США № 4931373; Brake, патент США № 4870008; Welch et al. патент США № 5037743; и Murray et al. патент США № 4845075. Трансформированные клетки отбирают по фенотипу, определяемому селективируемым маркером, обычно устойчивостью к препарату или способностью расти в отсутствие определенного питательного вещества (например, лейцина). Примерной векторной системой для использования в *Saccharomyces cerevisiae* является векторная система POT1, раскрытая Kawasaki et al. (патент США № 4931373), который позволяет выбирать трансформированные клетки путем роста в среде, содержащей глюкозу. Подходящие промоторы и терминаторы для использования в дрожжах включают промоторы из генов гликолитических ферментов (см., например, Kawasaki, патент США № 4599311; Kingsman et al., Патент США № 4615974; и Bitter, патент США № 4977092) и гены алкогольдегидрогеназы. См. также патенты США №№ 4990446; 5063154; 5139936; и 4661454. В данной области известны системы трансформации для других дрожжей, включая *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluveromyces lactis*, *Kluveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* и *Candida maltosa*. Смотрите, например, Gleeson et al, *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459-3465, 1986; Cregg, патент США № 4882279; и Raymond et al, *{1 Yeast* 14:11-23, 1998. Клетки *Aspergillus* могут быть использованы в соответствии с методами McKnight et al. Патент США № 4935349. Способы трансформации *Acremonium chrysogenum* раскрыты Sumino et al. патент США № 5162228. Способы трансформации нейроспоры раскрыты в Lambowitz, патент США № 4486533. Получение рекомбинантных белков в *Pichia methanolica* раскрыто в патентах США №№ 5716808; 5736383; 5854039 и 5888768.

Прокариотические клетки-хозяева, включая штаммы бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus* и других родов, также являются полезными клетками-хозяевами в рамках данного изобретения. Способы трансформации этих хозяев и экспрессии клонированных в них чужеродных последовательностей ДНК хорошо известны в данной области (см., например, Sambrook and Russell, выше). При экспрессии рекомбинантного белка в бактериях, таких как *E. coli*, белок может удерживаться в цитоплазме, обычно в виде нерастворимых гранул, или может направляться в периплазматическое пространство с помощью последовательности бактериальной секреции. В первом случае клетки лизируют, а гранулы извлекают и денатурируют, используя, например, изотиоцианат гуанидина или мочевины. Затем денатурированный белок может быть повторно свернут и димеризован путем разбавления денатуранта, таким образом, например, как диализ против раствора мочевины и комбинации восстановленного и окисленного глутатиона, с последующим диализом против забуференного солевого раствора. Альтернативно, белок может быть извлечен из цитоплазмы в растворимой форме и выделен без использования денатурирующих агентов. Белок извлекается из клетки в виде водного экстракта, например, в фосфатно-солевом буфере. Для захвата представляющего интерес белка экстракт наносят непосредственно на хроматографическую среду, такую как иммобилизованное антитело или гепарин-сефарозная колонка. Секретируемые белки могут быть извлечены из периплазматического пространства в растворимой и функциональной форме путем разрушения клеток (например, ультразвуком или осмотическим шоком), чтобы высвободить содержимое периплазматического пространства и восстановления белка, тем самым устраняя необходимость в денатурации и рефолдинге. Антитела, включая одноцепочечные антитела, можно продуцировать в бактериальных клетках-хозяевах в соответствии с известными способами. Смотрите, например, Bird et al., *Science* 242: 423-426,

1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; и Pantoliano et al., Biochem. 30:10117-10125, 1991.

Трансформированные или трансфицированные клетки-хозяева культивируют в соответствии с традиционными процедурами в культуральной среде, содержащей питательные вещества и другие компоненты, необходимые для роста выбранных клеток-хозяев. Различные подходящие среды, включая определенные среды и сложные среды, известны в данной области и обычно включают источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, витамины и минералы. Носитель также может содержать такие компоненты, как факторы роста или сыворотка, по необходимости. Среда для роста, как правило, отбирает клетки, содержащие экзогенно добавленную ДНК, например, путем отбора препаратом или недостатком необходимого питательного вещества, которое дополняется маркером селекции, который содержится в экспрессионном векторе или совместно трансфицируется в клетку-хозяина.

CD123-связывающие белки могут быть очищены обычными способами очистки белка, обычно с помощью комбинации хроматографических методов. См. в общем Affinity Chromatography: Principles & Methods (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, New York 1994). Белки, содержащие Fc-область иммуноглобулина, могут быть очищены аффинной хроматографией на иммобилизованном белке А или белке G. Дополнительные стадии очистки, такие как гель-фильтрация, могут быть использованы для получения желаемого уровня чистоты или для обессоливания, замены буфера и тому подобного.

Данное раскрытие обеспечивает способы лечения субъекта с расстройством, характеризующимся избыточной экспрессией CD123. Как правило, такие способы включают введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, полипептида или CD123-связывающего белка, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий белок содержит по меньшей мере одну эффекторную функцию, выбранную из антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC), так что CD123-связывающий белок индуцирует АЗКЦ и/или CDC анти-CD123-экспрессирующие клетки у субъекта.

В других вариантах осуществления, в которых полипептид содержит второй связывающий домен, который специфически связывает Т-клетку (например, с комплексом ТКР или его компонентом, таким как CD3 ϵ), полипептид или белок, связывающийся с CD123, индуцирует перенаправленную Т-клеточную цитотоксичность (RTCC) анти-CD123-экспрессирующих клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления полипептиды RTCC (например, полипептиды, которые индуцируют RTCC) содержат модифицированный константный домен для снижения или удаления активности АЗКЦ и/или CDC.

В некоторых вариациях метода расстройство представляет собой рак. Иллюстративные виды рака, поддающиеся лечению в соответствии с данным раскрытием, включают, например, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), В-лимфолейкоз, новообразования из бластных плазматоцитодных дендритных клеток (ОБПДК), волосатоклеточный лейкоз, миелодиспластический синдром, острую лимфобластную лейкемию, рефрактерную анемию с избытком бластов, хроническая миелоидный лейкоз и лимфома Ходжкина.

Данное раскрытие также охватывает использование полипептида, связывающего CD123 для производства лекарственного средства для лечения расстройства (например, рака), характеризующегося сверхэкспрессией CD123. В одном варианте осуществления осуществления полипептид, связывающий CD123 обладает активностью RTCC, например, он содержит домен, анти-CD123 и анти-CD3 связывания. В одном варианте осуществления данное раскрытие включает полипептид, связывающий CD123 для применения при лечении расстройства (например, рака), характеризующегося сверхэкспрессией CD123.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к способу лечения пациента с диагнозом острый миелоидный лейкоз, В-лимфолейкоз, новообразования из бластных плазматоцитодных дендритных клеток (ОБПДК), волосатоклеточный лейкоз, миелодиспластический синдром, острый лимфобластный лейкоз, рефрактерная анемия с избытком бластов, хронический миелоидный лейкоз, лимфома Ходжкина или другой рак, связанный с экспрессией CD123, путем введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный полипептид, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или по меньшей мере примерно на 100% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130 или 132.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к способу лечения пациента с раком, включающему введение пациенту полипептида, связывающего CD123, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154 или SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления для способов лечения и применений, описанных в данном документе, полипептид по данному изобретению доставляется способом, согласующимся с традиционными методологиями, связанными с лечением заболевания или расстройства, для которого требуется лечение. В соответствии с приведенным в данном документе описанием терапевтически эффективное количество полипептида или CD123-связывающего белка в форме димера вводят субъекту, нуждающе-

муся в таком лечении, в течение времени и в условиях, достаточных для предотвращения или лечения заболевания или расстройства.

Субъектами для введения полипептидов, как описано в данном документе, являются пациенты с высоким риском развития конкретного расстройства, характеризующегося избыточной экспрессией CD123, а также пациенты с имеющимся таким расстройством. Как правило, у субъекта диагностируют расстройство, для которого требуется лечение. Кроме того, субъекты могут в течение курса лечения наблюдать за любым изменением расстройства (например, за увеличением или уменьшением клинических симптомов расстройства). Кроме того, в некоторых вариантах субъект не страдает от другого расстройства, требующего лечения, которое включает нацеливание на клетки, экспрессирующие CD123.

В профилактических целях фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, предрасположенному или иным образом подверженному риску конкретного расстройства, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска или задержки возникновения расстройства. В терапевтических применениях композиции или лекарственные средства вводят пациенту, подозреваемому или уже страдающему таким расстройством, в количестве, достаточном для лечения или, по меньшей мере, частичной остановки симптомов расстройства и его осложнений. Количество, достаточное для достижения этого, называется терапевтически эффективной дозой или количеством. Как в профилактических, так и в терапевтических режимах агенты обычно вводят в нескольких дозах до тех пор, пока не будет достигнут достаточный ответ (например, ингибирование несоответствующей активности ангиогенеза). Как правило, ответ контролируется, и повторные дозы назначаются, если желаемый ответ начинает исчезать.

Для идентификации пациентов, подлежащих лечению, в соответствии со способами раскрытия, могут быть использованы принятые методы скрининга для определения факторов риска, связанных с конкретными расстройствами, или для определения состояния существующего расстройства, выявленного у субъекта. Такие способы могут включать, например, определение того, есть ли у человека родственники, которым был поставлен диагноз определенного заболевания. Методы скрининга могут также включать, например, обычные обследования для определения семейного статуса для конкретного заболевания, которое, как известно, имеет наследственный компонент. Например, известно, что различные виды рака имеют определенные наследуемые компоненты. Наследственные компоненты рака включают, например, мутации во множественных генах, которые являются трансформирующими (например, Ras, Raf, EGFR, cMet и др.), наличие или отсутствие определенных молекул HLA и рецептора ингибирования киллера (KIR - killer inhibitory receptor) или механизмы, с помощью которых раковые клетки способны модулировать иммуносупрессию таких клеток, как NK-клетки и T-клетки, прямо или не прямо (см., например, Ljunggren and Malmberg, *Nature Rev. Immunol.* 7:329-339, 2007; Boyton and Altmann, *Clin. Exp. Immunol.* 149:1-8, 2007). С этой целью можно регулярно использовать нуклеотидные зонды для идентификации лиц, несущих генетические маркеры, связанные с конкретным интересующим расстройством. Кроме того, в данной области техники известно множество разнообразных иммунологических методов, которые полезны для идентификации маркеров специфического расстройства. Например, в данной области техники хорошо известны различные методы иммуноферментного анализа ИФА, в которых используются зонды моноклональных антител для выявления антигенов, связанных со специфическими опухолями. Скрининг может быть осуществлен в соответствии с известными симптомами пациента, возрастными факторами, связанными факторами риска и т.д. Эти методы позволяют врачу регулярно отбирать пациентов, нуждающихся в методах, описанных в данном документе, для лечения. В соответствии с этими способами нацеливание на патологические клетки, экспрессирующие CD123, может быть реализовано в виде независимой программы лечения или в качестве последующей, вспомогательной или координирующей схемы лечения по сравнению с другими видами лечения.

Для введения полипептид по данному изобретению (например, в форме димера) может быть составлен в виде фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может содержать: (i) полипептид, связывающий CD123 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. Фармацевтическая композиция, содержащая CD123-связывающий белок, может быть составлена в соответствии с известными способами для приготовления фармацевтически полезных композиций, посредством чего терапевтическая молекула объединяется в смеси с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем. Считается, что носитель является "фармацевтически приемлемым носителем", если его введение может переноситься пациентом-реципиентом. Стерильный забуференный фосфатом физиологический раствор является одним из примеров фармацевтически приемлемого носителя. Другие подходящие носители, разбавители или наполнители хорошо известны специалистам в данной области (См., например, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995)). Составы могут дополнительно включать в себя один или более наполнители, консерванты, солибилизаторы, буферные агенты, альбумин для предотвращения потери белка на поверхностях флаконов и т.д.

Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде лекарственной формы, выбранной из группы, состоящей из пероральной единичной формы дозы, внутривенной единичной формы дозы, интраназальной единичной формы дозы, суппозиторной единичной формы дозы, внутрикожной единичной

формы дозы, внутримышечной единичной формы дозы, внутривенной единичной формы дозы, подкожной единичной формы дозы, эпидуральной единичной формы дозы, сублингвальной единичной формы дозы и внутримозговой единичной формы дозы. Стандартная лекарственная форма для перорального применения может быть выбрана из группы, состоящей из таблеток, пилюль, пеллетов, капсул, порошков, пастилок, гранул, растворов, суспензий, эмульсий, сиропов, эликсиров, составов с замедленным высвобождением, аэрозолей и спреев.

Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по данному изобретению, может быть введена субъекту в терапевтически эффективном количестве. Согласно способам данного изобретения белок, связывающий CD123, может вводиться субъектам различными режимами введения, включая, например, внутримышечный, подкожный, внутривенный, внутрисуставный, парентеральный, интраназальный, внутрилегочный, трансдермальный, внутривенный, интратекальный и оральный пути введения.

Определение эффективных дозировок в этом контексте обычно основывается на модельных исследованиях на животных, за которыми следуют клинические испытания на людях, и руководствуется определением эффективных дозировок и протоколов введения, которые значительно уменьшают возникновение или серьезность исследуемого расстройства у модельных субъектов. Эффективные дозы композиций по данному изобретению варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, место назначения, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, вводятся ли другие лекарственные средства, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, а также конкретная активность самой композиции и ее способность вызывать желаемый ответ у индивидуума. Обычно пациент является человеком, но при некоторых заболеваниях пациент может быть млекопитающим, отличным от человека. Как правило, схемы дозировки корректируются для обеспечения оптимального терапевтического ответа, то есть для оптимизации безопасности и эффективности. Соответственно, терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, в котором любые нежелательные побочные эффекты имеют меньшее влияние, чем полезные эффекты введения CD123-связывающего белка, как описано в данном документе. Для введения CD123-связывающего белка дозировка может составлять, например, от примерно 0,1 мкг до 100 мг/кг или от 1 до примерно 50 мг/кг или от 10 мкг до 5 мг/кг веса тела субъекта.

Дозировка фармацевтической композиции может варьироваться лечащим врачом для поддержания желаемой концентрации в целевом сайте.

Что касается лечения солидных (твердых) опухолей, протоколы для оценки измеряемых параметров и противоопухолевой активности хорошо известны в данной области. В то время как каждый протокол может определять оценки ответа опухоли по-разному, RECIST (Response evaluation Criteria in solid tumors-критерии оценки ответа в солидных опухолях) критерии в данное время считаются рекомендованными руководящими принципами для оценки ответа опухоли Национальным институтом рака (см. Therasse et al., J. Natl. Cancer Inst. 92:205-216, 2000). В соответствии с критериями RECIST опухолевый ответ означает уменьшение или устранение всех поддающихся измерению повреждений или метастазов. Заболевание, как правило, считается поддающимся измерению, если оно включает поражения, которые можно точно измерить, по меньшей мере, в одном измерении, например, ≥ 20 мм с помощью традиционных методов или ≥ 10 мм с помощью спиральной компьютерной томографии (КТ) с четко определенными краями по медицинской фотографии или рентгеновской компьютерной осевой томографии (КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ) или клинического обследования (если поражения поверхностные). Не поддающееся измерению заболевание означает, что заболевание включает поражения <20 мм при измерении с помощью традиционных методов или <10 мм при измерении с помощью спиральной компьютерной томографии (КТ), и действительно не поддающиеся измерению поражения (слишком маленькие, чтобы их можно было точно измерить). Не поддающееся измерению заболевание включает плевральные выпоты, асциты и заболевание, подтвержденное косвенными данными.

Критерии для объективного статуса необходимы для протоколов для оценки реакции солидной опухоли. Иллюстративные критерии включают следующее: (1) полный ответ (ПО), определяемый как полное исчезновение всего поддающегося измерению заболевания; нет новых поражений; нет связанных с болезнью симптомов; нет доказательств присутствия не поддающегося измерения заболевания; (2) частичный ответ (ЧО), определяемый как уменьшение суммы самого длинного диаметра целевого поражения на 30% (3) прогрессирующее заболевание (ПЗ), определяемое как увеличение суммы наибольшего диаметра целевого поражения на 20% или появления любого нового повреждения; (4) стабильность или отсутствие ответа, которые определяются как не отвечающее критериям ПО, ЧО или Прогрессирующего Заболевания. (См. Therasse et al., выше)

Дополнительные главные измеряемые параметры, которые принимаются в области онкологии, включают общую выживаемость (ОВ - OS - overall survival), выживаемость без заболеваний (БЗ - DFS - disease-free survival), объективную частоту ответа (ОЧО - ORR - objective response rate), время до прогрессирования (ВДП - TTP - time to progression) и выживаемость без прогрессирования (ВБП - PFS - progression-free survival) (см. Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs

and Biologies, April 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD).

Фармацевтические композиции могут поставляться в виде набора, включающего контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описано в данном документе. Фармацевтическая композиция может быть предоставлена, например, в форме раствора для инъекций для однократной или многократных доз или в виде стерильного порошка, который будет растворен перед инъекцией. Альтернативно, такой набор может включать диспергатор сухого порошка, генератор жидкого аэрозоля или распылитель для введения фармацевтической композиции. Такой набор может дополнительно содержать письменную информацию о показаниях и применении фармацевтической композиции.

Данное раскрытие будет дополнительно пояснено следующими примерами, которые предназначены исключительно для иллюстрации раскрытия и никоим образом не являются ограничивающими.

Примеры

Пример 1. Получение гуманизованных вариантов анти-CD123-антител и конструирование моноспецифических и биспецифических CD123-связывающих молекул.

Отбор моноспецифических CD123-связывающих молекул с помощью фагового дисплея

Анти-CD123-специфичные связывающие молекулы scFv были выделены из библиотеки SuperHuman, Distributed Bio Inc. (Южный Сан-Франциско, Калифорния), используя метод панирования растворимого фагового дисплея (soluble phage display panning) против биотинилированного рекомбинантного белка CD123 (SEQ ID NO: 200) в соответствии с протоколами Distributed Bio и как описано ранее Aygiss, J et al. (2007) J Proteome Res., P 1072 -82. Специфичность связывания клонов была охарактеризована с помощью ИФА с использованием CD123 и неродственного рекомбинантного белка с идентичным тэгом для очистки. Проточную цитометрию с использованием клеток HEK293, трансфицированных вариантами CD123 человека и яванца, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 203, соответственно, использовали для идентификации клонов, связывающихся с CD123 в контексте клеточной поверхности. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности связывающих молекул, на которые ссылаются эти примеры, можно найти в табл. 5.

Выделение моноспецифических CD123-связывающих молекул путем генерации гибридомы

Анти-CD123-специфичные антитела выделяли из библиотеки гибридом, созданной после иммунизации OmniMice (Ligand Inc, Сан-Диего, Калифорния) рекомбинантным человеческим эктодоменом CD123 (SEQ ID NO: 200). Специфичность связывания отдельных клонов была подтверждена тестированием связывания с использованием проточной цитометрии на клетках HEK293, трансфицированных вариантами CD123 человека и яванского макака, SEQ ID NO: 201 и 203 соответственно, и далее подтверждено отсутствием связывания с родительскими клетками HEK293. Последовательности были получены с помощью ОТ-ПЦР с использованием набора ОТ-ПЦР OneStep (QIAGEN Inc., Валенсия, Калифорния), следуя модифицированной версии протокола производителя. Вкратце, клетки каждого клона соскребали с емкостей с замороженными клетками и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКазы. Эту клеточную суспензию затем использовали в качестве матрицы в реакции ОТ-ПЦР с использованием наборов геноспецифических праймеров, которые фланкируют переменные домены тяжелой цепи, каппа или ламбда. Сиквенирование проводили с использованием обратного праймера в константных доменах для каждого из этих фрагментов. Затем последовательности были преобразованы в формат scFv путем амплификации переменных доменов с использованием праймеров, которые содержат перекрывающиеся последовательности и были собраны в экспрессирующий вектор млекопитающих с использованием набора для клонирования ДНК-сборки NEBuilder® HiF (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс).

Таблица 5. Последовательности CD123, используемые для иммунизации и скрининга

Название	Нуклеотидная	Аминокислотная	SEQ ID NO:
	последовательность	последовательность	нуклеотид (аминокислота)
эктодомен CD123 человека с аффинным тэгом Avi- 3xFLAG- His TRI032	atggaagcaccagcgagcttctctcc tctgctactctggctcccagataccac cggtaaggaggaccccaacccccca tcaccaacctgaggatgaaggccaag gcccagcagctgacctgggacctgaa caggaacgtgacagacatcgaatgctg gaagatgccgactacagcatgcccg ccgtgaacaactcactgcccagttcgg cgccatcagcctgtgagagtgacaaa ctacaccgtgagagtgccaaccccc cttcagcacctggatcctgttcccag aacagcggcaaacctgggctgccc tgagaacctgacctgctggatccacga cgtggacttctgctcagctgggct gtgggacccggagctcctgcccgatgtg cagtacgacctgtacctgaatgtggcca acagaagacagcagctacgagctcctg cattacaagaccgacgcccagggaac caggatcggctcaggtttgatgacatc agcaggctgtcctccggcagccagtcc agccacatcctggtgagaggcagatcc gccccttcggcattccctgcacagac aaattcgtcgtcttcagccagatcgaga ttctgaccccccaacatgaccgcca agtgtacaagaccacagcttcacg actggaagatgaggagccacttaaca ggaagttcaggtacgagctccagatcc agaagaggatgaccccgtgatcacc gagcaggtgaggacagacatcctt ccagctgctgaatcccggcacatacac cgtgcagatcaggccagggaagg gtgtacgagttcctgctccctggagca ccccagagggtcaggtgaccagg	kedpnpitnlrmkakaqqltwdlrn vtdiecvkdadysmpavnnsycqgai slcevtnytrvanppfstwilfpensgk pwagaenltcwihdvdfscswavgpg apadvqydlylnvanrrqqyeelhykt aaqtrigcrfdisrslsgsqsshilvrgrs aafgipctdkfvvfsqieiltppnmtake nkthsfmhwkmrshfrkfrfryelqiqk rmqpviteqvrdrtsfqllnpptytvqira rervyeflsawstpqrfecdqeeantra wrssslndifeaqkiewhedykdddk dykdddkdykdddkhhhhhhhhh h	SEQ ID NO: 199 (SEQ ID NO:200)

	<p>aggagggagccaataaccaggcctgg agatcctcagtgctcaacgatattttga agccccaaaaattgagtgcatgaaga ttacaaggacgatgacgacaaagacta taaggacgacgacgataaggattaca ggatgacgatgataagccatcatcat caccatcaccaccactga</p>		
<p>Полнораз мерная человечес кая последова тельность CD123, изоформа 2 TRI074</p>	<p>atggtcctcctttggctcacgctgctcct gatgcacctgccctgtcctgcaaacg aaggagggtgggaagcctgggacagg tgcggagaatctgacctgctggattcat gacgtgatttctgagctgcagctggg cggtaggccccggggccccgcgga cgtccagtacacctgtacttgaacgtt gccaacaggcgtcaacagtacgagtg cttactacaaaacgatgctcaggga acacgtatcgggtgcttctgatgacat ctctcgaactccagcgttctcaaagt cccacatcctggtcggggcaggagc gcagccttggtatccccgcacagata agttgtcgtctttcacagattgagatatt aactcaccacaactgactgcaaatgt aataagacacattccttatgactggaa aatgagaagtattcaatcgcaatttc gctatgagcttcagatacaaaagagaat gcagcctgtaatcacagaacaggtcag agacagaacctcctccagctactcaat cctggaactacacagtacaataaga gccccggaaagagtgtatgaattctga gagcctggagcaccaccagcgttc gagtcgaccaggaggaggcgcaa acacacgtcctggcgacgtgctgc tgatcgctgggacgctgctggccc tggctgtgcttctgctgatctgcagaagg</p>	<p>ggkpwagaenltcwihdvdfscswav gpgapadvqydlylnvanrrqqyeelh yktdaqtrigcrfddisrlssgsqsshilv rgrsaafgipctdkfvvfsqieiltppnmt akcnkthsfmhwmrshfnrkfryelq iqkrmqpviteqvrdrtsfqlInpqtytv qirarervyeflsawstprfecdqeega ntrawrtsllialgtllalvcvfvicrrylv mqrlfpriphmkdpigdsfndklvv weagkagleclvtevqvqktrtrple qkliseedlaandildykdddkv</p>	<p>SEQ ID NO:201 (SEQ ID NO:202)</p>

	tatctggtgatgcagagactcttccccg catccctcacatgaaagaccccatcggt gacagcttccaaaacgacaagctggtg gtctgggagcgggcaagccgcct ggaggagtctctggtgactgaagtaca ggctgtgcagaaaactacgctacgcg gccgctcgagcagaaactcatctcaga agaggatctggcagcaaatgatatcct ggattacaaggatgacgacgataaggt taa		
Полнораз мерная последова тельность CD123 яванца, изоформа 1 TRI114	atggaagcccccccagctgctcttc ctgctgctctgtggctgacctgacacca ccggaaggaagacccaatgcccc atcaggaacctgagaatgaaggagaa ggcccagcagctcatgtggatctgaa caggaactgaccgactggagtgtat caagggcaccgactactccatgccccg catgaataacagctattgccaagtcggc gccatcagcctgtgagcaggtcaccaac tacaccgtgagagtgccagcccccc cttccacctgattctgtccctgaga acagggcaccctagggtggcctgct gagaatctgacatgctgggtccatgac gtggacttctgagctgagctgggtg gtgggacctgctgctcccctgacgtg cagtacgatctgtatctgaacaaccca actcccagcagcagctacaggtgcctgc actacaagacagcagctagaggcacc cagatcggctgacaggtcagatgatcg cccctctgagcagggatccaagagct cccatatcctggtgagggcaggtccg ccgctgtgagcattcctgaccgacaa gttcgtcttctcagccagatcgagagg ctgacccccctaacaatgacagggcag	kedpnapi/mlr/kekaqqlmwdlnr nvtdecikgtdysmpamnsycqfg aislcevtnytvrvasppfstwilfpensg tpragaenlctwvhdvdfscswvvgp aapadvqydllylnnpnsheqyrclhykt dargtqjgcrfddiapsrgsqsshilvrgr saavsipctdkfvffsqierltpnmtge cnethsfmhwkmkshfnrkfryelriq krmqpvrteqvrtdtsfqlpnpqyvtvqi raretyeflsawstpqrfecdqeegass rawrtllialgtllalcvflicrylvmqrl fpriphmkdpigdtdfqqdklvvweagk agleelvsevqvvekt	SEQ ID NO:203 (SEQ ID NO:204)

tgcaacgagacccacagcttcacac tggaaagatgaagagccattcaacagg aaattcaggtacgaactgaggattcaga agagaatgcagcccgtgaggacagag caggtgaggatacaaccagcttcag ctcccaatcctggcacctataccgtgc agatcagggctagagagaccgtgtac gagtttctgctccctggagcaccccc agaggtttgaatgtgaccaggaggagg gagcctccagaggcctggagaacc agcctcctcatgccctggcacactg ctggctctgctgtgtgttctgatctgc agaaggtacctggtgatcagaggctc ttcctaggattccccacatgaaggacc ccatcggcgacacctccagaggaca aactggtggtgtgggaagccgaaag gccggcctggaggaatgcctcgtgtcc gaggtgcaggtggtggagaagacct a		
---	--	--

Получение биспецифических CD123-связывающих молекул

Биспецифические CD123-связывающие молекулы, нацеленные на CD123 и CD3-эпсилон, TRI129 (SEQ ID NO: 129 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 130 (аминокислота)); TRI130 (SEQ ID NO: 131 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 132 (аминокислота)); TRI1123 (SEQ ID NO: 133 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 134 (аминокислота)); TRI124 (SEQ ID NO: 135 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 136 (аминокислота)); TRI137 (SEQ ID NO: 137 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 138 (аминокислота)); TRI125 (SEQ ID NO: 139 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 140 (аминокислота)); TRI126 (SEQ ID NO: 141 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 142 (аминокислота)); TRI127 (SEQ ID NO: 143 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 144 (аминокислота)); TRI134 (SEQ ID NO: 145 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 146 (аминокислота)); TRI128 (SEQ ID NO: 147 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 148 (аминокислота)); TRI131 (SEQ ID NO: 149 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 150 (аминокислота)); TRI132 (SEQ ID NO: 151 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 152 (аминокислота)); TRI138 (SEQ ID NO: 153 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 154 (аминокислота)); и TRI139 (SEQ ID NO: 155 (нуклеиновая кислота), SEQ ID NO: 156 (аминокислота)) были получены с использованием стандартных методов молекулярной биологии, основываясь на существующих биспецифических связывающих молекулах в качестве матриц и с использованием способов, в целом раскрытых, например, в публикации заявки РСТ № W0 2007/146968, публикация заявки на патент США № 2006/0051844, публикация заявки РСТ № W0 2010/040105, публикация заявки РСТ № W0 2010/003108 и патент США № 7166707 (см. также табл. 3). Вставку N-концевого анти-CD123-связывающего домена scFv осуществляли путем расщепления родительской матрицы и вставки scFv рестрикционными ферментами HindIII и XhoI, желаемые фрагменты идентифицировали и выделяли путем очистки в агарозном геле и лигировали. Вставка С-концевого анти-CD3-эпсилон-связывающего scFv-домена осуществлялась путем расщепления родительской матрицы и вставки scFv рестрикционными ферментами EcoRI и NotI, желаемые фрагменты были идентифицированы и выделены путем очистки в агарозном геле и лигированы.

Сборка конструкций с человеческими доменами scFv осуществлялась путем лигирования из трех частей с использованием фрагмента HindIII/BamHI, фрагмента BamHI/XhoI и вектора клонирования, разрезанного с помощью HindIII/XhoI. Это было использовано для получения последовательностей генов, соответствующих гуманизированным биспецифическим молекулам, продемонстрированным в табл. 4.

Таблица 6. Состав исходных гуманизированных конструкций

ID конструкции	Ориентация scFv	SEQ	ID	NO	SEQ	ID	NO
		нуклеотидов			аминокислот		
TRI129	VHVL	129			130		
TRI130	VLVH	131			132		
TRI123	VHVL	133			134		
TRI124	VLVH	135			136		
TRI139	VHVL	155			156		
TRI137	VHVL	137			138		
TRI125	VHVL	139			140		
TRI126	VHVL	141			142		
TRI127	VLVH	143			144		
TRI131	VHVL	149			150		
TRI132	VHVL	151			152		
TRI134	VHVL	145			146		
TRI128	VHVL	147			148		
TRI138	VHVL	153			154		

Экспрессия и очистка CD123-связывающих молекул и антител

Биспецифические CD123-связывающие молекулы, раскрытые в данном документе, были получены как путем транзientной трансфекции клеток человека HEK293, так и, в некоторых случаях, также путем стабильной трансфекции клеток CHO. Трансфицированные клетки очищали от супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии с белком А. Если агрегаты обнаруживались после аффинной хроматографии, вторичная эксклюзионная хроматография также применялась для обеспечения гомогенности белка.

Пример 2. Связывание CD123-связывающих молекул с CD123 (+) клеточными линиями

Для подтверждения того, что активность связывания с CD123 на поверхности раковых клеток была сохранена анти-CD123х-анти-CD3ε молекулами и перекрестную реактивность с CD123 яванца, была использована проточная цитометрия для количественного определения связывания сконструированных CD123-связывающих молекул с линиями клеток, экспрессирующими CD123.

Связывание моноспецифических и биспецифических белков с CD123(+) клеточными линиями

Исследования связывания на CD123 (+) Molm-13 (Matsuo, Y et al., 1997, Leukemia 11, 1469-1477.) раковой клеточной линии и клетках CHO, экспрессирующих CD123 яванца, выполняли с помощью стандартных процедур окрашивания на основе проточной цитометрии. Клеточная линия Molm-13 была получена от DSMZ (Брауншвейг, Германия). Клеточную линию Molm-13 культивировали в соответствии с предоставленными протоколами. Клетки яичника китайского хомячка (CHO), стабильно экспрессирующие полноразмерный белок CD123 яванца, были получены собственными силами. Типичный эксперимент метит 100000 клеток на лунку в 96-луночных планшетах с диапазоном от 1000 до 0,012 нМ связывающей молекулы в 100 мкл буфера PBS с 0,2% BSA и 2 мМ EDTA в течение 30 мин на льду с последующим промыванием и инкубацией с меченым PE вторичным антителом с минимальной межвидовой реактивностью, козьим анти-человеческим IgG Fcγ₂ F(ab')₂ (Jackson Laboratory) в течение 30 мин на льду. Сигнал от связанных молекул детектировали с использованием проточного цитометра LSR-II™ (BD Biosciences) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа проточной цитометрии FlowJo. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) связанных молекул на клетках определялась после исключения дублетов. Нелинейный регрессионный анализ для определения значений EC50 был выполнен в программном обеспечении для построения графиков и статистики GraphPad Prism 7®.

На фиг. 1A, 1B, 1C и 1D продемонстрировано связывание 13 различных биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε (TRI123, TRI125, TRI126, TRI127, TRI128, TRI129, TRI130, TRI131, TRI132, TRI134, TRI137, TRI138 и TRI139) в трех независимых экспериментах с CD123 (+) Molm-13 линией опухолевых клеток человека. В этих экспериментах использовались биспецифические конструкции, приготовленные из транзientно трансфицированных клеток HEK293. Четыре молекулы продемонстрировали сравнимые максимальные уровни связывания при насыщающих концентрациях. Наблюдаемые значения EC₅₀ для TRI125, TRI129, TRI130 и TRI139 находились в диапазоне 2-10 нМ. Эксперименты были повто-

рены для TRI129 и TRI130 из стабильно трансфицированных клеток CHO с аналогичными результатами (данные не представлены).

На фиг. 2А, 2В и 2С продемонстрировано связывание 13 различных биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε (TRI123, TRI125, TRI126, TRI127, TRI128, TRI129, TRI130, TRI131, TRI132, TRI134, TRI137, TRI138 и TRI139) в двух независимых экспериментах с клетками CHO, стабильно экспрессирующими белок CD123 яванца. Семь молекул продемонстрировали сравнимые максимальные уровни связывания при насыщающих концентрациях. Наблюдаемые значения EC₅₀ для TRI123, TRI126, TRI129, TRI130, TRI132, TRI137 и TRI139 находились в диапазоне 3-38 нМ.

Эти результаты подтверждают, что сконструированные молекулы анти-CD123х и анти-CD3ε сохраняют связывающую активность с CD123 человека на поверхности раковых клеток и перекрестно реагируют с CD123 яванца.

Пример 3. Анализ перенаправленной Т-клеточной цитотоксичности с CD123(+) клеточными линиями.

Чтобы подтвердить, что биспецифические молекулы, связывающиеся как с CD123, так и с CD3ε, могут перенаправлять цитотоксичность Т-клеток анти-CD123(+) клеточной линии, были использованы анализы высвобождения хрома-51 для количественной оценки лизиса клеток-мишеней, индуцированного Т-клетками.

Анализ высвобождения хрома-51 с CD123(+) клеточными линиями

Опухолевую клеточную линию человека Molm-13 культивировали согласно предоставленным протоколам. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из крови человека с использованием стандартных градиентов фикола. Выделенные клетки промывали в забуференном физиологическом растворе. МКПК культивировали в течение 24 ч с человеческим Т-активатором CD3/CD28 Dynabeads® (каталог № 11131D, Gibco Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) для активации Т-клеток с использованием протоколов производителей. После 24 ч культивирования МКПК собирали и помещали в магнитное поле для удаления Dynabeads. Выделенные клетки промывали средой RPMI + 10% человеческой сыворотки. Во время анализа концентрации биспецифических молекул с конечной концентрацией в диапазоне от 1000 до 0,061 пМ добавляли к активированным МКПК (около 100000 на лунку).

Около 2,5×10⁶ клеток-мишеней Molm-13 обрабатывали 0,125 мКю ⁵¹Сг и инкубировали в течение 90 мин в инкубаторе с увлажнением и 5% CO₂ при 37°C. После инкубации клетки промывали 3 раза средой для анализа (RPMI с 10% человеческой сыворотки) и ресуспендировали в 12,5 мл среды для анализа. Из этой суспензии 50 мкл распределяли на лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (около 10000 клеток на лунку), чтобы довести общий объем до 200 мкл на лунку, и соотношение МКПК к целевым клеткам составляло 10:1. Контроль с нулевым лизисом генерировали только клетки-мишени, без МКПК. Полный контроль лизиса был получен путем включения 0,20% NP-40 в качестве обработки только клетками-мишенями. Фоновый контроль лизиса генерировали с помощью клеткок-мишеней с МКПК в отсутствие биспецифических молекул.

Планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением, после чего их центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 мин и 25 мкл супернатанта переносили из каждой лунки в соответствующую лунку 96-луночного планшета Luma для образцов. Планшеты для образцов оставляли сушиться на воздухе под химической вытяжкой в течение 18 ч, а затем считывали радиоактивность на сцинтилляционном счетчике для микропланшетов TopCount (PerkinElmer) с использованием стандартного протокола.

Процент специфического лизиса рассчитывали по формуле: ((сигнал в образце, обработанном препаратом - фоновый сигнал от образцов только с целевой клеткой)/(сигнал в лунках с полным лизисом - фоновый сигнал от образцов только с целевой клеткой)) × 100.

На фиг. 3А, 3В и 3С продемонстрированы анализы высвобождения хрома-51 с клеточной линией Molm-13, измеренные через 4 часа с использованием 13 различных биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε (TRI123, TRI125, TRI126, TRI127, TRI128, TRI129, TRI130, TRI131, TRI132, TRI134, TRI137, TRI138 и TRI139) в двух независимых экспериментах. Все биспецифические молекулы анти-CD123х анти-CD3ε показали эффективный лизис клеток-мишеней через 4 ч в диапазоне от 24 до 48% максимального специфического лизиса. Измеренные значения EC₅₀ находились в диапазоне 3-37 пМ через 4 ч.

Анализ перенаправленной цитотоксичности Т-клеток также выполняли с клетками CHO, стабильно экспрессирующими белок CD123 яванца (TRI129 и TRI130) с (i) Molm-13 (человеческий CD123 + клетки) и человеческими Т-клетками, (ii) Molm-13 (человеческий CD123 + клетки) и Т-клетки яванца и (iii) клетки CHO, стабильно экспрессирующие CD123 яванца и человеческие Т-клетки. Данные показывают, что TRI129 и TRI130 являются перекрестно-реактивными по отношению к CD123+ клеткам человека и яванца и Т-клеткам.

Эти результаты подтверждают, что биспецифические молекулы, связывающиеся как с CD123, так и с CD3ε, могут перенаправлять цитотоксичность Т-клеток анти-CD123(+) клеточной линии.

Пример 4: Мишень-зависимая пролиферация Т-клеток, индуцированная анти-CD123(+) клеточной линии биспецифическими молекулами анти-CD123

Для сравнения эффективности различных биспецифических молекул, связывающих CD123, при индукции зависимой от мишени пролиферации Т-клеток, шесть различных биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε, включая TRI123, TRI126, TRI129, TRI130, TRI132 и TRI139, были протестированы в двух независимых экспериментах.

Пролиферацию Т-клеток оценивали проточной цитометрией с использованием CD123(+) клеточной линии, Molm-13. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из крови человека с использованием стандартных методов разделения по градиенту плотности. Выделенные клетки промывали в забуференном физиологическом растворе. Т-клетки дополнительно выделяли с использованием Pan T-cell Isolation Kit II от Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Германия) с использованием протокола производителя. Клетки Molm-13 облучали для предотвращения деления клеток с использованием рентгеновской системы облучения Faxitron-CellRad от компании Faxitron Bioptics LLC (Тусон, Аризона, США).

Пролиферацию оценивали путем маркировки изолированных популяций Т-клеток CFSE. Меченные CFSE Т-клетки высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в количестве 120000 клеток/луноку, соответственно, с 30000 опухолевых клеток Molm-13/луноку, чтобы достичь приблизительного соотношения Т-клеток к опухолевым клеткам 4: 1. Концентрации тестируемых молекул в диапазоне от 2,000 мкМ до 0,002 мкМ были добавлены к смеси клеток до конечного объема 200 мкл/луноку в среде RPMI 1640, дополненной 10% человеческой сыворотки АВ, пируватом натрия, антибиотиками и заменимыми аминокислотами. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторах с увлажнением. Через 4 дня клетки метили антителами для анализа проточной цитометрией в оригинальных планшетах для минимизации потерь клеток, используя физиологический буфер с 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 2 мМ ЭДТА. После центрифугирования и удаления супернатанта клеточные осадки ресуспендировали со смесью следующих меченых красителем антител в объемах по 50 мкл: CD5-PE, CD8-Pacific Blue, CD25-PE-Cy7 и 7AAD и инкубировали в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в объемах по 120 мкл непосредственно перед измерением 50% каждой луночки в проточном цитометре BD LSR II. Файлы образцов были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo для расчета процентного содержания CD4⁺ (CD8⁻) или CD8⁺ Т-клеток, которые подверглись по меньшей мере одному делению клеток, в соответствии с их профилем CFSE, путем последовательного гейтирования в прямом и боковом рассеянии, 7AAD⁻, CD5⁺, CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки (7AAD⁻, CD5⁺ CD8⁻ или 7AAD⁻ CD5⁺ CD8⁺ соответственно). Графики были построены с использованием GraphPad Prism 7. 0.

Анализ делящихся популяций Т-клеток (фиг. 4А и 4В) выявил значительное увеличение процента пролиферирующих клеток в присутствии клеток Molm-13. Все молекулы показали сильную индукцию пролиферации Т-клеток при низких концентрациях (10 пМ), и пролиферация была немного выше в CD8 (фиг. 4В), чем в CD4⁺ (CD8⁻) (фиг. 4А) Т-клеточной популяции. Значения EC₅₀ определяли с помощью TRI129, TRI130 и TRI139 для популяций CD4 (фиг. 4С) и CD8 (фиг. 4D), демонстрирующих сходную активность для всех трех биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε.

Эти результаты подтверждают, что биспецифические молекулы, связывающиеся как с CD123, так и с CD3ε, могут индуцировать зависимую от мишени пролиферацию Т-клеток против CD123(+) клеточной линии.

Пример 5: Определение фармакокинетики у репрезентативных неклинических видов

Чтобы определить фармакокинетику у соответствующих неклинических видов, биспецифическую молекулу анти-CD123х анти-CD3 тестируют на видах, приматов, отличных от человека (NHP - Non-Human Primate) (например, обезьяны яванца), для фармакокинетической (ФК) и токсикологической оценки анти-СВ123х анти-CD3 молекулы. Перекрестную реактивность анти-CD123-связывающего домена с CD123 NHP проверяют с помощью ИФА или анализов поверхностного плазмонного резонанса (аналогично примеру 2). Поскольку идентичность последовательностей между CD123 NHP и человека составляет 85,7%, ожидается эквивалентное связывание. ФК и анализы иммуногенности могут быть разработаны и использованы для обнаружения и количественного определения молекулы анти- CD123х анти-CD3 в присутствии сыворотки яванца, а также для оценки реакции иммуногенности в NHP. После успешного выполнения этих задач, чтобы оправдать яванских макаков в качестве релевантного вида для проверки токсичности для молекул, нацеленных на CD123, проводят эксперимент с однократной дозой ФК/переносимость. Исследование может быть выполнено в квалифицированной клинической исследовательской организации (CRO - clinical research organization). Результаты исследования изучаются на предмет параметров ФК и любых нежелательных явлений, включая необъяснимые нежелательные явления, которые нельзя отнести к механизму действия лекарства или к антителам против лекарств (ADA -anti-drug antibodies). Токсиколог проверяет и интерпретирует результаты исследования и поддерживает дальнейшее развитие оптимизированного прототипа. Параметры ФК, полученные из этого исследования, используются для разработки будущих токсикологических исследований у приматов, отличных от человека, и/или клинических исследований на людях.

Пример 6. Тестирование безопасности и переносимости при клиническом применении у человека

Для определения безопасности и переносимости на людях биспецифической молекулы оптимизированного прототипа, нацеленной на CD123 и CD3, может быть проведено следующее клиническое исследование фазы 1. Первое исследование на людях биспецифической молекулы анти-CD123х анти-CD3 может быть исследованием с повышением дозы для определения максимальной переносимой дозы (MTD - maximum tolerated dose) при введении человеку.

Поскольку биспецифические молекулы анти-CD123х анти-CD3 являются агонистическими, начальная доза устанавливается равной дозе, обеспечивающей минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта (MABEL - Minimum Anticipated Biological Effect Level), на основе активности анти-CD123х анти-CD3 *in vitro*. Фармакокинетика (ФК) у человека оценивается с использованием значений ФК, определенных на неклинических моделях (мыши или приматы, отличные от человека) и аллометрического масштабирования для прогнозирования дозы, дающей MABEL. Биспецифическая молекула дозируется с помощью внутривенной инфузии или подкожной инъекции. Повышение дозы следует стандартному плану 3 + 3 с ожидаемыми 12 дозовыми группами (N = 24-72 пациентов). Частота дозы зависит от наблюдаемой ФК в неклинических исследованиях, но может быть еженедельной (QW), раз в две недели (Q2W), каждую третью неделю (Q3W) или ежемесячной (Q4W). Дозирование продолжается до прогрессирования заболевания (как определяется критериями ответа, связанными с иммунным ответом (irRC - immune-related response criteria) или критериями ответа в солидных опухолях (RECIST - response criteria in solid tumors)).

Главным измеряемым параметром исследования является безопасность, определение MTD и любых токсичностей, ограничивающих дозу. Вторичными измеряемыми параметрами исследования являются ФК, иммуногенность и объективные ответы в объеме опухоли, оцениваемые по критериям irRC или RECIST. Для пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями могут оцениваться дополнительные критерии, такие как наличие минимального остаточного заболевания (статус MRD). При необходимости или по возможности образцы биомаркеров берутся из цельной крови, а также из биопсий лимфатических узлов или костного мозга для мониторинга воздействия на иммунную систему, а также влияния на рак или злокачественные новообразования.

Критерии включения в исследование фазы 1 могут быть широкими и позволяют включать пациентов с рефрактерным или рецидивирующим заболеванием со многими диагнозами при которых ранее было продемонстрировано, что экспрессия CD123 является высокой, такими как острый миелолейкоз (ОМЛ), В-лимфолейкоз, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (ОБПДК) и волосатоклеточный лейкоз. Пациенты, входящие в исследование, нуждаются в доказательстве экспрессии CD123 путем иммуногистохимического (ИГХ) анализа либо путем изучения архивных образцов биопсии первичной опухоли, либо из биопсии рецидивирующей опухоли из метастатического участка до лечения.

Биспецифическая молекула анти-CD123х анти-CD3 определяется как достаточно безопасная, если у пациентов, которым вводят дозу на уровне MTD или ниже MTD, обнаруживаются доказательства клинической пользы, либо из объективных ответов по критериям irRC или RECIST, либо из изменений в потенциально прогностических биомаркерах сыворотки, таких как СТС, PSA или TAG72.

Таблица 7. Последовательности изоформ CD123 человека
(Национальный центр биотехнологической информации)

Название	Нуклеотидная последовательность (мРНК)	Аминокислотная последовательность (полная)	SEQ ID NO (SEQ ID NO аминокислоты)
CD123, изоформа 1	GTCAGGTTTCATGGTTACGAAGC TGCTGACCCCAGGATCCCAGCC CGTGGGAGAGAAGGGGGTCTC TGACA	MVLLWLTLLLIALPCLLQTK EDNPPITNLRMKAKAQQLT WDLNRNVTDIECVKDADYS MPAVNNSYCQF	SEQ ID NO:205
NM_00218 3.3	GCCCCACCCCTCCCCACTGCC AGATCCTTATTGGGTCTGAGTT	GAISLCEVTNYTVRVANPPF STWILFPENSGKPWAGAENL	(SEQ ID
NP_00217 4.1	TCAGGGGTGGGGCCCCAGCTGG AGGT TATAAAACAGCTCAATCGGGGA GTACAACCTTCGGTTTCTCTTCG GGGAAAGCTGCTTTCAGCGCAC ACG GGAAGATATCAGAAACATCCTA GGATCAGGACACCCCAGATCTT CTCAACTGGAACCACGAAGGCT	TCWIHDVDFLSCSWAVGPG APADVQYDLYL NVANRRQQYECLHYKTDA QGTRIGCRFDDISRLSSGSQS SHILVRGRSAAFIPCTDKFV VFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKM RSHFNRKFRYELQIQKRMQP VITEQVRDRTSFQLLNPGTY	NO:206)

GTTT CTTCCACACAGTACTTTGATCT CCATTTAAGCAGGCACCTCTGT CCTGCGTTCCGGAGCTGCGTTC CCGA TGGTCCTCCTTTGGCTCACGCT GCTCCTGATCGCCCTGCCCTGT CTCCTGCAAACGAAGGAAGATC CAAA CCCACCAATCACGAACCTAAGG ATGAAAGCAAAGGCTCAGCAG TTGACCTGGGACCTAACAGAA ATGTG ACCGATATCGAGTGTGTTAAAG ACGCCGACTATTCTATGCCGGC AGTGAACAATAGCTATTGCCAG TTTG GAGCAATTTCCCTTATGTGAAGT GACCAACTACACCGTCCGAGTG GCCAACCCACCATTCTCCACGT GGAT CCTCTTCCCTGAGAACAGTGGG AAGCCTTGGGCAGGTGCGGAG AATCTGACCTGCTGGATTCATG ACGTG GATTTCTTGAGCTGCAGCTGGG CGGTAGGCCCGGGGGCCCCCGC GGACGTCCAGTACGACCTGTAC TTGA ACGTTGCCAACAGGCGTCAACA GTACGAGTGTCTTCACTACAAA ACGGATGCTCAGGGAACACGT ATCGG GTGTCGTTTCGATGACATCTCT CGACTCTCCAGCGGTTCTCAA	TVQIRARERVYE FLSAWSTPQRFECQEEGAN TRAWRTSLLIALGTLALVC VVICRRYLVMQRLFPRIPH MKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLV TEVQVVQKT
---	---

<p>GTTCCACATCCTGGTGCGGGG CAGG AGCGCAGCCTTCGGTATCCCCT GCACAGATAAGTTTGTGCTCTT TTCACAGATTGAGATATTA ACT CCAC CCAACATGACTGCAAAGTGTA A TAAGACACATTCCTTTATGCAC TGGAAAATGAGAAGTCATTTCA ATCG CAAATTCGCTATGAGCTCAG ATACAAAAGAGAATGCAGCCT GTAATCACAGAACAGGTCAGA GACAGA ACCTCCTCCAGCTACTCAATC CTGGAACGTACACAGTACAAAT AAGAGCCCGGGAAAGAGTGTA TGAAT TCTTGAGCGCCTGGAGCACCCC CCAGCGCTTCGAGTGCACCAG GAGGAGGGCGCAAACACACGT GCCTG GCGGACGTCGCTGCTGATCGCG CTGGGGACGCTGCTGGCCCTGG TCTGTCTTCGTGATCTGCAG AAGG TATCTGGTGATGCAGAGACTCT TTCCCCGATCCCTCACATGAA AGACCCCATCGGTGACAGCTTC CAAA ACGACAAGCTGGTGGTCTGGGA GGCGGGCAAAGCCGGCCTGGA GGAGTGTCTGGTACTGAAGTA CAGGT CGTGCAGAAACTTGAGACTGG</p>		
---	--	--

	GGTTCAGGGCTTGTGGGGTCT GCCTCAATCTCCCTGGCCGGGC CAGG CGCCTGCACAGACTGGCTGCTG GACCTGCGCACGCAGCCCAGG AATGGACATTCTAACGGGTGG TGGGC ATGGGAGATGCCTGTGTAATTT CGTCCGAAGCTGCCAGGAAGA AGAACAGAACTTTGTGTGTTA TTTCA TGATAAAGTGATTTTTTTTTTTT TAACCCAAAA		
CD123, изоформа 2 NM_00126 7713. 1 NP_00125 4642. 1	GTCAGGTTTCATGGTTACGAAGC TGCTGACCCCAGGATCCCAGCC CGTGGGAGAGAAGGGGGTCTC TGACA GCCCCACCCCTCCCCACTGCC AGATCCTTATTGGGTCTGAGTT TCAGGGGTGGGGCCCCAGCTGG AGGT TATAAACAGCTCAATCGGGGA GTACAACCTTCGGTTTCTCTTCG GGGAAAGCTGCTTTCAGCGCAC ACG GGAAGATATCAGAAACATCCTA GGATCAGGACACCCCAGATCTT CTCAACTGGAACCCAGGAAGGCT GTTT CTCCACACAGTACTTTGATCT CCATTTAAGCAGGCACCTCTGT CCTGCGTTCCGGAGCTGCGTTC CCGA TGGTCCTCCTTTGGCTCACGCT	MVLLWLTLLLIALPCLLQTK EGGKPWAGAENLTCWIHDV DFLSCSWAVGPGAPADVQY DLYLNVANRRRQQ YECLHYKTDAQGTRIGCRF DDISRLSSGSQSSHILVRGRS AAFQIPCTDKFVVFVFSQIEILT PPNMTAKCN KTHSFMHWKMRSHFNKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDR TSFQLLNPGTYTVQIRARER VYEFLSAWSTP QRFECDAQEEGANTRAWRTS LLIALGTLALVCVFVICRR YLVMQRLFPRIPHKDPIGD SFQNDKLVVWE AGKAGLEECLVTEVQVVQK T	SEQ ID NO:2 07 (SEQ ID NO:2 08)

<p>GCTCCTGATCGCCCTGCCCTGT CTCCTGCAAACGAAGGAAGGT GGGAA GCCTTGGGCAGGTGCGGAGAAT CTGACCTGCTGGATTCATGACG TGGATTCTTGAGCTGCAGCTG GGCG GTAGGCCCGGGGGCCCCGCG GACGTCCAGTACGACCTGTACT TGAACGTTGCCAACAGGCGTCA ACAGT ACGAGTGTCTTCACTACAAAAC GGATGCTCAGGGAACACGTATC GGGTGTCGTTTCGATGACATCT CTCG ACTCTCCAGCGTTCTCAAAGT TCCCACATCCTGGTGCGGGGCA GGAGCGCAGCCTTCGGTATCCC CTGC ACAGATAAGTTTGTCGTCTTTT CACAGATTGAGATATTAECTCC ACCCAACATGACTGCAAAGTGT AATA AGACACATTCCTTTATGCACTG GAAAATGAGAAGTCATTCAAT CGCAAATTCGCTATGAGCTTC AGAT ACAAAAGAGAATGCAGCCTGT AATCACAGAACAGGTCAGAGA CAGAACCTCCTCCAGCTACTC AATCCT GGAACGTACACAGTACAAATA AGAGCCCGGAAAGAGTGTAT GAATTCTTGAGCGCCTGGAGCA CCCCC</p>		
---	--	--

AGCGCTTCGAGTGCACCAGGA GGAGGGCGCAAACACACGTGC CTGGCGGACGTCGCTGCTGATC GCGCT GGGGACGCTGCTGGCCCTGGTC TGTGTCTTCGTGATCTGCAGAA GGTATCTGGTGATGCAGAGACT CTTT CCCCGCATCCCTCACATGAAAG ACCCCATCGGTGACAGCTTCCA AAACGACAAGCTGGTGGTCTGG GAGG CGGGCAAAGCCGGCCTGGAGG AGTGTCTGGTGAAGTACA GGTCGTGCAGAAAAGTGGAGAC TGGGG TTCAGGGCTTGTGGGGTCTGC CTCAATCTCCCTGGCCGGGCA GGCGCCTGCACAGACTGGCTGC TGGA CCTGCGCACGCAGCCAGGAAT GGACATTCTAACGGGTGGTGG GCATGGGAGATGCCTGTGTAAT TTCG TCCGAAGCTGCCAGGAAGAAG AACAGAACTTTGTGTGTTATT TCATGATAAAGTGATTTTTTTTT TTTT AACCCAAA		
--	--	--

Пример 7. Мишень-зависимая активация Т-клеток, индуцированная против CD123(+) клеточной линии анти-CD123 биспецифическими молекулами

Для сравнения эффективности различных биспецифических CD123-связывающих молекул при индукции зависимой от мишени активации Т-клеток CD4 и CD8 Т-клеток, шесть различных анти-CD123х анти-CD3ε биспецифических молекул, включая TRI123, TRI126, TRI129, TRI130, TRI132 и TRI139 были протестированы в двух независимых экспериментах.

Активацию Т-клеток оценивали проточной цитометрией с использованием CD123(+) клеточной линии, Molm-13. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из крови человека с использованием стандартных методов разделения по градиенту плотности. Выделенные клетки промывали в забуференном физиологическом растворе. Т-клетки дополнительно выделяли с использованием Pan T-cell Isolation Kit II от Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Германия) с использованием протокола производителя.

Т-клетки высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном при 120000 клеток/лунку, соответственно, с 30000 опухолевых клеток Molm-13/лунку, чтобы достичь приблизительного соотношения Т-клеток к опухолевым клеткам 4: 1. Концентрации тестируемых молекул в диапазоне от 2,000 до 0,002 мкМ были добавлены к смеси клеток до конечного объема 200 мкл/лунку в среде RPMI 1640, дополненной 10% человеческой сыворотки АВ, пируватом натрия, антибиотиками и заменимыми аминокислотами. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторах с увлажнением. Через 20 ч клетки метили антителами для проточной цитометрического анализа в оригинальных планшетах, чтобы минимизировать потери клеток, используя физиологический буфер с 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 2 мМ ЭДТА. После центрифугирования и удаления супернатанта клеточные осадки ресуспендировали со смесью следующих антител, меченных красителем, в объемах по 50 мкл: CD69-FITC, CD5-PE, CD8-Pacific Blue, CD4-APC, CD25-PE-Cy7 и 7AAD и инкубировали в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в объемах по 120 мкл непосредственно перед измерением 50% каждой лунки в проточном цитометре BD LSRII. Файлы образцов были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo для расчета процентного содержания CD4⁺ (CD8⁺) или CD8⁺ Т-клеток,

которые имели увеличение экспрессии CD69 и CD25, путем последовательного гейтирования на прямом и боковом рассеянии, 7AAD⁻, CD5⁺, CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки (7AAD⁻, CD5⁺ CD4⁺ или 7AAD⁻ CD5⁺ CD8⁺ соответственно). Графики были построены с использованием GraphPad Prism 7. 0.

Анализ активированных Т-клеток через 20 ч (фиг. 5) выявил значительное увеличение процента активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в присутствии клеток

Molm-13. Все протестированные молекулы индуцировали максимальную активацию Т-клеток в присутствии клеток-мишеней Molm-13 при низких концентрациях в диапазоне от 1 до 100 пМ (фиг. 5). Значения EC₅₀ определяли для TRI129, TRI130 и TRI139 для популяций CD4⁺ (фиг. 5C) и CD8⁺ (фиг. 5D) CD25⁺ CD69⁺, и они демонстрировали сходную активность для всех трех биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3ε.

Эти результаты демонстрируют, что биспецифические молекулы, связывающиеся как с CD123, так и с CD3ε, могут индуцировать зависимую от мишени активацию Т-клеток против CD123(+) клеточной линии.

Пример 8. Связывание биспецифических белков с CD123

Для определения кинетики и аффинности биспецифика к CD123 биспецифические белки TRI-129 и TRI-130 экспрессировали путем транзientной трансфекции в клетках HEK293 и очищали с использованием комбинации аффинной очистки с исключением по размеру. Внеклеточный домен CD123 был транзientно экспрессирован с аффинным тэгом на С-конце и очищен с использованием комбинации аффинной очистки и очистки с исключением по размеру. Анализы выполняли с использованием прибора BIACORE™ T200 (Biacore Inc., Пискатавей, Нью Джерси). BIACORE™ T200 представляет собой биосенсорную систему на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR - surface plasmon resonance), которая предназначена для предоставления данных кинетического связывания в реальном времени.

Исследования связывания SPR биспецифических молекул с рекомбинантным мономерным эктодоменом CD123 (ECD - ectodomain) проводили при 25°C в буфере HBS-EP +. Фрагмент AffiniPure F(ab')₂, специфичный к Fcγ-фрагменту козьего античеловеческого IgG (Jackson Immuno Research) в концентрации 20 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия (pH 4,5), был иммобилизован при плотности 3600 единиц ответа (RU - response unit) на поверхность сенсорного чипа исследовательского класса CM5 (R-1005-30, GE Healthcare) с помощью стандартной химии аминной связи. Полученные биспецифические молекулы при 200 нМ в HBS-EP + буфере захватывались иммобилизованным анти-Fc F(ab')₂-фрагментом, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 120 с, чтобы достичь стабильного ответа 2000 RU. Различные концентрации ECD CD123 (3-48 нМ 2-кратными разведениями, включая буфер в виде холостого раствора) пропускали через захваченные биспецифические молекулы со скоростью 30 мкл/мин в течение 120 с с последующим периодом диссоциации 300 с. Оптимальная регенерация была достигнута одной инъекцией 10 mM глицина (pH 1,7) при скорости потока 30 мкл/мин в течение 15 с, а затем одной инъекцией 50 mM NaOH при 30 мкл/мин в течение 15 с. Двухминутная стабилизация буфером HBS-EP + была завершена перед последующим прогоном.

Сенсограммы, полученные из кинетических SPR измерений, были проанализированы методом двойного вычитания. Сигнал от контрольной проточной ячейки вычитали из сигнала реакции связывания аналита, полученного из проточной ячейки с иммобилизованными или захваченными лигандами. Буферные контрольные ответы затем усреднялись по нескольким инъекциям. Затем усредненные контрольные ответы буфера вычитали из ответов связывания аналита, и окончательные данные с учетом двух источников анализировали с помощью программного обеспечения для оценки BIACORE™ T200 (2.0, GE Healthcare), глобально подгоняя данные для получения кинетических параметров (табл. 8). Все сенсограммы были подогнаны с использованием простой модели связывания "один к одному".

Таблица 8. Полученные кинетические параметры для а CD123 биспецифических молекул к ECD CD123

Молекула	к _а (1/мс)	к _д (1/с)	КД(нМ)
TRI-129	1,79×10 ⁵	2,05×10 ⁻³	11,4
TRI-130	1,72×10 ⁵	4,72×10 ⁻⁴	2,7

Пример анализа SPR TRI-130 при различных концентрациях ECD в диапазоне от 3 до 48 нМ продемонстрирован на фиг. 6. Термодинамические и кинетические константы скорости связывания рассчитывали с использованием программного обеспечения для расчета BIACORE™. Например, аффинность (KD) TRI-130 к внеклеточному домену (ECD) CD123 была определена как составляющая 2,74×10⁻⁹ М с k_a 1,72×10⁵ М⁻¹ с⁻¹ и k_d 4,72×10⁻⁴ с⁻¹. Было определено, что аффинность TRI-129 к CD123 составляет 1,14×10⁻⁸ М с k_a 1,79 ×10⁵ М⁻¹ с⁻¹ и k_d 2,05×10⁻³ с⁻¹. точка теплового перехода CD123-связывающего домена scfv, которое является мерой его стабильности, можно извлечь из кривой плавления.

Исследование термостабильности с помощью DSC проводили с использованием системы MicroCal VP-Capillary DSC (Malvern Instrument). Точное совпадение буфера, PBS pH 7,4, использовали как контроль. 500 мкл раствора 0,5 мг/мл каждого образца белка с контролем загружали на прибор и нагревали от 25°C до 100°C со скоростью один градус Цельсия в минуту. Кривая плавления была проанализирована с использованием программного обеспечения для платформы Origin 7 "MicroCal VP-Capillary DSC Auto-

mated Analysis Software". T_m каждого перехода плавления рассчитывали по методу "интеграция с не-2 состояниями" ("pop-2 state cursor integration").

Таблица 9. Оценка термостабильности доменов

Образец	T_m Onset	T_m1 (α CD3 scFv)	T_m2 (α CD123 scFv и Fc CH2)	T_m3 (Fc CH3)
TRI129	51,19	59,59	64,48	83,87
TRI130	53,19	59,59	65,71	84,64

Пример 10. Фармакокинетическая активность

Для определения фармакокинетической активности биспецифических молекул самкам мышей Balb/c внутривенно (в/в) вводили 200 мг (~ 10 мг/кг) либо TRI129, либо TRI130 (n= 30 для каждой молекулы, TRI129 или TRI130). В каждый момент времени кровь собирали пункцией из сердца у 3 мышей. Временные точки были следующими: 15 мин, 2, 6, 24, 48, 72, 96, 168, 336 и 504 ч. Кровь была переработана в сыворотку, аликвотирована и заморожена. Концентрации TRI129 и TRI130 в образцах сыворотки крови определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрации в сыворотки в зависимости от времени были использованы для определения оценок параметров ФК с помощью некомпартментального анализа (NCA - non-compartmental analysis) и компартментального анализа. Профили концентрации сыворотки во времени анализировали с помощью программного обеспечения Phoenix 64. Графики были построены с использованием GraphPad Prism 7.0. Анализ параметров NCA полученных данных приведен в табл. 10.

Таблица 10. Анализ данных с помощью параметра NCA

Биспецифик	$T_{1/2}$	Клиренс	Объем	AUC
TRI-129	229 часов (9,5 дней)	0,204 мл/час/кг	67,54 мл/кг	38750ч*мкг/мл
TRI-130	301 час (12,5 дней)	0,186 мл/час/кг	80,84 мл/кг	37309ч*мкг/мл

На фиг. 7 продемонстрированы кривые зависимости концентрации от времени для биспецифических молекул TRI129 и TRI130.

Пример 11. Эффективность in vivo анти-CD123 X анти-CD3 связывающих молекул

Чтобы определить, способны ли TRI129 и TRI130 ингибировать рост опухоли и продлевать выживание in vivo, была использована модель острого миелоидного лейкоза человека у грызунов. Клетки MOLM-13/LUC смешивали с донорскими Т-клетками и матригелем и имплантировали в бок мышей NOD/SCID в день 0 исследования. Животных обрабатывали в группах по 10 мышей в группе Т-клетками от одного донора с носителем, TRI129 или TRI130 в день исследования 0, 4 и 8 в дозах 15, 3 и 0,6 мкг белка в общем объеме 200 мкл. Рост опухоли измеряли штангенциркулями с течением времени во время исследования, и события выживания регистрировали каждый раз, когда мышь достигала измеряемого параметра (объем опухоли ≥ 1500 мм³) и подвергали эвтаназии. Как продемонстрировано на фиг. 8 и 9, было минимальное влияние TRI129 и TRI130 в отсутствие донорных Т-клеток и минимальное влияние Т-клеток на рост опухоли только донорскими Т-клетками. Значительное ингибирование роста опухоли наблюдалось после лечения как TRI129, так и TRI130 при всех испытанных дозах в присутствии донорных Т-клеток. Значительные различия в средней выживаемости мышей были определены с использованием анализа выживаемости Каплана-Мейера с логарифмическим тестом для сравнения кривых выживаемости. Как продемонстрировано на фиг. 10, выживаемость мышей, получавших все испытанные дозы TRI129 и TRI130 в присутствии ко-имплантированных человеческих Т-клеток, была значительно продлена относительно всех контрольных групп. Ни ко-имплантация Т-клеток при лечении носителем, ни лечение опухолей TRI129 или TRI130 в отсутствие человеческих Т-клеток не увеличивала выживаемость по сравнению с мышами, которым имплантировали только опухолевые клетки и получавшими носитель. Этот результат демонстрирует, что как TRI129, так и TRI130 способны стимулировать ингибирование роста опухоли и продлевать выживание в ксенотрансплантатной модели острого миелоидного лейкоза.

Пример 12. Цитотоксичность TRI-130 специфична для клеточных линий, экспрессирующих CD123

Чтобы подтвердить специфичность TRI130 и сравнить его цитотоксическую активность на линиях опухолевых клеток, экспрессирующих разные уровни CD123, были использованы анализы высвобождения хрома-51 для количественной оценки лизиса клеток-мишеней, индуцированного Т-клетками. Уровни экспрессии CD123 на линиях опухолевых клеток OML MOLM-13 и KG-1a, положительных по CD123, сравнивали с линией опухолевых клеток Daudi лимфомы Беркитта, отрицательной по CD123, методом проточной цитометрии. Экспрессия CD123 была обнаружена с использованием коммерческого доступного человеческого конъюгированного антитела анти-CD123-фикоэритрин (PE). Положительная экспрессия CD123 была обнаружена на MOLM-13 и KG-1a, но не на клетках Daudi. Клетки MOLM-13 и KG-1a экспрессировали в среднем 10000 и 2000 рецепторов на клетку соответственно (данные не представлены). Различные концентрации TRI130 инкубировали с клеточными линиями MOLM-13, KG-1a или Daudi и очищенными Т-клетками человека, свежeweделенными из периферической крови человека, затем предварительно активировали связанными анти-CD3х анти-CD28 гранулами в течение 24 ч. TRI130 индуци-

рвал цитотоксичность только в клеточных линиях, которые были позитивными в отношении экспрессии CD123 и демонстрировали сравнимую активность между линиями опухолевых клеток MOLM-13 и KG-1a ОМЛ (фиг. 12). Цитотоксичность измеряли как процент специфического лизиса опухолевых клеток, оцениваемый с использованием анализа высвобождения хрома-51 с временными точками 4 ч и 24 ч (данные не представлены). Эти результаты подтверждают, что TRI130-индуцированная цитотоксичность перенаправленных Т-клеток специфична для клеток-мишеней, экспрессирующих CD123, и демонстрирует сильную цитотоксичность TRI130 на линиях опухолевых клеток ОМЛ, экспрессирующих различные уровни белка CD123.

Пример 13. Индуцированная TRI130 цитотоксичность с наивными Т-клетками при различных соотношениях эффекторных и целевых клеток

Чтобы исследовать TRI130-индуцированную цитотоксическую активность при разных соотношениях эффекторных клеток-мишеней, клетки KG-1a, которые экспрессируют умеренные уровни CD123, инкубировали с различными концентрациями TRI130 и очищенными Т-клетками от пяти различных доноров-людей, которые не были предварительно активированы. Клетки-мишени KG-1a культивировали с Т-клетками при соотношении эффекторных и целевых клеток 10:1, 5:1 и 1:1. TRI130 индуцировал цитотоксическую активность всех протестированных соотношений эффекторных клеток-мишеней для всех пяти доноров (данные не представлены). Цитотоксичность измеряли как процент специфического лизиса опухолевых клеток, который оценивали с использованием 24-часового анализа высвобождения хрома-51. Эти результаты демонстрируют мощную TRI130-индуцированную цитотоксичность при разных соотношениях эффекторных клеток-мишеней с наивными Т-клетками и минимальную вариабельность активности между нормальными донорами.

Пример 14: Исследование фармакокинетики и переносимости однократной дозы у яванских макак

Для определения переносимости, иммуногенности и фармакокинетических характеристик после внутривенного введения TRI130 было проведено исследование фармакокинетики и переносимости однократной дозы. Дизайн исследования продемонстрирован в табл. 11. Для исследования был выбран внутривенный путь введения, так как он предназначен для введения человеку.

Связывание с NHP CD3ε определяли с использованием анти-CD3-связывающего домена в моноспецифическом формате слияния scFv-Fc. Анти-CD3 scFv-Fc тестировали на Т-клетках китайской макаки яванца методом проточной цитометрии. Уровни связывания были переменными, при этом отдельные обезьяны демонстрировали высокие, промежуточные или низкие уровни связывания по сравнению с клетками человека (данные не представлены).

Таблица 11. Экспериментальный дизайн фармакокинетического исследования у яванских макак

№ группы	Кол-во самцов ^a	Тестовый материал	День и Время Дозировки ^b	Уровень дозы (мг/кг)	Концентрация дозы (мг/мл)	Объем дозы (мл/кг)
1	3	Контроль	Сутки 1	0	0	5
2	3	TRI130	Сутки 1	0,25	0,05	5
3	3	TRI130	День 1: 2 часа	0,5	0,1	5
4	3	TRI130	День 1: 24 часа	1,0	0,2	5

^a Животные были выпущены из исследования на 36-е сутки.

^b Дозирование для групп 1 и 2 началось последовательно, без задержки между группами.

Дозирование было отложено на 2 ч после окончания третьего животного в группе 2 и начала первого животного в группе 3; дозирование для группы 4 было отложено на 24 ч от начала дозирования для группы 1.

В исследовании NHP с однократной дозой были оценены следующие параметры и главные измеряемые параметры: клинические признаки, масса тела, потребление пищи, параметры клинической патологии (гематология, коагуляция и клиническая химия), фармакокинетика (ФК), иммуногенность, профили цитокинов и проточная цитометрия.

Тестируемые уровни доз варьировались от ожидаемой максимальной дозы для человека до больших кратностей ожидаемой дозы для человека (табл. 12). Ожидаемая фармакологически активная доза (PAD) для людей находится в диапазоне 0,4 мкг/кг на основе модели ксенотрансплантата *in vivo* (пример 11), что в 625 раз ниже дозы группы 2. Однако, основываясь на анализах активности *in vitro* (активация Т-клеток, пролиферация и высвобождение цитокинов), реакция Т-клеток яванца на TRI130 снижается в 10-100 раз по сравнению с реакцией Т-клеток человека. Следовательно, ожидается, что доза в группе 2 будет в ~ 6,25 до 62,5 раз больше биологического эквивалента PAD человека. Группы 3 и 4 оценивают 2- и 4-кратное превышение последней дозы.

TR130 взаимодействует с CD3 на Т-клетках и с молекулой-мишенью CD123 в популяциях иммунных клеток, включая плазмацитоидные дендритные клетки (pDC -plasmacytoid dendritic cells) и базофилы, которые экспрессируют высокие уровни CD123, но составляют менее 1% циркулирующих лейкоцитов. Опубликованные данные, описывающие другие биспецифики, нацеленные на CD123, отмечают значительное высвобождение цитокинов (Chichili et al. Sci Transl Med. 2015 May 27;7(289):289ra82).

В связи с ожиданием высвобождения цитокинов это исследование проводилось в 2 этапа. В Фазе I двое животных получили TR130 для определения подходящих уровней дозы для Фазы II, которая бы включала группы лечения 2-4. Уровень дозы 0,05 мг/кг (первоначально предполагался как уровень средней дозы для фазы II) был выбран для первого животного, и это животное тщательно контролировалось на наличие признаков синдрома высвобождения цитокинов, включая сбор наблюдений после введения дозы, температуру тела и образцы крови для анализа цитокинов. Доза хорошо переносилась, и через 24 ч второму животному вводили дозу 0,25 мг/кг (первоначально предполагаемой как высокий уровень дозы для фазы II), что также хорошо переносилось.

Уровни дозы для Фазы II были выбраны в попытке получить дифференцированные ответы на TR130 и включали результаты животных Фазы I.

Поскольку дозовые уровни в Фазе I хорошо переносились животными без каких-либо патологических клинических наблюдений, повышенных уровней высвобождения цитокинов или повышенной температуры тела, выбранные дозовые уровни Фазы II составляли 0,25, 0,5 и 1 мг/кг, что в 2500 раз больше ожидаемый человеческого PAD эквивалента (табл. 12). При корректировке этого запаса до 100-кратной разницы в активности, это исследование достигало в 25 раз более высоких доз, чем человеческая PAD.

Таблица 12. Эквиваленты дозы TR130 по сравнению с ожидаемой фармакологически активной дозой (PAD)

№ группы	Тестовый материал	Уровень дозы (мг/кг)	Масса, эквивалентная ожидаемой PAD (~ 0,4 мкг/кг)	Скорректированная эквивалентность дозы на основе ответа яванца
1	Контроль	0	0	0
2	TR130	0,25	625X	6,25X
3	TR130	0,5	1250X	12,5X
4	TR130	1	2500X	25X

Фармакокинетика однократной дозы TR130 у яванских макаков

Концентрации в сыворотке определяли, используя стандартный метод ИФА, используя внеклеточный домен CD123 для захвата TR130 и биотинилированное анти-ID антитело (5H5), распознающее анти-CD3-связывающий домен для обнаружения связанного TR130. Для большинства животных быстрое падение концентрации в сыворотке крови в поздние моменты времени соответствовало наличию антител против лекарств (ADA). Стандартный мостиковый ИФА с использованием TR130 +/- биотина использовали для измерения титров ADA в образцах сыворотки, собранных в поздние временные точки. Титры ADA были относительно низкими для 7 из 9 животных, получавших TR130, и значения титров имели тенденцию к увеличению с течением времени (данные не представлены). Однако титр также, по видимому, снижался с увеличением дозы TR130, и начало ADA было позднее для более высоких доз, а это означает, что более высокие дозы не коррелировали с повышенными уровнями иммуногенности, как это обычно ожидалось. Поскольку TR130 является человеческим белком, обнаружение ADA в поздние моменты времени в образцах сыворотки NHP считается нормальным ответом, а иммуногенность в NHP не является предиктором человеческих ответов.

Не компартментальный анализ (NCA) сывороточных концентраций, обнаруженных в анализе ИФА, рассчитал средний конечный период полураспада для TR130 и его величина составила вплоть до 84 часов у животных, которым вводили дозу 1 мг/кг (табл. 13). Индивидуально одно животное в группе 4 имело явное подкожное накопление TR130, в то время как другое в группе имело значительную раннюю индукцию ADA, что приводило к значительно более короткому периоду полураспада. Редкий отбор проб и равномерное взвешивание были использованы для NCA, а концентрации в сыворотке, на которые явно влияло ADA, были исключены из анализа.

Таблица 13. Оценки параметров ФК NCA для отдельных животных, которым вводили TRI130

NCA с разреженной выборкой		Равномерная оценка		
Параметр	Единицы	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Rs _q скорректирована		0,964	0,992	0,983
HL Lambda z	ч	59,55	66,44	84,46
T _{max}	ч	0,25	0,25	0,25
C _{max}	мкг/мл	4,386	12,124	27,075
C _{max} / D	кг*мкг/мл/мкг	0,018	0,024	0,027
T _{last}	ч	264	264	408
C _{last}	мкг/мл	0,0573	0,317	0,309
AUC _{Call}	ч*мкг/мл	143,7	515,8	1329,7
AUC _{INF}	ч*мкг/мл	148,6	546,2	1367,4
AUC _{INF} / D	ч*кг* мкг/мл/мкг	0,594	1,092	1,367
V _z	мл/кг	144,57	87,75	89,11
Cl	мл/ч/кг	1,683	0,915	0,731
MRT _{last}	ч	49,45	64,30	88,42
MRT _{INF}	ч	59,41	80,75	100,58
V _{ss}	мл/кг	99,96	73,92	73,56

В дополнение к NCA для отдельных животных и групп лечения проводился анализ компартментов с использованием предварительно скомпилированных моделей WinNonlin® 2 компартмента с соответствующими схемами дозирования и взвешивания. Результаты продемонстрированы на фиг. 13 и были аналогичны оценкам параметров NCA, причем период полураспада для одного животного в группе 4 (4003) без значительного ADA или частичного подкожного введения был определен как почти 89 ч. Животное 4002 в группе 4 имело постепенное повышение уровней лекарственного средства в сыворотке с течением времени и T_{max} через 6 ч (табл. 14); следовательно, его данные лучше всего подгонялись с использованием модели 2 сравнения для внесосудистой дозировки вместо внутривенной болюсной дозировки.

Оценки параметров ФК, определенные с помощью NCA или компартментального анализа, не были одинаковыми в группах лечения в том, что период полувыведения увеличивался, а клиренс уменьшался с увеличением доз, вероятно, из-за опосредованного мишенью связывания TRI130.

Таблица 14. Компартментальный анализ для NHP, которому дали однократную ВВ дозу TRI130

Обработка	ID	V1	CL	V2	CLD2	AUC	Альф	Бета	C _{max}	T _{max}
(Доза/Путь)	NHP	(мл/ч)	(мл/ч/кг)	(мл/ч)	(мл/ч/кг)	(ч*мкг/мл)	a HL	HL	(мкг/мл)	x
(ч)		(ч)	(ч)	(ч)	(ч)	(ч)	(ч)	(ч)	(ч)	(ч)
0,25 мг/кг В/В	2001	59,32	2,463	24,36	4,427	101,5	2,568	24,79	4,22	0,25
0,25 мг/кг В/В	2002	50,87	1,864	32,19	1,820	134,1	6,293	36,85	4,91	0,25
0,25 мг/кг В/В	2003	61,16	1,470	43,41	3,341	170,1	4,859	53,46	4,09	0,25
Группа 2, среднее		56,54	1,917	32,7	3,028	130,4	4,32	35,45	4,42	0,25
0,5 мг/кг В/В	3001	41,664	0,874	25,193	1,293	572	7,569	58,99	12,0	0,25
0,5 мг/кг В/В	3002	45,70	1,072	41,35	3,339	467	4,180	60,7	10,94	0,25

В/В		3		4				2		
0,5 мг/кг	3003	38,93	1,058	28,97	2,692	473	3,966	47,9	12,84	0,25
В/В		9		3				8		
Группа 3, среднее		41,87	1,002	32,43	2,540	499	4,608	55,6	11,94	0,25
								5		
1 мг/кг	4101	27,93	0,926	22,08	16,533	1080	0,511	37,8	35,81	0,25
В/В								5		
1 мг/кг	*400	76,83	0,854	16,02	0,133	1172	46,2	112,	11,27	6
В/В	2			4				6		
1 мг/кг	4003	48,22	0,706	25,34	0,492	1417	18,99	88,9	20,74	0,25
В/В							6	2		
Группа 4, среднее		39,31	0,826	45,2	5,22	74,22	4,15	5,6	74,22	2,17

* Получили по крайней мере часть дозы TRI130 3C(подкожно), а оценки параметров были проанализированы с использованием модели SC.

Средние значения групп были проанализированы с использованием предварительно скомпилированной модели № 7 WinNonlin® с разреженной выборкой и соответствующей оценкой

V1: объем для 1-го (центрального) компартмента

CL: Клиренс из центрального или 1-го компартмента

V2: Объем для 2-го компартмента

CLD2: Клиренс из 2-го компартмента

AUC: площадь под кривой времени/концентрации

Альфа HL: период полураспада, связанный с макро константой Альфа

Beta HL: период полураспада, связанный с макро константой Бета

Сmax: максимальная наблюдаемая концентрация

Переносимость однократной дозы TRI130 у яванских макак

Однократное введение TRI130 яванским макакам было клинически хорошо переносимым при дозах до 1 мг/кг включительно. При этих дозах не было клинических наблюдений или изменений массы тела, потребления пищи, клинической химии или параметров коагуляции, связанных с исследуемым продуктом.

Введение TRI130 было связано со снижением количества лимфоцитов в периферической крови (фиг. 14). Связанное с TRI130 временное снижение лимфоцитов наблюдалось через 2 ч после введения дозы во всех дозах. Кроме того, по-видимому, произошло снижение количества базофилов в группах 2 и 3 по гематологическим измерениям (фиг. 15), с немного более длительным временем возврата к базовым уровням по сравнению с контролем с носителем (группа 1). Среднее снижение количества лимфоцитов и базофилов было меньше в группе 4, частично из-за одного животного, которое имело ограниченный ответ, и одного животного, которое имело подкожную, а не внутривенную инъекцию, поэтому группа 4 была исключена из средних данных по лимфоцитам и базофилам, продемонстрированным в фиг. 14 и 15. Во всех группах, которым вводили TRI130, наблюдалось увеличение нейтрофилов по сравнению с контрольной группой с носителем (данные не представлены). Изменения, отмеченные на гематологической панели, в основном возвращались к базовым уровням примерно через 1 неделю после введения дозы.

Введение TRI130 не было связано с изменениями в клинической химии, включая СРБ (С-реактивный белок), или с изменениями параметров коагуляции.

Измерения сывороточных цитокинов показали минимальный всплеск некоторых цитокинов, включая Т-клеточные цитокины ИЛ-10 и ИЛ-2 и вторичные цитокины, такие как MCP-1. Пиковые уровни цитокинов были обнаружены через 2 или 6 ч после введения дозы. В целом использовали набор мультиплексных цитокинов на основе гранул для определения уровней 23 отдельных цитокинов, в том числе Т-специфических цитокинов (таких как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17, ИФН γ , ФНО α) и цитокинов, которые вырабатываются клетками других типов (таких как MCP-1). Примеры цитокинов, обнаруженных в исследовании, представлены в табл. 15. Примечательно, что уровни, обнаруженные при дозе 1 мг/кг, были ниже, чем в группе со средней и низкой дозой, однако у животного 4003 с более нормальными внутривенными болюсными фармакокинетическими параметрами ответы были более похожими на другие группы. Другое животное в группе 4 с очевидной подкожной дозой (4002) имело задержанный пиковый ответ по некоторым цитокинам, что согласуется с более поздним T_{max}. В целом уровни цитокинов возвращаются к базовым уровням через 96 часов после введения дозы. Минимальная секреция цитокинов не приводила к каким-либо наблюдаемым клиническим событиям после введения дозы или изменениям массы тела или потребления пищи (как отмечено выше). Секреция цитокинов согласуется с ме-

ханизмом действия TRI130, который, когда присутствует целевой белок (CD123), может привести к некоторой активации Т- клеток в системе.

Введение TRI130 путем однократной внутривенной (медленной болюсной) инъекции хорошо переносилось у яванских макак на уровнях 0,25, 0,5 и 1 мг/кг. На основании этих результатов уровень ненаблюдаемого неблагоприятного воздействия (NOAEL - no-observed-adverse-effect level) считался равным 1 мг/кг. Оценка периода полувыведения из сыворотки для TRI130 составила 84 ч с нормальным клиренсом и объемом распределения в группе с высокой дозой. Более низкие дозы обладали более быстрым клиренсом и более короткими оценками периода полураспада, что предполагает опосредованное мишенью связывание TRI130 с клетками-мишенями у яванских макак. Эти наблюдения будут подтверждены и распространены на более высокие уровни дозы в 28-дневном GLP исследовании токсикологии с повторными дозами на яванских макаках.

Таблица 15. Измерение сывороточных цитокинов дозовых групп в пилотном исследовании переносимости и ФК

ИЛ-2 (пг/мл)												
Номер животного												
Время (ч)	100 1	100 2	100 3	2001	2002	2003	3001	300 2	3003	4002 **	4003	4101
-2	42,9 9	52,0 8	70,0 2	76,99	60,12	81,64	76,9	41,0 8	97,16	78,73	106,7 8	107,2 8
2*	55,7 6	51,5 5	53,3 2	246,1 8	159,6 4	221,2 9	166,7 1	86,2 9	192,1 9	109,1 3	223,7 5	137,6 8
6	82,8	60,6 8	58,6 7	190,4 8	117,8	178,1 4	115,8 9	74,4 3	136,1 7	107,1 5	157,9 5	164,6 9
24	69,5 5	55,5 9	69,5 5	143,3 5	78,45	119,3 1	88,21	56,5	139,8	137,2 3	103,9 1	120,8
48	50,4 7	58,6 7	62,3 3	91,49	54,72	99,24	74,84	41,0 8	102,3 2	89,56	88,89	120,5 7
96	40,8 3	60,8 4	63,6 4	69,51	62,99	75,07	74,84	36,3 6	101,8 4	83,33	79,99	136,5 6
ИЛ-10 (пг/мл)												
Время	100	100	100	2001	2002	2003	3001	300	3003	4002	4003	4101

047733

мя (ч)	1	2	3					2				
-2	40,2 7	35,8	78,9 8	39,22	16,6	71,08	15,15		28,55	24,47	62,01	78,63
2	46,9 6	31,3 2	44,7 3	630,1 2	174,1 8	576,6 7	115,3 2	26,1 9	216,4	55,71	410,8 4	90,55
6	74,5 9	43,6 2	43,6 2	372,6 2	84,78	179,9 3	74,77	14,3 5	97,4	66,75	100,1 1	157,8 6
24	71,2 8	43,6 2	59,1 5	150,0 6	31,29	100,7 8	48,18		123,8 8	69,12	63,59	60,43
48	38,0 4	34,6 8	56,9 4	49,44	29,02	71,08	21,47		41,12	27,57	83,39	64,38
96	35,8	48,0 7	55,8 3	44,9	26,76	60,82	30,13		48,96	41,58	37,67	85,77
ИЛ-1Ра (пг/мл)												
Вре мя (ч)	100 1	100 2	100 3	2001	2002	2003	3001	300 2	3003	4002	4003	4101
-2	29,8 1	10,2 3	21,7 2	14,83	7,73	27,36	17,29	7,12	21,98	10,52	24,41	26,4
2	39,0 8	14,4 6	20,9 3	91,35	31,08	73,18	38,46	21,7	69,77	22,41	51,87	36,56
6	48,4 2	22,5 1	16,1 1	253,4 7	21,34	102,4 3	36,06	23,0 7	135,5 9	18,67	48,27	59,32
24	33,5 5	10,6 6	18,1 4	101,0 5	13,27	26,61	59,08	7,7	96,11	20,97	21,69	18,1
48	15,2 9	10,6 6	20,1 4	15,99	21,72	21,34	8,56	2,69	21,7	11,99	21,83	20,11
96	11,0 9	15,2 9	13,2 1	13,27	6,1	15,21	11,13	5,08	14,51	9,63	12,14	26,11
ИЛ-6 (пг/мл)												
Вре	100	100	100	2001	2002	2003	3001	300	3003	4002	4003	4101

мя (ч)	1	2	3					2				
-2											1,61	
2	4,46	8,2	28,1 7	40,23	11,18	46,47	7,41		59,97	4,71	29,12	9,24
6	7,29	11,3		9,75		34,34	15,76		6,65	3,31	13,75	58,68
24	26,3 4			0,03		5,95	135,1			0,42		0,88
48												
96												0,3
MCP-1 (пг/мл)												
Вре мя (ч)	100 1	100 2	100 3	2001	2002	2003	3001	300 2	3003	4002	4003	4101
-2	255, 62	294, 77	362, 89	390,5 4	391,0 5	445,7	342,4 9	158, 31	547,6	618,1	769,4 8	807,7 2
2	386, 37	322, 52	281, 46	5860, 97	1690, 25	3737, 21	1429, 67	520, 19	3744, 09	918,3	5948, 11	1144, 13
6	563, 16	393, 99	316, 14	2747, 2	936,3 3	1720, 26	669,2 7	491, 71	1119, 4	1063, 89	1565, 33	1972, 29
24	484, 46	346, 71	378, 37	1188, 25	571,6 7	874,9	508,4 6	288, 4	1126, 98	1287, 69	781,3 8	1043, 59
48	285, 74	398, 27	379, 72	518,2	435,7 1	634,2 9	358,7 3	211, 71	672,0 2	789,5 8	706,9 3	1084, 58
96	254, 56	400, 97	366, 57	404,1 1	416,6 8	433,9 4	380,1	193, 43	599,6 4	666,4	526,8 4	1167, 58

** Животное 4002 имело сывороточную концентрацию TRI130 T_{max} через 6 ч, что указывало на подкожный путь введения и указывало на более медленное накопление TRI130 у животного. Пиковые уровни цитокинов у этого животного были несколько задержаны по сравнению с другими животными.

Пример 15. Терапевтическая эффективность TRI130 в мышинной модели острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) с диссеминированным ксенотрансплантатом

Для изучения терапевтической эффективности TRI130 у мышей с прижившимися диссеминированными опухолями использовали модель острого миелоидного лейкоза человека у грызунов. Клетки MOLM-13, модифицированные для экспрессии люциферазы светлячка, использовали для количественного определения опухоли с помощью биоломинесцентной визуализации. Для исследования 100000 клеток MOLM-13 Luc вводили внутривенно в боковую хвостовую вену 24 мышей-самцов NSG. Клеткам MOLM-13 Luc позволяли прижиться в мышцах 4 дня до того, как начать лечение. Мышей распределяли по 3 группам по 8 мышей в каждой. Одна группа не получала никаких дополнительных обработок в качестве контроля. Оставшиеся две группы получили 7 млн человеческих Т-клеток с первой обработкой. Обработки состояли из контроля с носителем ФСБ или TRI130 в дозе 3 мкг в сутки 4, 8 и 12. Лечение проводилось внутривенно через хвостовую вену. Препараты доставляли в 0,2 мл фосфатно-солевого буфера Дульбекко (ФСБ), не содержащего молекулы (контроль с носителем), или содержащего 3 мкг TRI130. Инъекция содержала 7 миллионов очищенных человеческих Т-клеток для лечения только на 4-й день. Лечение TRI130 привело к быстрому значительному снижению опухолевой нагрузки на скелет (фиг. 16, 17 и табл. 16). Остаточная не скелетная опухолевая нагрузка увеличилась после обработок TRI130. После вскрытия и в конце исследования было определено, что остаточная опухолевая нагрузка была связана с репродуктивным трактом самца и наблюдалась как в группе носителя, так и в группе TRI130 с основным различием между ними в отсутствии опухолевой нагрузки скелета. Лечение прижившихся диссеминированных опухолей MOLM-13 Luc у самцов мышей с TRI130 привело к значительному снижению опухолевой нагрузки, $p < 0,0001$, по сравнению с контролем, содержащим только Т-клетки (табл. 16). Не было существенной разницы между только MOLM-13 Luc и группами с контролем с носителем. Распределение опухолевой нагрузки было изменено обработкой TRI130, т. е. скелетные клетки очистились от биоломинесцентного сигнала.

Таблица 16. Статистическое сравнение среднего объема опухоли в день 14

Анализ ANOVA с повторными измерениями JMP с методом HSD Тьюки (JMP Repeated-Measures ANOVA Analysis with Tukey's HSD Method)	
Обработка	значение p
Носитель против 3 мкг TRI130	<0,0001*
Носитель против только MOLM-13	0,5385
Только MOLM-13 против 3 мкг TRI130	<0,0001*

* указывает на значение $p < 0,05$ - значимую разницу

Пример 16. Конструирование анти-CD123х анти-CD3 MGD006-подобной молекулы.

Чтобы сравнить активность TRI130 с другим биспецифическим форматом, был создан анти-CD123х анти-CD3 биспецик, содержащий последовательности CD123 домена и CD3-связывающего MGD006, взятые из WO 2015/026892 (последовательности нуклеиновых кислот соответствуют SEQ ID NO: 2 и 4; аминокислотные последовательности соответствуют SEQ ID NO: 1 и 3), сконструированные в формате, описанном в Chichili et al. *Sci Transl Med.* 2015 May 27; 7 (289): 289ra82 с добавленной последовательностью Avidin-Flag-HIS для обеспечения очистки. Результирующая MGD006-подобная конструкция называется TRI168.

Пример 17. Активация, цитотоксичность и высвобождение цитокинов Т-клетками человека в ответ на TRI130 и TRI168

Для сравнения активности белков TRI130 и TRI168 *in vitro* Т-клетки выделяли из нормальных донорских мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) и инкубировали с различными концентрациями TRI130 и TRI168 в присутствии CD123+ опухолевых клеток (MOLM-13).

Активацию Т-клеток оценивали через 24 часа культивирования с помощью проточной цитометрии. После центрифугирования и удаления супернатанта клеточные осадки ресуспендировали со смесью следующих меченых красителем антител в объемах по 50 мкл: CD69-FITC, CD5-PE, CD8-Pacific Blue, CD4-APC, CD25-PE-Cy7, и 7AAD и инкубировали в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в объемах по 120 мкл непосредственно перед измерением 50% каждой лунки в проточном цитометре BD LSRII. Файлы образцов были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo для вычисления процента CD4+ (CD8-) или CD8+ Т-клеток, которые имели повышенный уровень CD69 и CD25, путем гейтирования последовательно на прямое и боковое рассеяние, 7AAD-, CD5 +, CD4 + или CD8 + Т-клетки (7AAD-, CD5 + CD4 + или 7AAD- CD5 + CD8 + соответственно). Графики были построены с использованием GraphPad Prism 7.0. TRI130 и TRI168 индуцировали сходную дозозависимую активацию Т-клеток в присутствии клеток-мишеней CD123 + с обоими протестированными донорами (фиг. 18). На фиг. 18 продемонстрирован процент CD4 + и CD8 + Т-клеток, которые были CD69 и CD25-положительными. Значения EC50 определяли с TRI130 и TRI168 для популяций CD4 + и CD8 + CD25 + CD69 +, что демонстрировало сходную активность для обеих молекул. В отсутствие CD123+ клеток-мишеней активация Т-клеток не наблюдалась (не представлено).

Цитотоксичность Molm-13 оценивали через 24 ч культивирования с помощью проточной цитометрии, как описано выше. Файлы образцов анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo для количественной оценки цитотоксичности путем последовательного гейтирования на прямом и боковом рассеянии, 7AAD-, CD5-клеток. Графики были построены с использованием GraphPad Prism 7.0. TRI130 и TRI168 индуцировали сходную дозозависимую цитотоксичность Molm-13 с обоими протестированными донорами (фиг. 19). На фиг. 19 продемонстрировано общее количество жизнеспособных клеток Molm-13 после 24 ч культивирования с очищенными Т-клетками, TRI130 и TRI168.

Уровни выбранной подгруппы цитокинов, обычно продуцируемых активированными Т-клетками, включая ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α и ИЛ-10, измеряли в 24-часовых культуральных супернатантах с использованием мультиплексированных анализов аналитов. TRI168 индуцировал более высокие уровни секреции цитокинов по сравнению с TRI130 у обоих доноров, протестированных в присутствии CD12 3+ клеток-мишеней Molm-13 (фиг. 20).

Редкие нормальные популяции иммунных клеток, включая плазматоцитоподобные дендритные клетки и базофилы, экспрессирующие высокие уровни CD123, присутствуют в образцах МКПК и представляют собой мишени для биспецифических молекул анти-CD123х анти-CD3. Чтобы исследовать уровни секреции цитокинов, индуцированные TRI130 и TRI168 в отсутствие экзогенно добавленных клеток-мишеней, нормальные донорские МКПК культивировали в течение 24 ч с различными концентрациями как белков, так и цитокинов, измеренными в полученных супернатантах с использованием мультиплексированных анализов аналитов. Подобно культурам с очищенными Т-клетками и клетками MOLM-13, TRI168 индуцировал более высокие уровни ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α и ИЛ-10 по сравнению с TRI130 (фиг. 21).

Взятые вместе, эти результаты демонстрируют сравнимую *in vitro* активацию Т-клеток и цитотоксичность экзогенно добавленных CD123+ опухолевых клеток с TRI130 и MGD006-подобным анти-

CD123х анти-CD3 биспецифическими TRI168. Примечательно, что TRI168 индуцирует гораздо более высокие уровни секретируемых цитокинов Т-клеток в культурах как очищенных Т-клеток с опухолевыми клетками Molm-13, так и в образцах нормальных донорских МКПК по сравнению с TRI130. В клинике лекарства, которые вызывают сильную активацию Т-клеток, могут вызывать ряд нежелательных явлений, называемых "синдромом высвобождения цитокинов" (CRS - cytokine release syndrome), из-за чрезмерного высвобождения цитокинов. Высвобожденные цитокины вызывают системную воспалительную реакцию, которая может привести к опасным для жизни осложнениям, которые могут ограничивать прием лекарств.

Пример 18. Индуцированная TRI130 цитотоксичность образцов клеток ОМЛ

Чтобы определить, способен ли TRI130 индуцировать цитотоксичность в первичных клетках ОМЛ, образцы МКПК от субъектов с ОМЛ культивировали в течение нескольких дней с различными концентрациями TRI130. Цитотоксичность клеток ОМЛ оценивали с помощью проточной цитометрии после четырех дней культивирования. После центрифугирования и удаления супернатанта клеточные осадки ресуспендировали в смеси, включающей следующие меченые красителем антитела в объемах по 50 мкл: CD69-FITC, CD5-APC, CD19-Pacific Blue, CD25-PE-Cy7 и 7AAD, и инкубировали в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в объемах по 120 мкл непосредственно перед измерением 50% каждой лунки в проточном цитометре BD LSRII. Файлы образцов были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo для количественной оценки цитотоксичности в компартментах не В, не Т-клеток, путем последовательного гейтирования в прямом и боковом рассеянии, 7AAD-, CD5-, CD 19-, CD25-клеток. Графики были построены с использованием GraphPad Prism 7.0. TRI130 индуцировал дозозависимую потерю образцов не В, не Т клеток образцов ОМЛ у обоих протестированных доноров (фиг. 22). Фигура демонстрирует общее число жизнеспособных не В, не Т клеток после 96 ч культивирования. Аналогичные результаты были получены через 24 и 48 ч (данные не представлены). Эти результаты демонстрируют, что TRI130 способен индуцировать цитотоксичность в культурах первичных образцов МКПК ОМЛ человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полипептид, содержащий CD123-связывающий домен, причем указанный CD123-связывающий домен содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем:

(a) указанная LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

(b) указанная LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8;

(c) указанная LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10;

(d) указанная HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12;

(e) указанная HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; а также

(f) указанная HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

2. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что указанный CD123-связывающий домен содержит:

(i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2; а также

(ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

3. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что указанный CD123-связывающий домен содержит:

(i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; а также

(ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

4. Полипептид по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что CD123-связывающий домен содержит вариабельные домены тяжелых и легких цепей человека.

5. Полипептид по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный CD123-связывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

6. Полипептид по п.5, отличающийся тем, что вариабельная область тяжелой цепи указанного scFv

является аминоконцевой по отношению к вариабельной области легкой цепи указанного scFv.

7. Полипептид по п.5, отличающийся тем, что вариабельная область легкой цепи указанного scFv является аминоконцевой по отношению к вариабельной области тяжелой цепи указанного scFv.

8. Полипептид по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный связывающий домен конъюгирован с лекарственным средством или токсином.

9. Полипептид по любому из пп.1-8, дополнительно содержащий константную область иммуноглобулина.

10. Полипептид по любому из пп.1-3, дополнительно содержащий второй связывающий домен.

11. Полипептид по п.10, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит: (i) CD123-связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокситерминальный линкер и (v) второй связывающий домен.

12. Полипептид по п.11, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит, от amino до карбоксильного конца (i) CD123-связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокситерминальный линкер и (v) второй связывающий домен.

13. Полипептид по п.11, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит от amino до карбоксильного конца, (i) второй связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокситерминальный линкер и (v) CD123-связывающий домен.

14. Полипептид по любому из пп.10-13, отличающийся тем, что:

(i) CD123-связывающий домен содержит: (a) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (b) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3; а также

(ii) второй связывающий домен содержит: (a) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (b) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

15. Полипептид по любому из пп.11-14, отличающийся тем, что карбокситерминальный линкер содержит или состоит из SEQ ID NO: 288.

16. Полипептид по любому из пп.11-15, отличающийся тем, что константная область иммуноглобулина содержит CH2 и CH3-домены иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgD.

17. Полипептид по п.16, в котором константная область иммуноглобулина содержит CH2-домен человеческого IgG1, содержащий замены L234A, L235A, G237A и K322A в соответствии с системой нумерации EU.

18. Полипептид по любому из пп.11-17, отличающийся тем, что полипептид не проявляет или проявляет минимальную активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или активность комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

19. Полипептид по любому из пп.10-13, отличающийся тем, что второй связывающий домен специфически связывает Т-клетку, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного комплекса.

20. Полипептид по любому из пп.10-19, отличающийся тем, что второй связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина;

причем вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая:

(a) по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 157 или же

(b) по меньшей мере на 94% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 158 и

при этом вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 159.

21. Полипептид по п.20, отличающийся тем, что второй связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина; причем вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 157 или SEQ ID NO: 158 и

при этом вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 159.

22. Полипептид по любому из пп.10-19, отличающийся тем, что второй связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина;

ноглобулина;

причем вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 160; и

причем вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 82% идентична, по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере на 87% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 92% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 161.

23. Полипептид по п.22, отличающийся тем, что второй связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина; причем вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160; а также

причем вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 161.

24. Полипептид по любому из пп.20-23, отличающийся тем, что указанный второй связывающий домен содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164, соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 и SEQ ID NO: 167 соответственно.

25. Полипептид по пп.10-19, отличающийся тем, что указанный второй связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, полученную из моноклонального антитела, выбранного из CRIS-7, HuM291 и I2C.

26. Полипептид по п.25, отличающийся тем, что второй связывающий домен получен из CRIS-7 и содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем:

(a) указанные LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют последовательности, указанные в SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169 и SEQ ID NO: 170 соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 173 соответственно; или же

(b) указанные LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164 соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 и SEQ ID NO: 167 соответственно.

27. Полипептид по п.25, отличающийся тем, что второй связывающий домен происходит из I2C и содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем:

(a) указанные LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 307, 308 и 309 соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 174, 175 и 176 соответственно; или же

(b) указанные LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 179, 180 и 181 соответственно.

28. Полипептид по п.26, отличающийся тем, что второй связывающий домен получен из HuM291 и содержит: (i) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и (ii) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем:

(a) указанные LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 182, 183 и 184, соответственно, и указанные HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 185, 186 и 187 соответственно; или же

(b) указанные LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 188, 189 и 190, соответственно, и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 191, 192 и 193 соответственно.

29. Полипептид, содержащий CD123-связывающий домен и CD3-связывающий домен, причем:

(i) указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 или

(ii) указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132.

30. Полипептид по любому из пп.10-29, отличающийся тем, что индуцирует перенаправленную цитотоксичность Т-клеток (RTCC - redirected T-cell cytotoxicity).

31. Полипептид по любому из пп.10-30, отличающийся тем, что индуцирует RTCC с EC₅₀ 30 пМ или ниже.

32. Полипептид по любому из пп.10-31, отличающийся тем, что указанный полипептид, связывающий CD123, индуцирует активацию Т-клеток или пролиферацию Т-клеток.

33. Полипептид по любому из пп.10-32, отличающийся тем, что указанный полипептид индуцирует Т-клеточно-зависимый лизис клеток, экспрессирующих CD123.

34. Полипептид по любому из пп.10-33, отличающийся тем, что указанный полипептид, когда он связан с белком CD3 на Т-клетке, индуцирует пониженное высвобождение цитокинов из указанной Т-клетки по сравнению с контролем с антителом ОКТ3.

35. Полипептид по любому из пп.10-19 и 25, отличающийся тем, что второй связывающий домен конкурирует за связывание с CD3ε с моноклональным антителом, выбранным из CRIS-7, HuM291 и I2C.

36. Полипептид по любому из пп.10-35, отличающийся тем, что указанный второй связывающий домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv).

37. Полипептид по любому из пп.10-36, отличающийся тем, что указанный второй связывающий домен представляет собой гуманизированный или человеческий связывающий домен.

38. Полипептид, содержащий в порядке от аминоконца до карбоксильного конца: (i) CD123-связывающий домен, (ii) шарнирную область, (iii) константную область иммуноглобулина, (iv) карбокситерминальный линкер и (v) второй связывающий домен, причем указанный CD123-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4.

39. Полипептид по любому из пп.1-38, отличающийся тем, что указанный CD123-связывающий домен представляет собой scFv, содержащий варибельную область легкой цепи иммуноглобулина и варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина; и причем указанная варибельная область легкой цепи и указанная варибельная область тяжелой цепи соединены аминокислотной последовательностью, содержащей (Gly₄Ser)_n, причем n=1-5 (SEQ ID NO: 214).

40. Полипептид по любому из пп.10-39, отличающийся тем, что второй связывающий домен представляет собой scFv, содержащий варибельную область легкой цепи иммуноглобулина и варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина; и причем указанная варибельная область легкой цепи и указанная варибельная область тяжелой цепи соединены аминокислотной последовательностью, содержащей (Gly₄Ser)_n, причем n=1-5 (SEQ ID NO:214).

41. Полипептид по любому из пп.11-40, отличающийся тем, что карбокситерминальный линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую (Gly₄Ser)_n, причем n=1-7 (SEQ ID NO: 314).

42. Полипептид по п.41, отличающийся тем, что n=3-5.

43. Полипептид по любому из пп.1-42, отличающийся тем, что указанный CD123-связывающий домен не происходит от мышинового антитела 12F1.

44. Димер, содержащий два идентичных полипептида по любому из пп.11-43.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-43 или димер по п.44 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

46. Фармацевтическая композиция по п.45, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция демонстрирует более длительное время полужизни при введении субъекту, чем полипептид анти-CD123 scFv × анти-CD3 scFv, содержащий идентичные scFv.

47. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-43.

48. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.47, в которой указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 129 или SEQ ID NO: 131.

49. Вектор экспрессии, содержащий сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид по любому из пп.1-43, причем указанный сегмент нуклеиновой кислоты функционально связан с регуляторными последовательностями, подходящими для экспрессии указанного сегмента нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине.

50. Вектор экспрессии по п.49, в котором указанный сегмент нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 129 или SEQ ID NO: 131.

51. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.49 или 50.

52. Способ получения полипептида, связывающего CD123, включающий культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии по п.49 или 50, в условиях, в которых экспрессируется указанный сегмент нуклеиновой кислоты, в результате чего продуцируется полипептид, связывающий CD123.

53. Способ по п.52, в котором рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой линию клеток-хозяев CHO, HEK293 или COS.

54. Способ по п.52 или 53, дополнительно включающий выделение полипептида, связывающего CD123.

55. Способ индукции перенаправленной цитотоксичности Т-клеток (RTCC) в отношении клетки, экспрессирующей CD123, причем способ включает контактирование указанной клетки, экспрессирующей CD123, с полипептидом по любому из пп.11-43, при этом указанный второй домен связывания специфически связывает Т-клетку, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного комплекса и причем указанное контактирование происходит в условиях, при которых индуцируется RTCC против CD123-экспрессирующей клетки.

56. Способ индуцирования Т-клеточно-зависимого лизиса клетки, экспрессирующей CD123, включающий контактирование указанной клетки, экспрессирующей CD123, с полипептидом по любому из пп.11-43, причем указанный второй связывающий домен специфически связывает Т-клетку, CD3, CD3ε или Т-клеточный рецепторный (ТКР) комплекс или компонент Т-клеточного рецепторного комплекса; и причем указанное контактирование происходит в условиях, при которых индуцируется Т-клеточно-зависимый лизис клетки, экспрессирующей CD123.

57. Способ лечения расстройства у субъекта, причем указанное расстройство характеризуется сверхэкспрессией CD123, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества полипептида по любому из пп.1-43 или димера по п.44.

58. Способ по п.57, в котором расстройство представляет собой рак.

59. Способ по п.58, в котором рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), В-лимфолейкоз, новообразования из бластных плазматоидных дендритных клеток (ОБПДК), волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, рефрактерную анемию с избытком бластов, миелодиспластический синдром, хронический миелоидный лейкоз или лимфому Ходжкина.

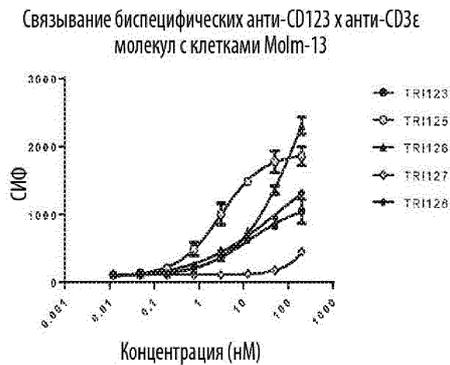
60. Применение полипептида по любому из пп.1-43 или димера по п.44 для получения лекарственного средства для лечения расстройства у субъекта, причем указанное расстройство характеризуется сверхэкспрессией CD123.

61. Применение полипептида по любому из пп.1-43 или димера по п.44 для лечения расстройства у субъекта, причем указанное расстройство характеризуется сверхэкспрессией CD123.

62. Применение по п.60 или 61, где заболевание представляет собой рак.

63. Применение по п.62, где указанный рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), В-лимфолейкоз, новообразования из бластных плазматоидных дендритных клеток (ОБПДК), волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, рефрактерную анемию с избытком бластов, миелодиспластический синдром, хронический миелоидный лейкоз или лимфому Ходжкина.

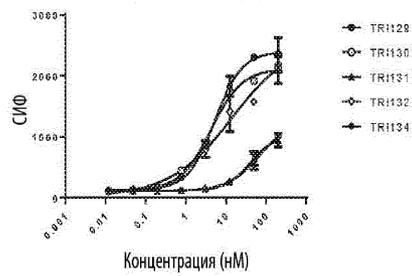
64. Полипептид по любому из пп.1-43, отличающийся тем, что указанный полипептид связывается с CD123 примата, отличного от человека.



	TR1125
EC50 (нМ)	3.14

Фиг. 1А

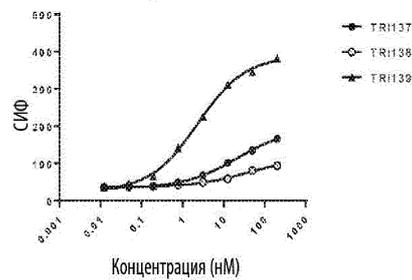
Связывание биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул с клетками Molm-13



	TR1128	TR1130
EC50 (нМ)	5.33	4.31

Фиг. 1В

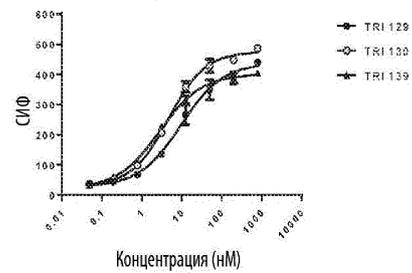
Связывание биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул с клетками Molm-13



	TR1139
EC50 (нМ)	2.33

Фиг. 1С

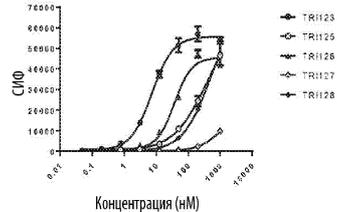
Связывание биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул с клетками Molm-13



	TR1129	TR1130	TR1139
EC50 (нМ)	9.69	4.65	2.81

Фиг. 1D

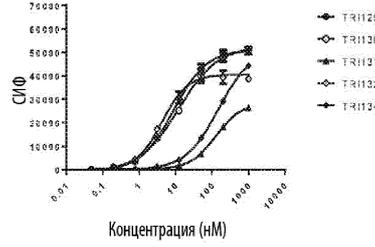
Связывание биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул с клетками СНО, экспрессирующими CD123 яванца



	TR1123	TR1126
EC50 (нМ)	7.38	37.18

Фиг. 2А

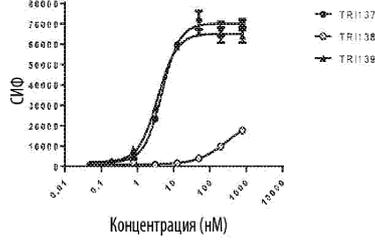
Связывание биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул с клетками CHO, экспрессирующими CD123 яванца



	TR1129	TR1130	TR1132
EC50 (нМ)	8.77	12.12	4.23

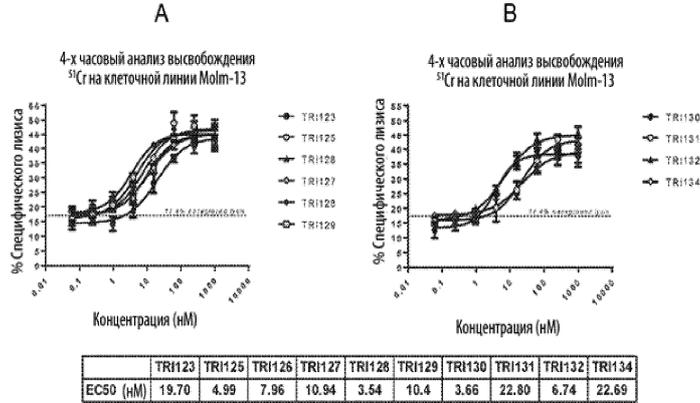
Фиг. 2В

Связывание биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул с клетками CHO, экспрессирующими CD123 яванца



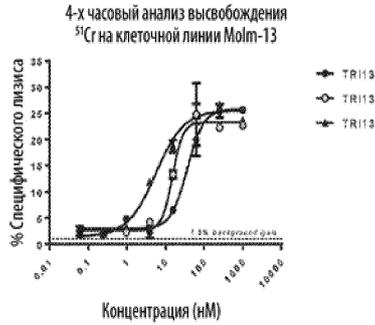
	TR1137	TR1139
EC50 (нМ)	4.79	3.64

Фиг. 2С



	TR1123	TR1125	TR1126	TR1127	TR1128	TR1129	TR1130	TR1131	TR1132	TR1134
EC50 (нМ)	19.70	4.99	7.96	10.94	3.54	10.4	3.66	22.80	6.74	22.69

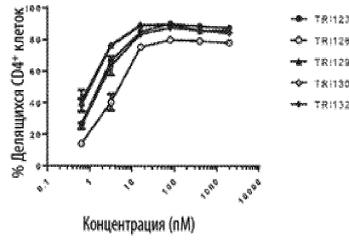
Фиг. 3А-В



	TR1137	TR1138	TR1139
EC50 (нМ)	36.39	16.17	7.96

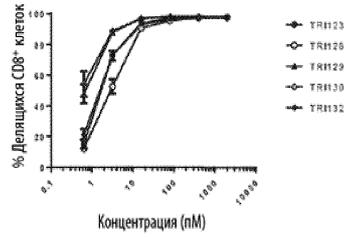
Фиг. 3С

Пролиферация CD4⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 x анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней



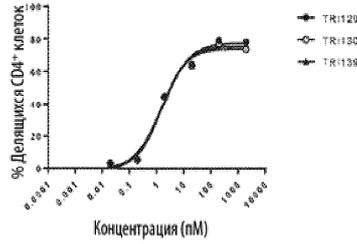
Фиг. 4А

Пролиферация CD8⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 x анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней



Фиг. 4В

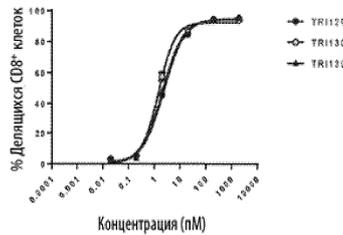
Пролиферация CD4⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 x анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней



CD4	TR1129	TR1130	TR1139
EC50 (нМ)	1.66	1.53	1.54

Фиг. 4С

Пролиферация CD8⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 x анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней



CD8	TR1129	TR1130	TR1139
EC50 (нМ)	2.29	1.46	2.96

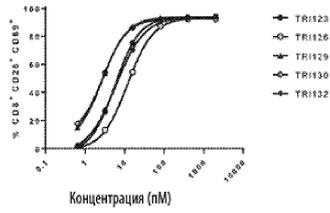
Фиг. 4D

Активация CD4⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней



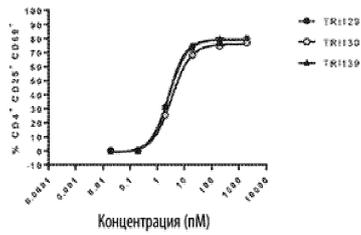
Фиг. 5А

Активация CD8⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней



Фиг. 5В

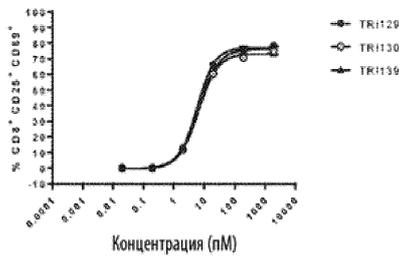
Активация CD4⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней



CD4	TR1129	TR1130	TR1139
EC50 (nM)	2.63	3.40	2.71

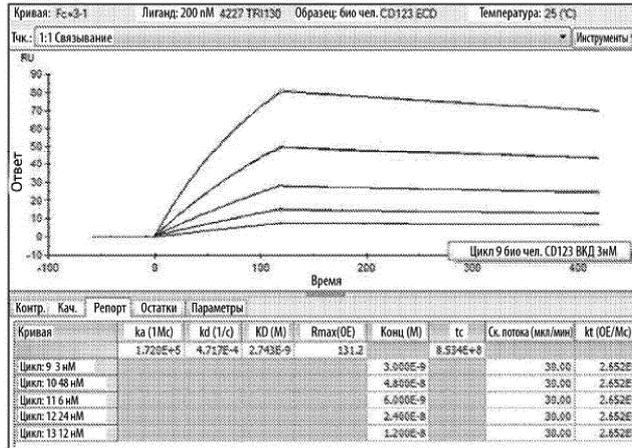
Фиг. 5С

Активация CD8⁺ Т клеток в присутствии биспецифических анти-CD123 х анти-CD3ε молекул и Mo1m-13 клеток-мишеней

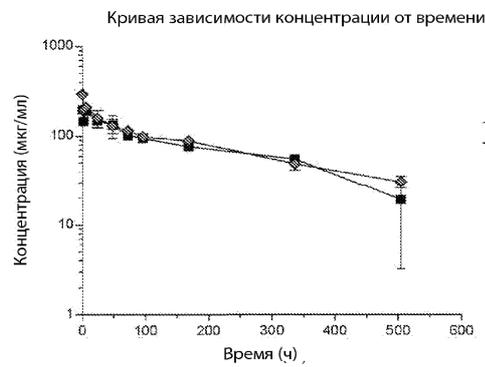


CD8	TR1129	TR1130	TR1139
EC50 (nM)	5.79	6.50	6.36

Фиг. 5D

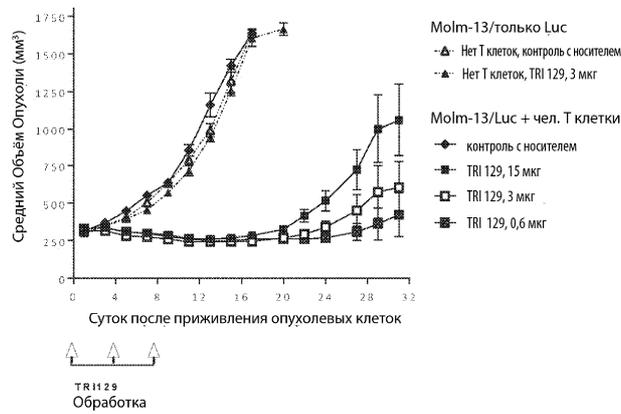


Фиг. 6



Фиг. 7

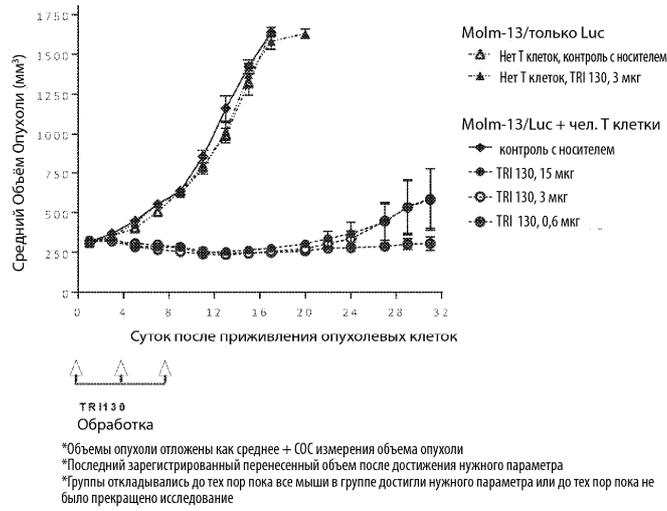
Рост MOLM-13/Luc клеток в NOD/SCID мышах



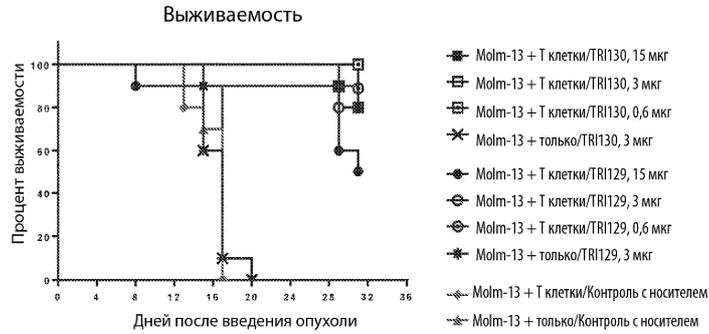
*Объемы опухоли отложены как среднее + СОС измерения объема опухоли
 *Последний зарегистрированный перенесенный объем после достижения нужного параметра
 *Группы откладывались до тех пор пока все мыши в группе достигли нужного параметра или до тех пор пока не было прекращено исследование

Фиг. 8

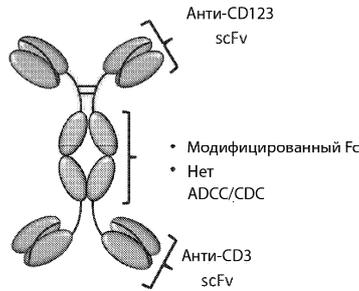
Рост MOLM-13/Luc клеток в NOD/SCID мышах



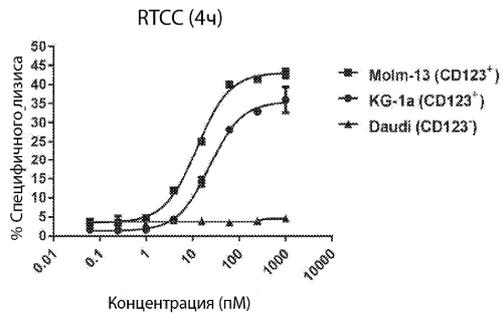
Фиг. 9



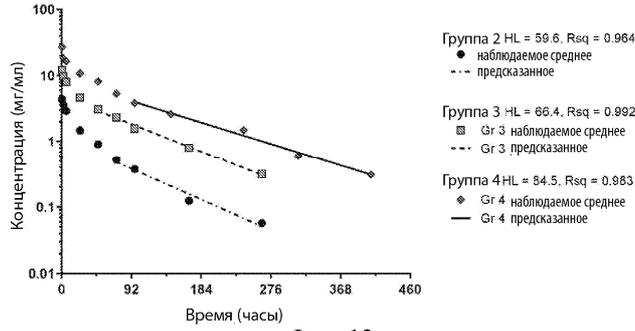
Фиг. 10



Фиг. 11

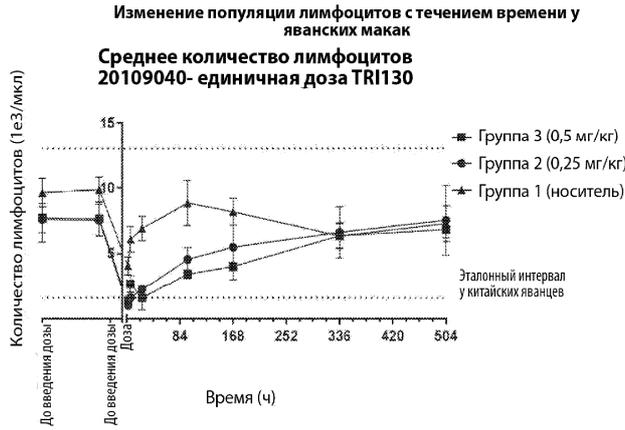


Фиг. 12

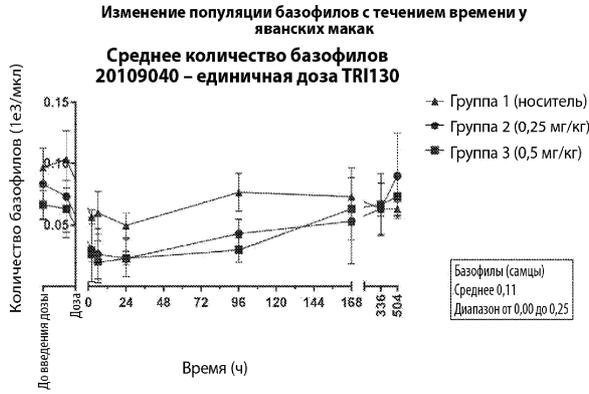


Фиг. 13

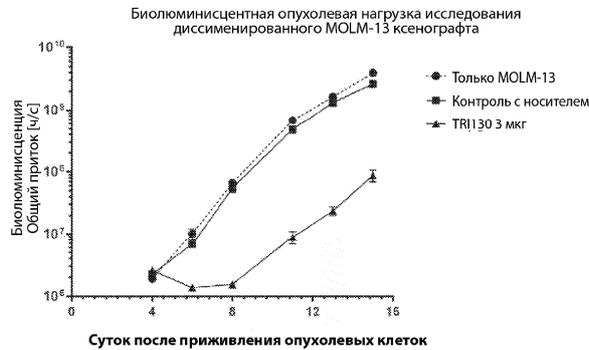
Оценка NCA WinNonlin и подгонка времени полужизни для групп обработки



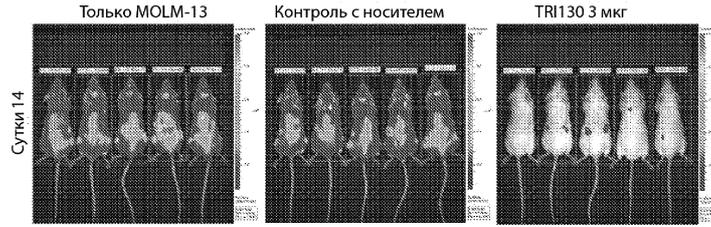
Фиг. 14



Фиг. 15

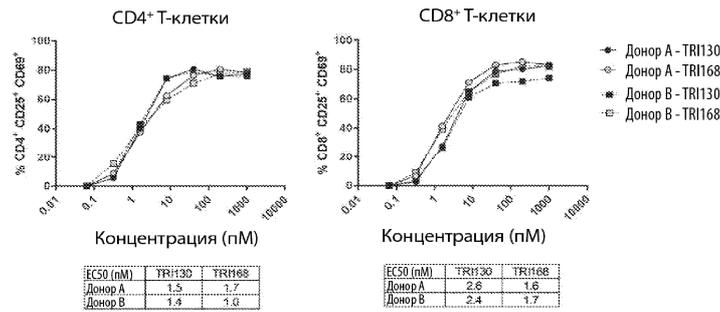


Фиг. 16



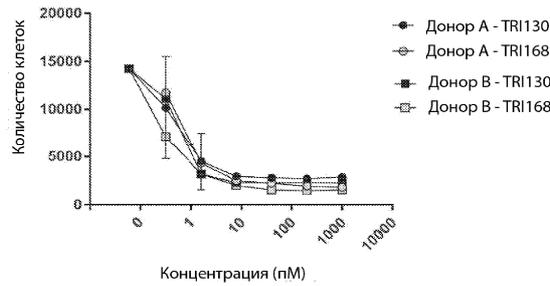
Фиг. 17

Биолюминесцентное изображение опухолевой нагрузки на Сутки 14



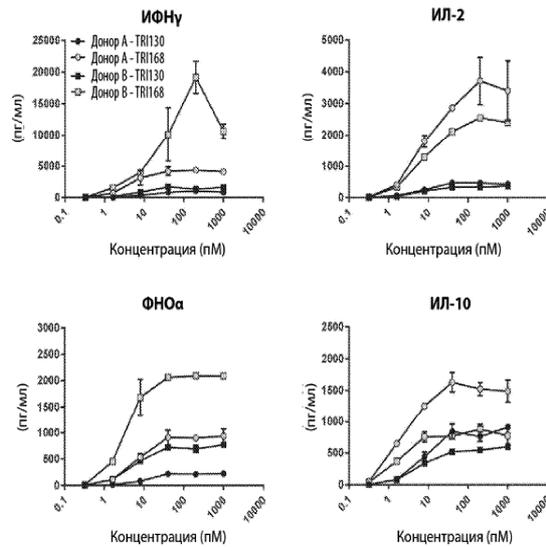
Фиг. 18

TRI130 и TRI168 индуцированная активация Т клеток с Molm-13 клетками-мишенями

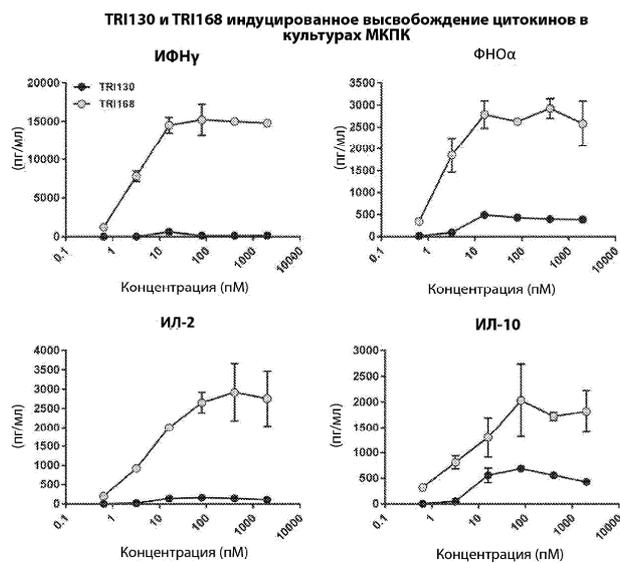


Фиг. 19

TRI130 и TRI168 индуцированная Т-клеточная цитотоксичность клеток мишеней CD123⁺13



Фиг. 20 TRI130 и TRI168 индуцированное высвобождение цитокинов Т-клетками с клетками-мишенями Molm-13



Фиг. 21



Фиг. 22

Цитотоксичность TRI130 инкубированного с образцами клеток ОМЛ

