



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

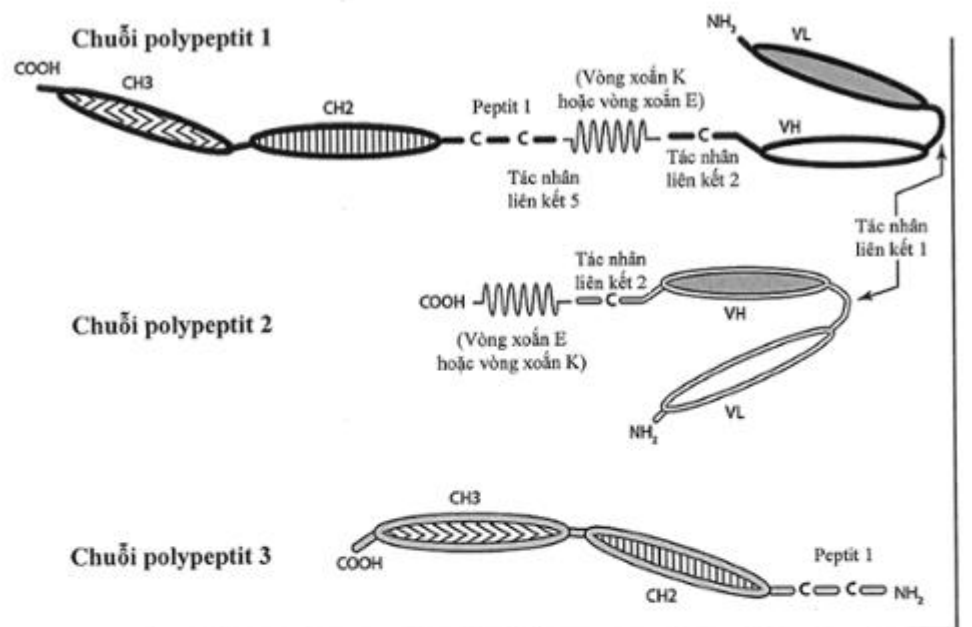


1-0032272

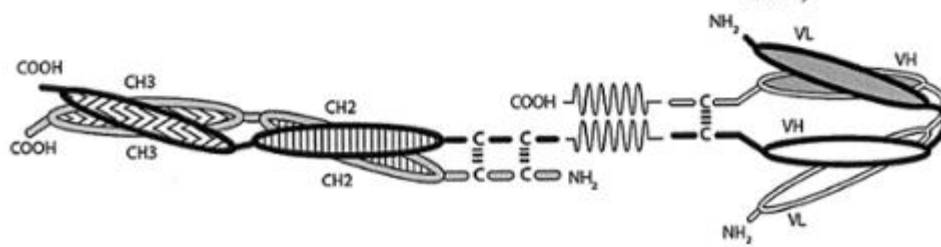
(51)⁷ A61K 39/395; C07K 17/14; C07K 16/28 (13) B

-
- (21) 1-2016-00527 (22) 20/08/2014
(86) PCT/US2014/051790 20/08/2014 (87) WO 2015/026892 26/02/2015
(30) 61/869,510 23/08/2013 US; 61/907,749 22/11/2013 US; 13198784 20/12/2013 EP;
61/990,475 08/05/2014 US
(45) 25/06/2022 411 (43) 26/09/2016 342A
(73) MACROGENICS, INC. (US)
9640 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America
(72) BONVINI, Ezio (US); JOHNSON, Leslie, S. (US); HUANG, Ling (US); MOORE,
Paul, A. (GB); CHICHILI, Gurunadh, Reddy (IN); ALDERSON, Ralph, Froman
(US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) KHÁNG THỂ ĐÔI ĐƠN TRỊ ĐẶC HIỆU KÉP CÓ KHẢ NĂNG LIÊN KẾT VỚI
CD123 VÀ CD3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm
tối ưu trình tự có khả năng liên kết đồng thời với CD123 và CD3 dùng để điều trị các bệnh
ác tính liên quan đến máu.



Kháng thể đôi Fc được lắp ghép (phiên bản 1)



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 có khả năng liên kết đồng thời với CD123 và CD3 và được phẩm chứa các phân tử này để điều trị các bệnh ác tính liên quan đến máu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

1. CD123

CD123 (thụ thể intolokin 3 alpha, IL-3Ra) là phân tử kích cỡ 40 kDa và là một phần của phức hợp thụ thể intolokin 3 (“Human Interleukin-3 (IL-3) Induces Disulfide-Linked IL-3 Receptor Alpha- and Beta-Chain Heterodimerization, Which Is Required For Receptor Activation But Not High-Affinity Binding”, Mol. Cell. Biol. 16(6):3035-3046, (1996) của Stomski, F.C. et al.). Intolokin 3 (IL-3) điều khiển quá trình biệt hoá sớm các tế bào gốc đa năng thành các tế bào nguồn dòng hồng cầu, tuỷ bào và lympho bào. CD123 được biểu hiện trên các tế bào nguồn biệt hoá CD34+ (“Hematopoietic Stem Cells Express Multiple Myeloid Markers: Implications For The Origin and Targeted Therapy Of Acute Myeloid Leukemia”, Blood 106:4086-4092, (2005) của Taussig, D.C. et al.), nhưng không được biểu hiện bởi các tế bào gốc tạo máu bình thường CD34+/CD38-. CD123 được biểu hiện bởi các bạch cầu ưa kiềm, các tế bào mast, các tế bào tua tương bào huyết, biểu hiện ở mức nhất định bởi các bạch cầu đơn nhân to, các đại thực bào và các bạch cầu ưa eosin, và biểu hiện ở mức thấp hoặc không biểu hiện bởi các bạch cầu trung tính và các tế bào nhân khổng lồ. Một số mô không tạo máu (nhau thai, tế bào Leydig của tinh hoàn, một số yếu tố tế bào não nhất định và một vài tế bào nội mạc) có biểu hiện CD123; tuy nhiên chủ yếu biểu hiện ở bào tương.

CD123 được báo cáo là được biểu hiện bởi tế bào non ác tính bệnh bạch cầu và tế bào gốc bệnh bạch cầu (LSC) (“The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous leukemia stem cells”, Leukemia 14:1777-1784, (2000) của Jordan, C.T. et al.; “Regulation Of Th17 Cell

Differentiation and EAE Induction By MAP3K NIK”, Blood 113:6603-6610, (2009) của Jin, W. et al.) (Fig.1). Trong quần thể tiền chất bình thường ở người, CD123 được biểu hiện bởi một phân nhóm các tế bào nguồn tạo máu (HPC), nhưng không được biểu hiện bởi các tế bào gốc tạo máu (HSC) bình thường. CD123 cũng được biểu hiện bởi các tế bào tua tương bào huyết (pDC) và các bạch cầu ưa kiềm, và, ở mức độ ít hơn, các bạch cầu đơn nhân to và các bạch cầu ưa eosin (“Reciprocal Inhibition Of Binding Between Interleukin 3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor To Human Eosinophils”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:7022-7026, (1989) của Lopez, A.F. et al.; “Monoclonal Antibody 7G3 Recognizes The N-Terminal Domain Of The Human Interleukin-3 (IL-3) Receptor Alpha Chain and Functions As A Specific IL-3 Receptor Antagonist”, Blood 87:83-92, (1996) của Sun, Q. et al.; “Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies”, Haematologica 86(12):1261-1269, (2001) của Muñoz, L. et al.; “Characterization Of Myeloid And Plasmacytoid Dendritic Cells In Human Lung”, J. Immunol. 177:7784-7793 của Masten, B.J. et al. (2006); “Interferon-Gamma Upregulates Interleukin-3 (IL-3) Receptor Expression In Human Endothelial Cells and Synergizes With IL-3 In Stimulating Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Cytokine Production”, Blood 86:176-182, của Korpelainen, E.I. et al. (1995)).

CD123 đã được báo cáo là biểu hiện quá mức trong các tế bào ác tính ở nhiều loại bệnh ác tính liên quan đến máu bao gồm bệnh bạch cầu tuỷ bào cấp tính (AML) và hội chứng loạn sản tuỷ (MDS) (“Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies”, Haematologica 86(12):1261-1269, (2001) của Muñoz, L. et al.). CD123 biểu hiện quá mức có liên quan đến sự tiên lượng xấu đối với bệnh AML (“Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor”, Br. J. Haematol. 161:389-401, (2013) của Tettamanti, M.S. et al.).

Bệnh AML và bệnh MDS được cho là phát sinh và bắt diệt trong một quần thể nhỏ các tế bào gốc bệnh bạch cầu (LSC), các tế bào này thường không hoạt động (có nghĩa là, không phải là các tế bào phân chia nhanh) và do đó chống lại hiện tượng chết tế bào (chết theo chương trình) và các chất hoá trị thông thường. Các LSC đặc trưng ở chỗ biểu hiện CD123 ở mức cao, sự biểu hiện này không có ở quần thể tế bào gốc tạo

máu bình thường tương ứng trong tuỷ xương của người bình thường (“Regulation Of Th17 Cell Differentiation and EAE Induction By MAP3K NIK”, Blood 113:6603-6610 (2009) của Jin, W. et al.; “The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells”, Leukemia 14:1777-1784 (2000) của Jordan, C.T. et al.). CD123 được biểu hiện ở mức 45%-95% đối với bệnh AML, 85% đối với bệnh bạch cầu tế bào nhung mao (HCL), và 40% đối với bệnh bạch cầu nguyên bào lympho B cấp tính (B-ALL). Sự biểu hiện CD123 cũng có liên quan đến nhiều loại bệnh ác tính/tiền ác tính khác: các tế bào nguồn bệnh bạch cầu tuỷ bào mạn tính (CML) (bao gồm con tế bào non ác tính CML); các tế bào Reed Sternberg (RS) Hodgkin; u bạch huyết không phải dạng Hodgkin (NHL) đã biến nạp; một vài bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL) (CD11c+); nhóm nhỏ bệnh bạch cầu nguyên bào lympho T cấp tính (T-ALL) (16%, phần lớn chưa trưởng thành, chủ yếu ở người trưởng thành), u ác tính tế bào tua tương bào huyết (pDC) (DC2) và u ác tính tế bào tuỷ hội chứng loạn sản tuỷ-CD34+/CD38 (MDS).

Bệnh AML là một bệnh tách dòng đặc trưng bởi sự tăng sinh và tích tụ của các tế bào nguồn dòng tuỷ đã biến nạp trong tuỷ xương, mà cuối cùng sẽ dẫn đến suy tạo máu. Tỷ lệ mắc AML tăng lên theo tuổi tác, và bệnh nhân lớn tuổi thường có kết quả điều trị kém hơn so với những bệnh nhân trẻ tuổi (“Current and Emerging Therapies For Acute Myeloid Leukemia”, Clin. Ther. 2:2349-2370, (2009) của Robak, T. et al.). Không may là hiện nay đa số người trưởng thành mắc AML đều chết vì bệnh này.

Việc điều trị bệnh AML ban đầu tập trung vào việc gây cảm ứng thuyên giảm (liệu pháp cảm ứng). Khi bệnh đã có sự thuyên giảm thì việc điều trị chuyển sang tập trung vào đảm bảo duy trì sự thuyên giảm đó (liệu pháp sau thuyên giảm hoặc liệu pháp củng cố) và, trong một số trường hợp là liệu pháp duy trì. Phác đồ gây cảm ứng thuyên giảm tiêu chuẩn cho bệnh AML là hoá trị dùng tổ hợp anthracyclin/xytarabin, tiếp đó là hoá trị củng cố (thường vẫn dùng những thuốc cũ nhưng với liều cao hơn so với khi sử dụng trong giai đoạn gây cảm ứng) hoặc ghép tế bào gốc của người, tùy thuộc vào khả năng dung nạp điều trị liều cao của bệnh nhân và khả năng chữa khỏi chỉ bằng cách hoá trị (xem tài liệu, ví dụ, “Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia”, Curr. Opin. Oncol. 24:711-719, (2012) của Roboz, G.J.).

Các chất thường được sử dụng trong liệu pháp cảm ứng bao gồm xytarabin và các anthracyclin. Xytarabin, còn được gọi là AraC, tiêu diệt các tế bào ung thư (và các

tế bào bình thường phân chia nhanh khác) bằng cách can thiệp vào quá trình tổng hợp ADN. Tác dụng phụ kèm theo liệu pháp điều trị bằng AraC bao gồm giảm đề kháng với bệnh lây nhiễm, do giảm sản sinh tế bào bạch cầu; chảy máu, do giảm sản sinh tiểu cầu; và thiếu máu, do sự giảm tiềm ẩn các tế bào hồng cầu. Các tác dụng phụ khác bao gồm buồn nôn và nôn. Các anthracyclin (ví dụ, daunorubicin, doxorubicin, và idarubicin) có một vài cơ chế tác động, bao gồm ức chế tổng hợp ADN và ARN, phá vỡ cấu trúc bậc cao của ADN, và sản sinh các gốc oxy tự do phá huỷ tế bào. Tác động có hại gây hậu quả nghiêm trọng nhất của các anthracyclin là độc hại cho tim, điều này làm hạn chế một cách đáng kể liều dùng suốt đời được sử dụng và tính hữu ích của chúng đến một mức độ nhất định.

Do đó, không may là mặc dù đã có tiến bộ đáng kể trong điều trị bệnh AML mới chẩn đoán, nhưng vẫn có từ 20% đến 40% bệnh nhân không thuyên giảm với liệu pháp hoá trị cảm ứng tiêu chuẩn, và từ 50% đến 70% bệnh nhân đã thuyên giảm hoàn toàn lần đầu được dự đoán là sẽ tái phát trong vòng 3 năm. Cách điều trị tối ưu khi bị tái phát, hoặc cho các bệnh nhân mắc bệnh kháng thuốc, hiện vẫn chưa rõ. Ghép tế bào gốc đã được xác định là hình thức hiệu quả nhất của liệu pháp kháng bệnh bạch cầu cho các bệnh nhân mắc AML thuyên giảm lần đầu hoặc lần sau đó (“Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia”, Curr. Opin. Oncol. 24:711-719, (2012) của Roboz, G.J.).

2. CD3

CD3 là một đồng thụ thể tế bào T gồm có 4 chuỗi riêng biệt (“Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation Of Signaling”, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; trang 1-14, (2010) của Wucherpfennig, K.W. et al.). Ở các động vật có vú, phức hợp này chứa chuỗi CD3 γ , chuỗi CD3 δ , và hai chuỗi CD3 ϵ . Các chuỗi này kết hợp với một phân tử gọi là thụ thể tế bào T (TCR) để tạo ra tín hiệu hoạt hoá ở các lympho bào T. Khi không có CD3, các TCR không lắp ghép đúng và bị phân huỷ (“Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer”, Immunology 129(2):170–177, (2010) của Thomas, S. et al.). CD3 được xác định là liên kết với màng của tất cả các tế bào T trưởng thành, và hầu như không liên kết với loại tế bào nào khác (trong tài liệu: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE”, 6th ed. Garland Science Publishing, NY, (2005) trang 214-

216, của Janeway, C.A. et al.; “Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling and Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer”, *Cell* 105(7):913-923, (2001) của Sun, Z. J. et al.; “Deconstructing The Form and Function Of The TCR/CD3 Complex”, *Immunity*. 2006 Feb; 24(2):133-139, (2006) của Kuhns, M.S. et al.).

3. Các kháng thể đôi đặc hiệu kép

Khả năng của kháng thể nguyên vẹn không được cải biến (ví dụ, IgG) trong việc liên kết epitop của kháng nguyên tùy thuộc vào sự có mặt của các miền biến đổi trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch (tức là, lần lượt là miền VL và miền VH). Thiết kế của kháng thể đôi là dựa vào cấu trúc Fv đơn chuỗi (scFv) (xem tài liệu, ví dụ, “Diabodies”: Small Bivalent and Bispecific Antibody Fragments”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448, (1993) của Holliger et al.; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94, (1999) của Alt et al.; “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity”, *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672, (2005) của Lu, D. et al.; WO 02/02781 (Mertens et al.); “Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabodies Allows Site-Specific Conjugation and Radiolabeling For Tumor Targeting Applications”, *Protein Eng. Des. Sel.* 17(1):21-27, (2004) của Olafsen, T. et al.; “Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange”, *Protein Engineering* 14(2):1025-1033, (2001) của Wu, A. et al.; “A Diabody For Cancer Immunotherapy and Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain”, Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992, (2004) của Asano et al.; “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System”, *Protein Eng.* 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. et al.; “Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy”, *Cancer Res.* 69(12):4941-4944, (2009) của Baeuerle, P.A. et al..

Tương tác giữa chuỗi nhẹ kháng thể và chuỗi nặng kháng thể và, cụ thể là, tương tác giữa miền VL và miền VH của nó tạo thành một trong các vị trí liên kết epitop của kháng thể đó. Trái lại, cấu trúc scFv bao gồm miền VL và miền VH của kháng thể có trong một chuỗi polypeptit đơn lẻ, trong đó các miền này được phân cách

bởi tác nhân liên kết linh hoạt có đủ độ dài để cho phép hai miền này tự lắp ghép thành một vị trí liên kết epitop chức năng. Trong trường hợp miền VL và miền VH này không thể tự lắp ghép do tác nhân liên kết không đủ dài (dưới khoảng 12 gốc axit amin), thì hai cấu trúc scFv này tương tác với nhau để tạo thành phân tử hoá trị hai trong đó VL của một chuỗi kết hợp với VH của chuỗi còn lại (xem tài liệu “Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies”, *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658, (2005) của Marvin et al.).

Các kháng thể tự nhiên chỉ có khả năng liên kết với một loại epitop (có nghĩa là, đặc hiệu đơn) dù chúng có thể liên kết với nhiều bản sao của loại epitop đó (có nghĩa là, lưỡng trị hoặc đa trị). Lĩnh vực này đã nhận thấy khả năng sản sinh ra kháng thể đôi khác với các kháng thể tự nhiên như vậy ở chỗ có khả năng liên kết với hai hoặc nhiều loại epitop khác nhau (có nghĩa là, có tính đặc hiệu kép hoặc tính đa đặc hiệu ngoài lưỡng trị hoặc đa trị) (xem tài liệu, ví dụ, “Diabodies’: Small Bivalent and Bispecific Antibody Fragments”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448, (1993) của Holliger et al.; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94, (1999) của Alt et al.; “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity”, *J. Biol. Chem.* 280(20) (2005) của Lu, D. et al.:19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); “New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives”, In: *NOVEL FRONTIERS IN THE PRODUCTION OF COMPOUNDS FOR BIOMEDICAL USE*, của Mertens, N. et al., A. VanBroekhoven et al. (biên tập), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), trang 195-208; “Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange”, *Protein Engineering* 14(2):1025-1033, (2001) của Wu, A. et al.; “A Diabody For Cancer Immunotherapy and Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain”, Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992, (2004) của Asano et al.; “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System”, *Protein Eng.* 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. et al.; “Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy”, *Cancer Res.* 69(12):4941-4944, (2009) của Baeuerle, P.A. et al..

Tạo ra được các kháng thể đôi không đặc hiệu đơn đem lại một lợi thế ý nghĩa: khả năng ghép nối đồng thời và định vị đồng thời các tế bào biểu hiện các epitop khác nhau. Do đó các kháng thể đôi đặc hiệu kép có nhiều ứng dụng bao gồm trị liệu và chẩn đoán miễn dịch. Tính đặc hiệu kép cho độ linh hoạt lớn trong thiết kế và xử lý kỹ thuật kháng thể đôi trong nhiều ứng dụng, tạo ra ái lực gia tăng đối với các kháng nguyên multime, tác nhân liên kết ngang các kháng nguyên phân biệt, và điều khiển sự hướng đích đến các loại tế bào cụ thể dựa vào sự có mặt của cả hai kháng nguyên đích. Do hoá trị của chúng tăng, nên tốc độ phân ly thấp và độ thanh thải nhanh chóng ra khỏi hệ tuần hoàn (đối với các kháng thể đôi có kích cỡ nhỏ, nhỏ hơn hoặc bằng ~50 kDa), các phân tử kháng thể đôi đã biết trong lĩnh vực này cũng có ứng dụng cụ thể trong lĩnh vực chụp ảnh khối u (“Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*”, *Protein Eng.* 10:1221, (1997) của Fitzgerald et al.). Đặc biệt quan trọng là khả năng ghép nối đồng thời các tế bào phân biệt, ví dụ, tác nhân liên kết ngang các tế bào T gây độc tế bào với các tế bào khối u (“Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells”, *Nature* 314:628-631, (1985) của Staerz et al. và “Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabodies”, *Protein Eng.* 9:299-305, (1996) của Holliger et al.).

Các miền liên kết epitop của kháng thể đôi cũng có thể được định hướng đến phần quyết định tính kháng nguyên bề mặt của tế bào tác động miễn dịch bất kỳ, như là CD3, CD16, CD32, hoặc CD64, mà được biểu hiện trên các lympho bào T, các tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc các tế bào đơn nhân khác. Trong nhiều nghiên cứu, kháng thể đôi liên kết với phần quyết định tế bào tác động, ví dụ, các thụ thể Fc γ (Fc γ R), cũng đã được xác định là hoạt hoá tế bào tác động này (“Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody”, *Protein Eng.* 9:299-305, (1996) của Holliger et al.; “Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies and B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins”, *Cancer Res.* 59:2909-2916, (1999) của Holliger et al.; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Thường thì sự hoạt hoá tế bào tác động được khơi mào bởi sự liên kết của kháng thể liên kết kháng nguyên với tế bào tác động qua tương tác Fc-Fc γ R; do đó, về mặt này, các phân tử kháng thể đôi có thể

có chức năng tương tự Ig không tùy thuộc vào việc chúng có bao gồm miền Fc hay không (ví dụ, như được thử nghiệm trong thử nghiệm chức năng tác động bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này hoặc được nêu ví dụ trong bản mô tả này (ví dụ, thử nghiệm ADCC)). Bằng cách liên kết ngang các tế bào khối u và các tế bào tác động, kháng thể đôi không chỉ đem tế bào tác động đó lại gần các tế bào khối u mà còn giúp tiêu diệt hiệu quả khối u (xem tài liệu, ví dụ, “Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics”, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197, (2003) của Cao et al.).

Tuy nhiên, các lợi thế trên lại cần chi phí đáng kể. Việc tạo thành các kháng thể đôi không đặc hiệu đơn này đòi hỏi sự lắp ghép thành công hai hoặc nhiều hơn hai polypeptit riêng biệt và khác nhau (có nghĩa là, việc tạo thành này cần các kháng thể đôi tạo thành thông qua phản ứng heterodime hoá của các loại chuỗi polypeptit khác nhau). Thực tế này trái ngược với các kháng thể đôi đặc hiệu đơn mà tạo thành thông qua phản ứng homodime hoá của các chuỗi polypeptit giống nhau. Do cần ít nhất hai polypeptit không tương tự nhau (có nghĩa là, hai loại polypeptit) để tạo ra kháng thể đôi không đặc hiệu đơn, và do việc homodime hoá các polypeptit này tạo ra các phân tử bất hoạt (“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System”, *Protein Eng.* 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. et al., nên việc sản xuất các polypeptit này cần phải được thực hiện theo cách nhằm ngăn chặn sự liên kết cộng hoá trị giữa các polypeptit cùng loại (có nghĩa là, ngăn chặn phản ứng homodime hoá) (“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System”, *Protein Eng.* 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. et al.). Do đó, lĩnh vực này đã tìm cách kết hợp không cộng hoá trị giữa các polypeptit đó (xem tài liệu, ví dụ, “Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation and Radiolabeling For Tumor Targeting Applications”, *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27, (2004) của Olafsen et al.; “A Diabody For Cancer Immunotherapy and Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain”, Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992, (2004) của Asano et al.; “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System”, *Protein Eng.* 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. et al.; “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity”, *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672, (2005) của Lu, D. et al.).

Tuy nhiên, lĩnh vực này cũng nhận thấy rằng các kháng thể đôi đặc hiệu kép gồm các polypeptit đã kết hợp không cộng hoá trị đó không ổn định và dễ bị phân ly thành các monome không hoạt động (xem tài liệu, ví dụ, “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity”, J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672, (2005) của Lu, D. et al.).

Trước thách thức này, lĩnh vực này đã thành công phát triển ra các kháng thể đôi không đặc hiệu đơn dạng heterodime liên kết cộng hoá trị, ổn định (xem tài liệu, ví dụ, WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; “Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis and *In Vivo* B-Cell Depletion”, J. Molec. Biol. 399(3):436-449, (2010) của Johnson, S. et al.; “Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold”, Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943, (2010) của Veri, M.C. et al.; “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma”, Blood 117(17):4542-4551, (2011) của Moore, P.A. et al.). Phương pháp này bao gồm bước xử lý kỹ thuật một hoặc nhiều gốc xystein thành mỗi trong các loại polypeptit được sử dụng. Ví dụ, việc thêm gốc xystein vào đầu tận C của cấu trúc đó đã cho thấy là cho phép tạo liên kết disulfua giữa các chuỗi polypeptit, làm ổn định heterodime tạo ra mà không gây ảnh hưởng đến các đặc tính liên kết của phân tử hoá trị hai này.

Mặc dù có thành công như vậy, việc sản xuất các kháng thể đôi không đặc hiệu đơn dạng heterodime chức năng, ổn định, có thể còn được tối ưu hoá bằng cách lựa chọn cẩn thận và sắp đặt các gốc xystein vào một hoặc nhiều chuỗi polypeptit được sử dụng. Các kháng thể đôi được tối ưu hoá này có thể được sản xuất với hiệu suất cao hơn và có hoạt tính lớn hơn so với các kháng thể đôi chưa được tối ưu hoá. Do đó, sáng chế nhằm vào vấn đề là tạo ra các polypeptit được thiết kế đặc biệt và tối ưu hoá để tạo thành các kháng thể đôi heterodime. Sáng chế giải quyết vấn đề này bằng cách tạo ra các kháng thể đôi CD123 x CD3 được tối ưu hoá tiêu biểu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 có khả năng liên kết đồng thời với CD123 và CD3, và đề xuất việc sử dụng các phân tử này trong điều trị bệnh, cụ thể là các bệnh ác tính liên quan đến máu.

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 theo sáng chế bao gồm ít nhất hai chuỗi polypeptit khác nhau mà kết hợp với nhau theo cách heterodime hoá để tạo thành một vị trí liên kết đặc hiệu đối với epitop của CD123 và một vị trí liên kết đặc hiệu đối với epitop của CD3. Theo đó kháng thể đôi CD123 x CD3 theo sáng chế đơn trị ở chỗ nó có khả năng liên kết với chỉ một bản sao của epitop của CD123 và chỉ một bản sao của epitop CD3, nhưng đặc hiệu kép ở chỗ một kháng thể đôi có thể liên kết đồng thời với epitop của CD123 và với epitop của CD3. Các chuỗi polypeptit riêng lẻ của các kháng thể đôi được liên kết cộng hoá trị với nhau, ví dụ như bằng cách liên kết disulfua các gốc xystein nằm trong mỗi chuỗi polypeptit. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể đôi theo sáng chế còn có miền Fc globulin miễn dịch hoặc miền liên kết albumin để kéo dài thời gian bán thải *in vivo*.

Cụ thể, sáng chế cũng đề xuất kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu- trình tự có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123 và với epitop của CD3, trong đó kháng thể đôi này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, được liên kết cộng hoá trị với nhau, trong đó:

A. Chuỗi polypeptit thứ nhất này bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C:

i. Miền 1, bao gồm:

(1) miền phụ (1A), miền này bao gồm miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:21); và

(2) miền phụ (1B), miền này bao gồm miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}) (SEQ ID NO:26);

trong đó miền phụ 1A và miền phụ 1B được phân cách với nhau bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:29);

ii. Miền 2, trong đó miền 2 này là miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34) hoặc miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35), trong đó miền 2 này được phân cách với miền 1 bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:30); và

B. Chuỗi polypeptit thứ hai này bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C:

i. Miền 1, bao gồm:

(1) miền phụ (1A), miền này bao gồm miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}) (SEQ ID NO:25); và

(2) miền phụ (1B), miền này bao gồm miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:22);

trong đó miền phụ 1A và miền phụ 1B được phân cách với nhau bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:29);

ii. Miền 2, trong đó miền 2 này là miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35) hoặc miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34), trong đó miền 2 này được phân cách với miền 1 bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:30); và trong đó miền 2 của chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai không đồng thời là miền vòng xoắn E hoặc miền vòng xoắn K;

và trong đó:

(a) miền VL của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên và miền VH của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên tạo thành miền liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD3; và

(b) miền VL của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên và miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên tạo thành miền liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 không được làm tối ưu trình tự có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123 và với epitop của CD3, trong đó kháng thể đôi này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, được liên kết cộng hoá trị với nhau, trong đó:

A. Chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C:

i. Miền 1, bao gồm:

(1) miền phụ (1A), miền này bao gồm miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:23); và

(2) miền phụ (1B), miền này bao gồm miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}) (SEQ ID NO:28);

trong đó miền phụ 1A và miền phụ 1B được phân cách với nhau bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:29);

ii. Miền 2, trong đó miền 2 này là miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34) hoặc miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35), trong đó miền 2 được phân cách với miền 1 bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:30); và

B. Chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C:

i. Miền 1, bao gồm:

(1) miền phụ (1A), miền này bao gồm miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}) (SEQ ID NO:27); và

(2) miền phụ (1B), miền này bao gồm miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:24);

trong đó miền phụ 1A và miền phụ 1B được phân cách với nhau bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:29);

ii. Miền 2, trong đó miền 2 này là miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35) hoặc miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34), trong đó miền 2 được phân cách với miền 1 bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:30); và trong đó miền 2 của chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai không đồng thời là miền vòng xoắn E hoặc miền vòng xoắn K

và trong đó:

(a) miền VL của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên và miền VH của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên tạo thành miền liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD3; và

(b) miền VL của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên và miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên tạo thành miền liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123.

Sáng chế còn đề xuất phương án về các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép nêu trên, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc chuỗi polypeptit thứ hai còn bao gồm

miền liên kết albumin (SEQ ID NO:36) được liên kết ở đầu tận C với miền 2 hoặc ở đầu tận N với miền 1, qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:31).

Sáng chế còn đề xuất phương án về các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép nêu trên, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc chuỗi polypeptit thứ hai còn bao gồm miền 3 bao gồm miền CH2 và CH3 của miền Fc của globulin miễn dịch IgG (SEQ ID NO:37), trong đó miền 3 được liên kết ở đầu tận N với miền 1A qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:33).

Sáng chế còn đề xuất phương án về các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép nêu trên, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc chuỗi polypeptit thứ hai còn bao gồm miền 3 bao gồm miền CH2 và CH3 của miền Fc của globulin miễn dịch IgG (SEQ ID NO:37), trong đó miền 3 được liên kết ở đầu tận C với miền 2 qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:32).

Sáng chế còn đề xuất phương án về kháng thể đôi bất kỳ trong số các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép nêu trên, trong đó miền 2 của chuỗi polypeptit thứ nhất là miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35) và miền 2 của chuỗi polypeptit thứ hai là miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34).

Sáng chế còn đề xuất phương án về kháng thể đôi bất kỳ trong số các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép nêu trên, trong đó miền 2 của chuỗi polypeptit thứ nhất là miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34) và miền 2 của chuỗi polypeptit thứ hai là miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35).

Sáng chế còn đề xuất phương án về kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123 và với epitop của CD3, trong đó kháng thể đôi này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, được liên kết cộng hoá trị với nhau, trong đó: kháng thể đôi đặc hiệu kép này bao gồm:

- A. Chuỗi polypeptit thứ nhất có trình tự axit amin của SEQ ID NO:1; và
- B. Chuỗi polypeptit thứ hai có trình tự axit amin của SEQ ID NO:3;

trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai này được liên kết cộng hoá trị với nhau bằng liên kết disulfua.

Các kháng thể đôi theo sáng chế có các hoạt tính chức năng tăng cường ngoài mong đợi như mô tả dưới đây.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn nếu có khả năng phản ứng chéo với các protein CD123 và CD3 của cả người và động vật linh trưởng, tốt hơn nữa là các protein CD123 và CD3 của khỉ đuôi dài.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có khả năng làm suy kiệt, trong thử nghiệm dựa trên tế bào *in vitro*, các tế bào tua tương bào huyết (pDC) từ dịch nuôi cấy của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) cấp một với IC_{50} bằng khoảng 1 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,8 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,6 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,4 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,2 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,1 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,05 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,04 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,03 ng/ml hoặc thấp hơn, khoảng 0,02 ng/ml hoặc thấp hơn hoặc khoảng 0,01ng/ml hoặc thấp hơn. Tốt hơn là, IC_{50} bằng khoảng 0,01ng/ml hoặc thấp hơn. Trong thử nghiệm nêu trên, dịch nuôi cấy của các PBMC cấp một có thể là từ khỉ đuôi dài, trong trường hợp đó sự suy kiệt là của các tế bào tua tương bào huyết (pDC) của khỉ đuôi dài. Các kháng thể đôi theo sáng chế tùy ý có thể có khả năng làm suy kiệt các tế bào tua tương bào huyết (pDC) từ dịch nuôi cấy cấp một của các PBMC như nêu trên, trong đó thử nghiệm này được tiến hành bằng hoặc theo quy trình của Ví dụ 14, như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng cách cải biến thử nghiệm này theo hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng cách khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có tính gây độc tế bào trong thử nghiệm Kasumi-3 *in vitro* với EC_{50} bằng khoảng 0,05 ng/mL hoặc thấp hơn, tốt hơn là, EC_{50} bằng khoảng 0,04 ng/mL hoặc thấp hơn, khoảng 0,03 ng/mL hoặc thấp hơn, khoảng 0,02 ng/mL hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 0,01 ng/mL hoặc thấp hơn. Các kháng thể đôi theo sáng chế tùy ý có thể có tính gây độc tế bào như nêu trên, trong đó thử nghiệm này được tiến hành bằng hoặc theo quy trình trong Ví dụ 3 như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng cách cải biến thử nghiệm này theo hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng cách khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có tính gây độc tế bào trong thử nghiệm Molm-13 *in vitro* với EC_{50} bằng khoảng 5 ng/mL hoặc thấp hơn. Tốt hơn là, EC_{50} bằng khoảng 3 ng/mL hoặc thấp hơn, khoảng 2 ng/mL hoặc thấp hơn, khoảng 1 ng/mL hoặc thấp hơn, khoảng 0,75 ng/mL hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 0,2 ng/mL

hoặc thấp hơn. Các kháng thể đôi theo sáng chế tùy ý có thể có tính gây độc tế bào như nêu trên, trong đó thử nghiệm này được tiến hành bằng hoặc theo quy trình trong Ví dụ 3 như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng cách cải biến thử nghiệm này theo hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng cách khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có khả năng ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u MOLM-13 ở chuột nhắt. Tốt hơn là, các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có khả năng ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u MOLM-13 ở chuột nhắt với nồng độ bằng ít nhất là khoảng 20 $\mu\text{g/kg}$, ít nhất là khoảng 4 $\mu\text{g/kg}$, ít nhất là khoảng 0,8 $\mu\text{g/kg}$, ít nhất là khoảng 0,6 $\mu\text{g/kg}$ hoặc ít nhất là khoảng 0,4 $\mu\text{g/kg}$. Các kháng thể được ưu tiên theo sáng chế sẽ ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u MOLM-13 ở chuột nhắt ít nhất là 25%, nhưng có thể ít nhất là khoảng 40% hoặc cao hơn, ít nhất là khoảng 50% hoặc cao hơn, ít nhất là khoảng 60% hoặc cao hơn, ít nhất là khoảng 70% hoặc cao hơn, ít nhất là khoảng 80% hoặc cao hơn, ít nhất là khoảng 90% hoặc cao hơn, hoặc thậm chí là ức chế hoàn toàn sự phát triển của khối u MOLM-13 sau một thời gian hoặc làm cho khối u teo nhỏ hoặc biến mất. Tác dụng ức chế này diễn ra đối với ít nhất là giống chuột nhắt NSG. Các kháng thể đôi theo sáng chế tùy ý có thể có khả năng ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u MOLM-13 ở chuột nhắt theo cách nêu trên bằng hoặc theo quy trình trong Ví dụ 6 như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng cách cải biến thử nghiệm này theo hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng cách khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có khả năng ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u RS4-11 ở chuột nhắt. Tốt hơn là, các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có khả năng ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u RS4-11 ở chuột nhắt với nồng độ bằng ít nhất là khoảng 0,5 mg/kg , ít nhất là khoảng 0,2 mg/kg , ít nhất là khoảng 0,1 mg/kg , ít nhất là khoảng 0,02 mg/kg hoặc ít nhất là khoảng 0,004 mg/kg . Các kháng thể được ưu tiên theo sáng chế sẽ ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u RS4-11 ở chuột nhắt ít nhất là khoảng 25%, nhưng có thể ít nhất là khoảng 40%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 60%, ít nhất là khoảng 70%, ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 90%, hoặc thậm chí là ức chế hoàn toàn sự phát triển của khối u RS4-11 sau một khoảng thời gian hoặc làm cho khối

u teo nhỏ hoặc biến mất. Tác dụng ức chế này diễn ra đối với ít nhất là giống chuột nhất NSG. Các kháng thể đôi theo sáng chế tùy ý có thể có khả năng ức chế sự phát triển của mảnh ghép khác loài khối u RS4-11 ở chuột nhất theo cách nêu trên bằng hoặc theo quy trình của Ví dụ 6 như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng cách cải biến thử nghiệm này theo hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng cách khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có khả năng làm suy kiệt tế bào non ác tính bệnh bạch cầu *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML. Tốt hơn là, các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có khả năng làm suy kiệt tế bào non ác tính bệnh bạch cầu *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML ở nồng độ bằng ít nhất là khoảng 0,01 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,02 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,04 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,06 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,08 ng/ml hoặc ít nhất là khoảng 0,1 ng/ml. Tốt hơn là, các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có khả năng làm suy kiệt tế bào non ác tính bệnh bạch cầu *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML đến mức thấp hơn 20% tổng số tế bào non ác tính bệnh bạch cầu cấp một ở nồng độ kháng thể đôi bằng ít nhất là khoảng 0,01 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,02 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,04 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,06 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,08 ng/ml hoặc ít nhất là khoảng 0,1 ng/ml, tùy ý sau khi ủ dịch nuôi cấy cấp một này với kháng thể đôi trong khoảng 120 giờ. Tốt hơn là, tế bào non ác tính bệnh bạch cầu bị suy kiệt *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML đến mức thấp hơn 20% tổng số tế bào non ác tính bệnh bạch cầu cấp một ở nồng độ kháng thể đôi bằng khoảng 0,01 ng/ml hoặc 0,1 ng/ml sau khi ủ dịch nuôi cấy cấp một này với kháng thể đôi trong khoảng 120 giờ.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có khả năng cảm ứng sự tăng trưởng số lượng tế bào T *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML. Tốt hơn là, mức tăng trưởng này có thể đến khoảng 70% hoặc hơn so với số lượng tế bào T tối đa có thể được tăng trưởng trong thử nghiệm này. Tốt hơn là, các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có khả năng cảm ứng sự tăng trưởng số lượng tế bào T *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML đến khoảng 70% hoặc hơn so với số lượng tế bào T tối đa có thể được tăng trưởng trong thử nghiệm này ở nồng độ kháng thể đôi bằng ít nhất là khoảng 0,01 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,02

ng/ml, ít nhất là khoảng 0,04 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,06 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,08 ng/ml hoặc ít nhất là khoảng 0,1 ng/ml, tùy ý sau khi ủ dịch nuôi cấy cấp một này với kháng thể đôi trong khoảng 120 giờ. Tốt hơn là, số lượng tế bào T tăng trưởng *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML đến khoảng 70% hoặc hơn so với số lượng tế bào T tối đa mà có thể được tăng trưởng trong thử nghiệm này ở nồng độ kháng thể đôi bằng khoảng 0,01 ng/ml hoặc khoảng 0,1 ng/ml sau khi ủ dịch nuôi cấy cấp một này với kháng thể đôi trong khoảng 120 giờ.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có khả năng cảm ứng sự hoạt hoá của quần thể tế bào T *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML. Sự hoạt hoá này có thể xảy ra ở nồng độ kháng thể đôi bằng ít nhất là khoảng 0,01 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,02 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,04 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,06 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,08 ng/ml hoặc ít nhất là khoảng 0,1 ng/ml, tùy ý sau khi ủ dịch nuôi cấy cấp một này với kháng thể đôi trong khoảng 72 giờ. Có thể xác định sự hoạt hoá này bằng mức biểu hiện của chỉ thị hoạt hoá tế bào T chẳng hạn như CD25. Tốt hơn là, sự hoạt hoá quần thể tế bào T *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML xác định được bằng mức biểu hiện CD25 có thể xảy ra ở nồng độ kháng thể đôi bằng khoảng 0,01 ng/ml hoặc khoảng 0,1 ng/ml sau khi ủ dịch nuôi cấy cấp một này với kháng thể đôi trong khoảng 72 giờ.

Các kháng thể đôi theo sáng chế tốt hơn là có khả năng làm suy kiệt tế bào non ác tính bệnh bạch cầu *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML đến mức thấp hơn 20% tổng số tế bào non ác tính bệnh bạch cầu cấp một và đồng thời cảm ứng sự tăng trưởng số lượng tế bào T *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML đến khoảng 70% hoặc hơn so với số lượng tế bào T tối đa mà có thể được tăng trưởng trong thử nghiệm này ở nồng độ kháng thể đôi bằng ít nhất là khoảng 0,01 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,02 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,04 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,06 ng/ml, ít nhất là khoảng 0,08 ng/ml hoặc ít nhất là khoảng 0,1 ng/ml, tùy ý sau khi ủ dịch nuôi cấy cấp một này với kháng thể đôi trong khoảng 120 giờ. Tốt hơn là, nồng độ kháng thể đôi là bằng khoảng 0,01 ng/ml hoặc khoảng 0,1 ng/ml và dịch nuôi cấy này được ủ với kháng thể đôi trong khoảng 120 giờ.

Các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có khả năng làm suy kiệt tế bào non ác tính bệnh bạch cầu *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tủy xương AML

và/hoặc cảm ứng tăng trưởng số lượng tế bào T *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tuỷ xương AML và/hoặc cảm ứng sự hoạt hoá của quần thể tế bào T *in vitro* trong dịch nuôi cấy cấp một của các tế bào tuỷ xương AML theo cách nêu trên bằng hoặc theo quy trình trong Ví dụ 8 như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng cách cải biến thử nghiệm này theo hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng cách khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Để làm rõ, các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có một, hai, ba, nhiều hơn 3 hoặc tất cả các tính chất chức năng được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, các kháng thể đôi theo sáng chế có thể có tổ hợp các tính chất chức năng bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này.

Các kháng thể đôi theo sáng chế có thể để sử dụng làm dược phẩm. Tốt hơn là, các kháng thể đôi này để sử dụng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện của CD123. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể đôi theo sáng chế để sử dụng để sản xuất dược phẩm, tốt hơn là để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện của CD123 như được định nghĩa trong bản mô tả này.

Bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện của CD123 có thể là bệnh ung thư. Ví dụ, bệnh ung thư có thể được chọn từ nhóm gồm: bệnh bạch cầu tuỷ bào cấp tính (AML), bệnh bạch cầu nguyên bào tuỷ mạn tính (CML), bao gồm con tế bào non ác tính của bệnh CML và gen ung thư Abelson có liên quan đến bệnh CML (hoán vị Bcr-ABL), hội chứng loạn sản tuỷ (MDS), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho B cấp tính (B-ALL), bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL), bao gồm hội chứng Richter hoặc biến đổi Richter ở bệnh CLL, bệnh bạch cầu tế bào nhung mao (HCL), bệnh ung thư tế bào tua tương bào huyết non ác tính (BPDCN), u bạch huyết không phải Hodgkin (NHL), bao gồm bệnh bạch cầu tế bào Mantle (MCL), và u bạch huyết lympho bào nhỏ (SLL), u bạch huyết Hodgkin, u tế bào bón toàn thân, và u bạch huyết Burkitt.

Bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện của CD123 có thể là tình trạng viêm. Ví dụ, tình trạng viêm có thể được chọn từ nhóm gồm: bệnh luput tự miễn (SLE), dị ứng, bệnh hen và viêm khớp dạng thấp.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa kháng thể đôi bất kỳ trong số các kháng thể đôi nêu trên và chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm nêu trên để sử dụng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện CD123.

Sáng chế đặc biệt đề xuất được phẩm nêu trên, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện CD123 là bệnh ung thư (đặc biệt là bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm: bệnh bạch cầu tuỷ bào cấp tính (AML), bệnh bạch cầu nguyên bào tuỷ mạn tính (CML), bao gồm cơn tế bào non ác tính của bệnh CML và gen ung thư Abelson có liên quan đến bệnh CML (hoán vị Bcr-ABL), hội chứng loạn sản tuỷ (MDS), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho B cấp tính (B-ALL), bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL), bao gồm hội chứng Richter hoặc biến đổi Richter ở bệnh CLL, bệnh bạch cầu tế bào nhung mao (HCL), bệnh ung thư tế bào tua tương bào huyết non ác tính (BPDCN), u bạch huyết không phải Hodgkin (NHL), bao gồm bệnh bạch cầu tế bào Mantle (MCL), và u bạch huyết lympho bào nhỏ (SLL), u bạch huyết Hodgkin, u tế bào bón toàn thân, và u bạch huyết Burkitt).

Sáng chế cũng đặc biệt đề xuất được phẩm nêu trên, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện CD123 là tình trạng viêm (đặc biệt là tình trạng viêm được chọn từ nhóm gồm: bệnh luput tự miễn (SLE), dị ứng, bệnh hen, và viêm khớp dạng thấp).

Thuật ngữ như “khoảng” nên được hiểu là trong khoảng 10%, tốt hơn nữa là trong khoảng 5%, của giá trị đã nêu, trừ khi ngữ cảnh quy định khác đi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện CD123 đã biết là được biểu hiện trên các tế bào gốc bệnh bạch cầu.

Fig.2 thể hiện cấu trúc của chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai của kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 hai chuỗi theo sáng chế.

Fig.3A và Fig.3B thể hiện cấu trúc của hai phiên bản của các chuỗi polypeptit thứ nhất, thứ hai và thứ ba của kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 ba chuỗi theo sáng chế (Phiên bản 1, Fig.3A; Phiên bản 2, Fig.3B).

Fig.4 (các đồ thị A-E) thể hiện khả năng điều tiết quá trình tiêu diệt định hướng lại đối với các tế bào đích bộc lộ CD123 ở các lượng khác nhau bởi tế bào T của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 khác nhau. Hình vẽ này cung cấp các đường cong đáp ứng liều dùng cho thấy kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (“DART-A”) có miễn liên kết albumin (DART-A có ABD “w/ABD”) có tính gây độc tế bào lớn hơn so với kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) hoặc kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 không được làm tối ưu trình tự (“DART-B”) ở nhiều loại tế bào đích: RS4-11 (Đồ thị A); TF-1 (Đồ thị B); Molm-13 (Đồ thị C); Kasumi-3 (Đồ thị D); và THP-1 (Đồ thị E) ở tỷ lệ E:T (tế bào tác động:tế bào đích) = 10:1.

Fig.5 (các đồ thị A-D) thể hiện khả năng của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A), kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miễn liên kết albumin (DART-A có ABD “w/ABD”) và kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miễn Fc của globulin miễn dịch IgG (DART-A có Fc “w/Fc”) trong việc điều tiết sự hoạt hoá tế bào T trong quá trình tiêu diệt định hướng lại đối với các tế bào đích. Hình vẽ này trình bày các đường cong đáp ứng liều dùng thể hiện tính gây độc tế bào được điều tiết bởi DART-A, DART-A w/ABD và DART-A w/Fc ở các tế bào Kasumi-3 (Đồ thị A) và THP-1 (Đồ thị B) và các tế bào T CD8 đã tinh chế ở tỷ lệ E:T (tế bào tác động:tế bào đích) = 10:1 (18 giờ ủ). Đồ thị C và đồ thị D thể hiện các đường cong đáp ứng liều dùng khi hoạt hoá tế bào T bằng cách sử dụng chỉ thị CD25 trên các tế bào T CD8 khi có mặt (Đồ thị D) và không có mặt (Đồ thị C) các tế bào đích.

Fig.6 (các đồ thị A-B) thể hiện nồng độ Granzyme B và Perforin trong các tế bào T CD4 và CD8 sau khi điều trị bằng kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) (Đồ thị A) hoặc kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) (Đồ thị B) khi có mặt các tế bào đích Kasumi-3 và các tế bào T nghỉ ở tỷ lệ E:T = 10:1.

Fig.7 (các đồ thị A-B) thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) ở các mức liều dùng ng/kg. Các tế bào MOLM-13 (biểu hiện CD123 ở mức trung bình) được trộn đồng thời với các tế bào T và được cấy dưới da (T:E 1:1) ở chuột nhắt NSG. Điều trị qua tiêm tĩnh mạch một lần/ngày trong 8 ngày (QDx8) bắt đầu từ lúc cấy ghép. So sánh DART-

A ở nhiều nồng độ khác nhau với kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng). Đồ thị A thể hiện các tế bào Molm-13 một mình hoặc với các tế bào T, và tác dụng của các liều dùng DART-A khác nhau đến kích cỡ khối u thậm chí ở các thời điểm sau 30 ngày. Đồ thị B thể hiện tác dụng của các liều dùng DART-A tăng dần đến kích cỡ khối u quan sát ở chuột nhắt NSG nhận tế bào MOLM-13 và tế bào T (T:E 1:1) trong một khoảng thời gian từ 0 đến 18 ngày.

Fig.8 thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) đối với các tế bào RS4-11 (ALL có các đặc tính của bạch cầu đơn nhân to). Các tế bào được trộn đồng thời với các tế bào T và được cấy dưới da (T:E 1:1) ở chuột nhắt NSG. Điều trị qua tiêm tĩnh mạch một lần/ngày trong 4 ngày (QDx4) bắt đầu từ lúc cấy ghép. So sánh DART-A ở nhiều nồng độ khác nhau với kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng).

Fig.9 (các đồ thị A-B) thể hiện các tế bào non ác tính CD123+ trong các tế bào đơn nhân tủy xương (BM MNC) và các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ bệnh nhân AML 1 (Đồ thị A) so với dòng tế bào AML Kasumi-3 (Đồ thị B).

Fig.10 (các đồ thị A-C) thể hiện khả năng điều tiết làm giảm tế bào non ác tính đối với bệnh AML nguyên phát ở 120 giờ (Đồ thị A), điều khiển sự tăng trưởng tế bào T đối với bệnh AML nguyên phát ở 120 giờ (Đồ thị B) và cảm ứng sự hoạt hoá tế bào T đối với bệnh AML ở 48 giờ và 72 giờ (Đồ thị C) của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A).

Fig.11 (các đồ thị A-H) thể hiện đặc điểm nhận biết của quần thể tế bào non ác tính CD123+ trong mẫu cấp một của các PBMC bệnh ALL. Đồ thị A và đồ thị E thể hiện sự tán xạ góc thẳng và tán xạ góc bên của quần thể đầu vào gồm các PBMC bình thường (Đồ thị A) và các PBMC bệnh ALL (Đồ thị E). Đồ thị B và đồ thị F thể hiện đặc điểm nhận biết của quần thể lympho bào dưới dạng các tế bào B cấp một (Đồ thị B) và tế bào non ác tính bệnh bạch cầu (Đồ thị F). Đồ thị C và đồ thị G thể hiện đặc điểm nhận biết của quần thể các lympho bào mà là CD123+. Đồ thị D và đồ thị H thể hiện đặc điểm nhận biết của các tế bào CD19+ và các tế bào CD123+.

Fig.12 (các đồ thị A-B) thể hiện đặc điểm nhận biết của các quần thể CD4 và CD8 của các tế bào T trong mẫu cấp một của các PBMC bệnh ALL. Đồ thị A thể hiện sự tán xạ góc thẳng và tán xạ góc bên của các PBMC bệnh ALL đầu vào. Đồ thị B thể

hiện các quần thể CD4 hoặc CD8 của các tế bào T có trong các mẫu. Các con số chỉ ra rằng các tế bào T CD4 chiếm khoảng 0,5% tổng số lượng tế bào và các tế bào T CD8 chiếm khoảng 0,4% tổng số lượng tế bào có trong mẫu PBMC bệnh ALL.

Fig.13 (các đồ thị A-H) thể hiện khả năng của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) trong việc điều tiết sự suy kiệt tế bào non ác tính ALL bằng CTL (Lympho bào T gây độc tế bào) tự thân. Đồ thị A và đồ thị E thể hiện sự tán xạ góc thẳng và tán xạ góc bên của quần thể đầu vào của các PBMC bình thường (Đồ thị A) và các PBMC bệnh ALL (Đồ thị E). Các PBMC không được điều trị (đồ thị B và đồ thị F), được điều trị bằng kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) (đồ thị C và đồ thị G) hoặc được điều trị bằng DART-A (đồ thị D và đồ thị H) và được ủ trong 7 ngày sau đó được nhuộm màu đối với CD34 và CD19.

Fig.14 (các đồ thị A-L) thể hiện khả năng của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) trong việc điều tiết sự tăng trưởng tế bào T (các đồ thị A, B, C, G, H và I) và sự hoạt hoá (các đồ thị D, E, F, J, K và L) ở PBMC bình thường (các đồ thị A-F) và PBMC bệnh ALL (các đồ thị G-L). Các tế bào không được điều trị (các đồ thị A, D, G và J), hoặc được điều trị bằng kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) (các đồ thị B, E, H và K) hoặc DART-A (các đồ thị C, F, I và L) trong 7 ngày.

Fig.15 (các đồ thị A-C) thể hiện đặc điểm nhận biết của quần thể tế bào non ác tính AML và các tế bào T trong mẫu AML cấp một. Đồ thị A thể hiện sự tán xạ góc thẳng và tán xạ góc bên của các PBMC bệnh AML đầu vào. Đồ thị B thể hiện đặc điểm nhận biết của quần thể tế bào non ác tính AML trong mẫu AML. Đồ thị C thể hiện đặc điểm nhận biết của quần thể tế bào T trong mẫu AML.

Fig.16 (các đồ thị A-C) thể hiện khả năng điều tiết sự suy kiệt tế bào non ác tính AML bằng CTL tự thân và sự tăng trưởng tế bào T của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A). Các PBMC bệnh AML nguyên phát từ bệnh nhân 2 được ủ với PBS, kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) hoặc DART-A trong 144 giờ. Đếm số lượng các tế bào non ác tính (Đồ thị A), các tế bào T CD4 (Đồ thị B) và các tế bào T CD8 (Đồ thị C).

Fig.17 (các đồ thị A-D) thể hiện khả năng điều tiết sự hoạt hoá tế bào T ở bệnh AML của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A). Xác định mức biểu hiện CD25 (Đồ thị A) và Ki-67 (Đồ thị B) đối với các tế bào T CD4 và CD8 từ bệnh nhân AML 2 sau khi ủ với kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) hoặc DART-A với các PBMC tự thân. Xác định nồng độ của perforin (Đồ thị C) và granzyme B (Đồ thị D) ở các tế bào T CD4 và CD8 từ bệnh nhân AML 2 sau khi ủ với DART đối chứng hoặc DART-A với các PBMC tự thân.

Fig.18 (các đồ thị A-D) cho thấy rằng kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) có khả năng phản ứng chéo với các protein CD123 và CD3 của người cũng như động vật linh trưởng. Các đồ thị thể hiện đường đồ thị cảm biến BIACORE™ của các kết quả phân tích đã tiến hành để đánh giá khả năng của DART-A trong việc liên kết với protein CD3 của người (đồ thị A) và của động vật linh trưởng không phải người (đồ thị B) và protein CD123 của người (đồ thị C) và của động vật linh trưởng không phải người (đồ thị D). Các giá trị KD được cung cấp.

Fig.19 (các đồ thị A-B) thể hiện khả năng điều tiết sự suy kiệt bạch cầu đơn nhân to tự thân *in vitro* với các PBCM của người và khi đuôi dài của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A). Các đồ thị thể hiện các kết quả của đường cong đáp ứng liều dùng của tính gây độc tế bào được điều tiết bởi DART-A với các PBMC người cấp một (Đồ thị A) hoặc các PBMC khi đuôi dài (Đồ thị B).

Fig.20 (các đồ thị A-N) thể hiện khả năng điều tiết sự suy kiệt pDC ở khi đuôi dài khi không gây cảm ứng xytokin toàn thân của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A). Các đồ thị A-D thể hiện kết quả đối chứng thu được ở thời điểm 4 giờ và 4 ngày với chất dẫn thuốc và chất mang. Các đồ thị E-H thể hiện kết quả đối chứng thu được ở thời điểm 4 giờ và 4 ngày với kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng). Các đồ thị I-N thể hiện kết quả thu được ở thời điểm 4 giờ và 4 ngày ở liều dùng 10 ng/kg/ngày và ở thời điểm 4 ngày với liều dùng 30 ng/kg/ngày của DART-A.

Fig.21 (các đồ thị A-D) thể hiện khả năng điều tiết sự suy kiệt pDC phụ thuộc vào liều dùng ở khi đuôi dài của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm

tối ưu trình tự (DART-A). Khi đuôi dài được cho dùng DART-A ở liều dùng 0,1, 1, 10, 30 100, 300, hoặc 1000 ng/kg. Đánh giá các PBMC ở thời điểm chỉ định và đếm tổng số lượng tế bào B (Đồ thị A), bạch cầu đơn nhân to (Đồ thị B), tế bào giết tự nhiên (NK) (Đồ thị C) và pDC (Đồ thị D).

Fig.22 (các đồ thị A-D) thể hiện khả năng điều biến không liên tục các tế bào T ở khi đuôi dài của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A). Khi đuôi dài được cho dùng DART-A ở liều dùng 0,1, 1, 10, 30 100, 300, hoặc 1000 ng/kg. Đánh giá các PBMC ở thời điểm chỉ định và đếm tổng số lượng tế bào T (Đồ thị A), tế bào T CD4 (Đồ thị B), tế bào CD69 (Đồ thị C) và tế bào T CD8 (Đồ thị D).

Fig.23 thể hiện phân tích SDS-PAGE đối với protein DART-A đã tinh chế trong điều kiện khử (bên trái) và không khử (bên phải).

Fig.24A và Fig.24B thể hiện đặc tính lý hoá của DART-A đã tinh chế. Fig.24A: profin SEC của protein DART-A trên cột TSK G3000SWxL đã hiệu chỉnh. Fig.24B: phổ khối của protein DART-A.

Fig.25A đến Fig.25D thể hiện phân tích SPR đối với DART-A liên kết với CD123 và CD3 đã cố định của người hoặc khi đuôi dài. Đường nét đứt thể hiện sự khớp số liệu tổng thể vào mô hình Langmuir 1:1 của các đường cong liên kết thực nghiệm thu được ở các nồng độ của DART-A bằng 0, 6,25, 12,5, 25, 50 hoặc 100nM (đường nét liền). Số liệu này là số liệu đại diện của ba thử nghiệm độc lập.

Từ Fig.26A đến Fig.26E cho thấy rằng DART-A có khả năng liên kết đồng thời với cả CD3 và CD123. Fig.26A và Fig.26B thể hiện kết quả của phân tích ELISA hai chức năng và cho thấy sự liên kết đồng thời của cả hai kháng nguyên đích của DART-A. Các đĩa ELISA được phủ CD123 của người (Fig.26A) hoặc CD123 của khi đuôi dài (Fig.26B). Chuẩn độ các nồng độ của DART-A và DART đối chứng tiếp đó phát hiện bằng CD3-biotin của người. Từ Fig.26C đến Fig.26E cho thấy sự liên kết trên bề mặt tế bào của DART-A trên tế bào đích Molm-13 CD123+ (Fig.26C), tế bào T của người (Fig.26D) và tế bào T của khi đuôi dài (Fig.26E). Phát hiện ra liên kết bằng phân tích FACS bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu với vùng vòng xoắn E và vòng xoắn K của phân tử DART-A hoặc DART đối chứng.

Từ Fig.27A đến Fig.27H thể hiện khả năng của DART-A trong việc điều tiết quá trình tiêu diệt định hướng lại đối với tế bào đích bởi các tế bào tác động của người hoặc của khí kháng dòng tế bào bệnh bạch cầu Kasumi-3 CD123+, cho thấy khả năng của các phân tử này trong việc liên kết với các phân nhóm các bạch cầu trong máu bình thường, bao gồm các pDC và các bạch cầu đơn nhân to và cho thấy khả năng của các phân tử này trong việc làm suy kiệt các tế bào CD14⁻CD123^{mức cao} (các pDC và các bạch cầu ưa kiềm) mà không có ảnh hưởng đến các bạch cầu đơn nhân to (tế bào CD14⁺). Fig.27A thể hiện các vị trí liên kết kháng CD123-PE tương đối trên dòng tế bào bệnh bạch cầu U937 và Kasumi-3 như được xác định bằng phân tích QFACS. Fig.27B thể hiện phần trăm gây độc tế bào được điều tiết tương đối thấp bởi DART-A hoặc DART đối chứng đối với các tế bào dòng tế bào AML (tế bào U937), như thể hiện trên Fig.27A là có tương đối ít vị trí liên kết CD123). Fig.27C thể hiện phần trăm gây độc tế bào được điều tiết bởi DART-A hoặc DART đối chứng khi có mặt các tế bào T đã tinh chế của người (dưới dạng tế bào tác động) đối với các tế bào dòng tế bào AML (tế bào Kasumi-3), như thể hiện trên Fig.27A là có số lượng vị trí liên kết CD123 nhiều đáng kể. Trên các hình vẽ từ Fig.27B đến Fig.27C, tỷ lệ E:T = 10:1. Fig.27D thể hiện phần trăm gây độc tế bào được điều tiết bởi DART-A hoặc DART đối chứng khi có mặt các PBMC đã tinh chế của khí đuôi dài (dưới dạng tế bào tác động) đối với tế bào Kasumi-3 (tỷ lệ E:T = 15:1), và cho thấy rằng DART-A có thể liên kết với các tế bào T của khí đuôi dài. Fig.27E thể hiện các vị trí liên kết kháng CD123-PE tương ứng trên tế bào Kasumi-3, bạch cầu đơn nhân to của người, tế bào tua tương bào huyết ("pDC") của người, bạch cầu đơn nhân to của khí đuôi dài và tế bào tua tương bào huyết của khí đuôi dài như được xác định bằng phân tích QFACS. Fig.27F thể hiện khả năng gây suy kiệt các tế bào CD14⁻CD123^{mức thấp} của DART-A. Fig.27G thể hiện khả năng gây suy kiệt các tế bào CD14⁻CD123^{mức cao} của DART-A. Fig.27H thể hiện khả năng gây suy kiệt các tế bào CD14⁻CD123^{mức cao} của khí đuôi dài của DART-A. Độ gây độc tế bào được xác định bằng cách giải phóng LDH, với các giá trị EC₅₀ được xác định bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad PRISM®.

Fig.28 thể hiện việc sử dụng mô hình hai ngăn để ước tính các thông số dược động học của DART-A. Số liệu này thể hiện nồng độ trong huyết thanh khi truyền xong (EOI) của DART-A ở khí đuôi dài sau khi được truyền trong 96 giờ ở liều dùng 100 ng/kg/ngày 300 ng/kg/ngày, 600 ng/kg/ngày, và 1000 ng/kg/ngày. Mỗi điểm trên

đồ thị tượng trưng cho từng con khi riêng rẽ, các vạch ngang tượng trưng cho giá trị trung bình của nhóm liều dùng đó.

Fig.29A đến Fig.29C thể hiện tác dụng của việc truyền DART-A đối với sự sản sinh xytokin, IL-6. Nồng độ IL-6 trong huyết thanh (giá trị trung bình $\pm$ SEM) ở khi được truyền DART-A được thể hiện theo nhóm điều trị. Khi đuôi dài được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc vào Ngày 1, tiếp đó đến 4 lần truyền hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (Nhóm 1) (Fig.29A) hoặc DART-A được sử dụng bằng cách truyền hằng tuần trong 4 ngày/tuần bắt đầu vào các Ngày 8, 15, 22, và 29 (các Nhóm từ 2 đến 5) (Fig.29B) hoặc bằng cách truyền trong 7 ngày/tuần trong 4 tuần bắt đầu vào Ngày 8 (Nhóm 6) (Fig.29C). Khoảng cách điều trị được chỉ ra bằng các thanh đặc màu ghi.

Fig.30A đến Fig.30F thể hiện tác dụng của việc truyền DART-A đến việc làm suy kiệt các tế bào CD14-/CD123+ (Fig.30A đến Fig.30C) và các tế bào CD303+ (Fig.30D đến Fig.30F). Hình vẽ thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SEM của nồng độ trong máu của CD14-/CD123+ (Fig.30A đến Fig.30C) hoặc CD303+ (Fig.30D đến Fig.30F) theo ngày nghiên cứu và theo nhóm. Khi đuôi dài được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc vào Ngày 1, tiếp đó là 4 lần truyền hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (nhóm 1) (Fig.30A và Fig.30D) hoặc DART-A được sử dụng bằng cách truyền hằng tuần trong 4 ngày/tuần bắt đầu vào các Ngày 8, 15, 22, và 29 (các nhóm từ 2 đến 5) (Fig.30A và Fig.30E) hoặc bằng cách truyền trong 7 ngày/tuần trong 4 tuần bắt đầu vào Ngày 8 (Nhóm 6) (Fig.30C và Fig.30F). Khoảng cách điều trị được chỉ ra bằng các thanh đặc màu ghi.

Fig.31A đến Fig.31I thể hiện các thay đổi quan sát được ở quần thể tế bào T (Fig.31A đến Fig.31C), quần thể tế bào CD4+ (Fig.31D đến Fig.31F) và quần thể tế bào CD8+ (Fig.31G đến Fig.31I) tiếp nhận DART-A bằng cách truyền trong 4 ngày bắt đầu vào các Ngày 8, 15, 22, và 29. Chú thích: CD25+ (hình vuông màu ghi); CD69+ (hình tam giác màu ghi), PD-1+ (hình tam giác màu trắng); Tim-3+ (hình vuông màu trắng). Đếm số lượng tế bào T qua chỉ thị CD4 và chỉ thị CD8, thay vì CD3 tiêu chuẩn, để loại trừ sự gây nhiễu có thể có đến DART-A. Khi đuôi dài được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc vào Ngày 1, tiếp đó là 4 lần truyền hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (Nhóm 1) hoặc DART-A được sử dụng bằng cách truyền hằng tuần trong 4 ngày/tuần bắt đầu vào các Ngày 8, 15, 22, và 29 (Nhóm 5) hoặc bằng cách truyền trong 7 ngày/1 tuần trong 4 tuần bắt đầu vào Ngày 8 (Nhóm 6). Khoảng

cách điều trị được chỉ ra bằng các thanh đặc màu ghi. Hình vẽ thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SEM của giá trị tuyệt đối của tổng số lượng tế bào T trong máu theo ngày nghiên cứu và nhóm (từ Fig.31A đến Fig.31C). Hình vẽ thể hiện các giá trị tương đối (% trung bình $\pm$ SEM) của CD25+, CD69+, PD-1+ và Tim-3+ của các tế bào T CD4 (từ Fig.31D đến Fig.31E) hoặc các tế bào T CD8 (từ Fig.31F đến Fig.31H) theo ngày nghiên cứu và theo nhóm.

Fig.32A đến Fig.32F thể hiện các thay đổi quan sát được ở quần thể tế bào T CD4+ (từ Fig.32A đến Fig.32C) và quần thể tế bào T CD8+ (từ Fig.32D đến Fig.32F) trong và sau khi truyền DART-A liên tục 7 ngày. Hình vẽ thể hiện giá trị phần trăm trung bình $\pm$ SEM của CD25+, CD69+, PD-1+ và Tim-3+ trên các tế bào T CD4 (từ Fig.32A đến Fig.32C) hoặc các tế bào T CD8 (từ Fig.32D đến Fig.32F) theo ngày nghiên cứu đối với các Nhóm 2, 3 và 4. Khoảng cách điều trị được chỉ ra bằng các thanh đặc màu ghi. Chú thích: CD25+ (hình vuông màu ghi); CD69+ (hình tam giác màu ghi), PD-1+ (hình tam giác màu trắng); Tim-3+ (hình vuông màu trắng).

Fig.33A đến Fig.33F thể hiện các thay đổi quan sát được ở quần thể tế bào T CD4+ (từ Fig.33A đến Fig.33C) và quần thể tế bào T CD8+ (từ Fig.33D đến Fig.33F) trong và sau khi truyền DART-A liên tục 7 ngày. Hình vẽ thể hiện giá trị phần trăm trung bình $\pm$ SEM của các tế bào T CD4+ chưa qua thí nghiệm (CD95-/CD28+), các tế bào T CMT (CD95+/CD28+), và các tế bào T EMT (CD95+/CD28-) trong quần thể CD4+ (từ Fig.33A đến Fig.33C) hoặc quần thể CD8 (từ Fig.33D đến Fig.33F) theo ngày nghiên cứu đối với các Nhóm 2, 3 và 4. Khi đuôi dài được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc vào Ngày 1, tiếp đó là 4 lần truyền hằng tuần hoặc DART-A được sử dụng bằng cách truyền hằng tuần trong 4 ngày/tuần bắt đầu vào Ngày 8, 15, 22, và 29 (các Nhóm từ 2 đến 4). Khoảng cách điều trị được chỉ ra bằng các thanh đặc màu ghi. Chú thích: tế bào chưa qua thí nghiệm (hình tam giác màu trắng); CMT (hình tam giác màu đen), EMT (hình vuông màu ghi).

Fig.34 thể hiện tính gây độc tế bào điều tiết bởi DART-A kháng các tế bào Kasumi-3 với các PBMC từ khi chưa qua thí nghiệm hoặc khi được điều trị bằng DART-A với nhiều lần truyền.

Fig.35A đến Fig.35F thể hiện rằng sự phơi nhiễm DART-A làm tăng tần suất tương đối của các tế bào CD4 ghi nhớ trung ương và các tế bào ghi nhớ tác động

CD8+ khi sử dụng quần thể tế bào T chưa qua thí nghiệm tương ứng. Hình vẽ này thể hiện giá trị phần trăm trung bình $\pm$ SEM của các tế bào T chưa qua thí nghiệm CD4+ (CD95-/CD28+), CMT (CD95+/CD28+), và EMT (CD95+/CD28-) ở quần thể CD4+ (từ Fig.35A đến Fig.35C) hoặc ở quần thể CD8+ (từ Fig.35D đến Fig.35F) theo ngày nghiên cứu và theo Nhóm. Khi đuôi dài được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc vào Ngày 1, tiếp đó là 4 lần truyền hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (Nhóm 1) hoặc DART-A được sử dụng bằng cách truyền hằng tuần trong 4 ngày/tuần bắt đầu vào các Ngày 8, 15, 22, và 29 (Nhóm 5) hoặc bằng cách truyền 7 ngày/tuần trong 4 tuần bắt đầu vào Ngày 8 (Nhóm 6). Khoảng cách điều trị được chỉ ra bằng các thanh đặc màu ghi. Chú thích: tế bào chưa qua thí nghiệm (hình tam giác màu trắng); CMT (hình tam giác màu đen), EMT (hình vuông màu ghi).

Fig.36A đến Fig.36F thể hiện tác dụng của DART-A đến các thông số hồng cầu ở khi đã truyền các phân tử này. Các hình vẽ này thể hiện nồng độ trong máu của hồng cầu (RBC) (từ Fig.36A đến Fig.36C) hoặc hồng cầu lưới (từ Fig.36D đến Fig.36F) (giá trị trung bình $\pm$ SEM) trong các mẫu được lấy ở thời điểm chỉ định từ khi được điều trị bằng DART-A.

Fig.37A đến Fig.37B thể hiện rằng tần suất (giá trị phần trăm trung bình $\pm$ SEM) của các tế bào CD123+ (Fig.37A) hoặc HSC (các tế bào CD34+/CD38-/CD45-/CD90+) (Fig.37B) trong quần thể tế bào Lin ở các mẫu tủy xương được lấy ở thời điểm chỉ định từ khi được điều trị bằng DART-A. Khi đuôi dài được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc vào Ngày 1, tiếp đó là 4 lần truyền hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (Nhóm 1) hoặc DART-A được sử dụng bằng cách truyền hằng tuần trong 4 ngày/tuần bắt đầu vào các Ngày 8, 15, 22, và 29 (các Nhóm từ 2 đến 5) hoặc bằng cách truyền trong 7 ngày/tuần trong 4 tuần bắt đầu vào Ngày 8 (Nhóm 6).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có khả năng liên kết đồng thời với CD123 và CD3, và đề cập đến việc ứng dụng của các phân tử này trong điều trị các bệnh ác tính liên quan đến máu. Mặc dù các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 không được làm tối ưu trình tự có đầy đủ chức năng, tương đương với các cải tiến về sự biểu hiện gen thu được thông qua việc tối ưu hoá codon (xem tài liệu, ví dụ, "Preferential Codon Usage In

Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy and The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes" *Gene* 18(3):199-209) (1982) của Grosjean, H. et al., nhưng vẫn có thể tăng cường hơn nữa độ ổn định và/hoặc chức năng của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 bằng cách cải biến hoặc cải tiến hơn nữa các trình tự của chúng.

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được ưu tiên theo sáng chế bao gồm ít nhất hai chuỗi polypeptit mà kết hợp với nhau để tạo thành một vị trí liên kết đặc hiệu đối với epitop của CD123 và một vị trí liên kết đặc hiệu đối với epitop của CD3 (Fig.2). Các chuỗi polypeptit riêng lẻ của kháng thể đôi này được liên kết cộng hoá trị với nhau, ví dụ bằng cách liên kết disulfua các gốc xystein nằm trong mỗi chuỗi polypeptit đó. Mỗi chuỗi polypeptit này chứa miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ, miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng và miền heterodime hoá. Peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1) phân cách miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ với miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng. Miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ thuộc chuỗi polypeptit thứ nhất tương tác với miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng thuộc chuỗi polypeptit thứ hai để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên chức năng thứ nhất đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là, CD123 hoặc CD3). Tương tự, miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ thuộc chuỗi polypeptit thứ hai tương tác với miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng thuộc chuỗi polypeptit thứ nhất để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên chức năng thứ hai đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai (có nghĩa là, CD123 hoặc CD3, tùy thuộc vào việc kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên nào). Do đó, việc chọn lọc miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng của chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai được phối hợp, sao cho hai chuỗi polypeptit này cùng bao gồm các miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng có khả năng liên kết với CD123 và CD3.

Sự tạo thành các heterodime của chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai có thể được điều khiển bởi các miền heterodime hoá. Các miền này bao gồm GVEPKSC (SEQ ID NO:50) (hoặc VEPKSC; SEQ ID NO:51) trên một chuỗi polypeptit và GFNRGEC (SEQ ID NO:52) (hoặc FNRGEC; SEQ ID NO:53) trên

chuỗi polypeptit còn lại (US2007/0004909). Theo cách khác, các miền này có thể được xử lý kỹ thuật để chứa các vòng xoắn tích điện trái dấu. Miền heterodime hoá của một trong số hai chuỗi polypeptit này bao gồm trình tự có ít nhất 6, ít nhất 7 hoặc ít nhất 8 axit amin tích điện dương, và miền heterodime hoá của chuỗi còn lại trong số hai chuỗi polypeptit đó bao gồm trình tự có ít nhất 6, ít nhất 7 hoặc ít nhất 8 axit amin tích điện âm. Ví dụ, miền heterodime hoá thứ nhất hoặc miền heterodime hoá thứ hai tốt hơn là bao gồm trình tự có 8 axit amin tích điện dương và miền còn lại trong số các miền heterodime này tốt hơn là bao gồm trình tự có 8 axit amin tích điện âm. Axit amin tích điện dương có thể lysin, arginin, histidin, v.v. và/hoặc axit amin tích điện âm có thể là axit glutamic, axit aspartic, v.v. Axit amin tích điện dương tốt hơn là lysin và/hoặc axit amin tích điện âm tốt hơn là axit glutamic.

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 theo sáng chế được xử lý kỹ thuật sao cho chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai liên kết cộng hoá trị với nhau qua các gốc xystein dọc theo chiều dài của chúng. Các gốc xystein này có thể được đưa vào tác nhân liên kết can thiệp mà phân cách miền VL và miền VH của các polypeptit đó. Theo cách khác, và tốt hơn nữa là, peptit thứ hai (tác nhân liên kết 2) được đưa vào mỗi chuỗi polypeptit, ví dụ, ở đầu tận amino các chuỗi polypeptit hoặc vị trí đặt tác nhân liên kết 2 giữa miền heterodime hoá và miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc miền biến đổi chuỗi nặng.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế còn có miền Fc của globulin miễn dịch hoặc miền liên kết albumin để kéo dài thời gian bán thải *in vivo*.

Các kháng thể đôi đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3 theo sáng chế mà bao gồm miền Fc của globulin miễn dịch (có nghĩa là, các kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép CD123 x CD3) bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất, chuỗi polypeptit thứ hai và chuỗi polypeptit thứ ba. Chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai kết hợp với nhau để tạo thành một vị trí liên kết đặc hiệu đối với epitop của CD123 và một vị trí liên kết đặc hiệu đối với epitop của CD3. Chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ ba kết hợp với nhau để tạo thành miền Fc của globulin miễn dịch (Fig.3A và Fig.3B). Chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai của kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép được liên kết cộng hoá trị với nhau, ví dụ, bằng cách liên kết disulfua các gốc xystein nằm trong mỗi chuỗi polypeptit đó.

Chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ ba được liên kết cộng hoá trị với nhau, ví dụ, bằng cách liên kết disulfua các gốc xystein nằm trong mỗi chuỗi polypeptit. Mỗi trong số chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai này chứa miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ, miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng và miền heterodime hoá. Peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1) phân cách miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ với miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng. Miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ thuộc chuỗi polypeptit thứ nhất tương tác với miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng thuộc chuỗi polypeptit thứ hai để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên chức năng thứ nhất đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là, CD123 hoặc CD3). Tương tự, miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ thuộc chuỗi polypeptit thứ hai tương tác với miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng thuộc chuỗi polypeptit thứ nhất để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên chức năng thứ hai đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai (có nghĩa là, CD3 hoặc CD123, tùy thuộc vào việc kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên nào). Do đó, việc chọn lọc miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng của chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai được phối hợp, sao cho hai chuỗi polypeptit này cùng bao gồm các miền liên kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng có khả năng liên kết với CD123 và CD3. Mỗi trong số chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ ba chứa một phần hoặc toàn bộ miền CH2 và/hoặc một phần hoặc toàn bộ miền CH3 của miền Fc globulin miễn dịch toàn vẹn và peptit chứa xystein. Một phần hoặc toàn bộ miền CH2 và/hoặc một phần hoặc toàn bộ miền CH3 kết hợp để tạo thành miền Fc globulin miễn dịch của các kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép theo sáng chế. Chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ ba của các kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép theo sáng chế được liên kết cộng hoá trị với nhau, ví dụ, bằng cách liên kết disulfua các gốc xystein nằm trong peptit chứa xystein của các chuỗi polypeptit đó.

I. Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự, “DART-A”

Sáng chế đề cập đến kháng thể đôi đặc hiệu kép được làm tối ưu trình tự có khả năng liên kết đồng thời và đặc hiệu với một epitop của CD123 và với một epitop của CD3 (kháng thể đôi đặc hiệu kép “CD123 x CD3” hoặc DART-A). Như đề cập dưới

đây, DART-A được xác định là có hoạt tính chức năng tăng cường so với các kháng thể đôi đặc hiệu kép không được làm tối ưu trình tự CD123 x CD3 khác có hợp phần tương tự, và do đó được gọi là kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 “được làm tối ưu trình tự”.

Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai. Chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể đôi đặc hiệu kép này bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1), miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}), và đầu tận C. Trình tự ưu tiên đối với miền VL_{CD3} là SEQ ID NO:21:

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

Miền liên kết kháng nguyên của VL_{CD3} bao gồm CDR1 SEQ ID NO:38: RSSTGAVTTSNYAN, CDR2 SEQ ID NO:39: GTNKRAP, và CDR3 SEQ ID NO:40: ALWYSNLWV.

Trình tự ưu tiên đối với tác nhân liên kết 1 là SEQ ID NO:29: GGGSGGGG. Trình tự ưu tiên đối với miền VH_{CD123} là SEQ ID NO:26:

EVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNGAT
FYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGTLV
TVSS

Miền liên kết kháng nguyên của VH_{CD123} bao gồm CDR1 SEQ ID NO:47: DYYMK, CDR2 SEQ ID NO:48: DIIPSNGATFYNQKFKG, và CDR3 SEQ ID NO:49: SHLLRAS.

Chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}), peptit liên kết can thiệp (ví dụ, tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}), và đầu tận C. Trình tự ưu tiên đối với miền VL_{CD123} là SEQ ID NO:25:

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPELLIYWAS
TRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGGGTGLEIK

Miền liên kết kháng nguyên của VL_{CD123} bao gồm CDR1 SEQ ID NO:44: KSSQSLNLSGNQKNYLT, CDR2 SEQ ID NO:45: WASTRES, và CDR3 SEQ ID NO:46: QNDYSYPYT.

Trình tự ưu tiên đối với miền VH_{CD3} là SEQ ID NO:22:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLVTVSS

Miền liên kết kháng nguyên của VH_{CD3} bao gồm CDR1 SEQ ID NO:41: TYAMN,, CDR2 SEQ ID NO:42: RIRSKYNNYATYYADSVKD, và CDR3 SEQ ID NO:43: HGNGFGNSYVSWFAY.

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế được xử lý kỹ thuật sao cho polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai liên kết cộng hoá trị với nhau qua các gốc xystein dọc theo chiều dài của chúng. Các gốc xystein này có thể được đưa vào tác nhân liên kết can thiệp (ví dụ, tác nhân liên kết 1) mà phân cách miền VL và miền VH của các polypeptit đó. Theo cách khác, và tốt hơn nữa là, peptit thứ hai (tác nhân liên kết 2) được đưa vào mỗi chuỗi polypeptit, ví dụ, ở vị trí đầu tận N vào miền VL hoặc đầu tận C vào miền VH của chuỗi polypeptit này. Trình tự ưu tiên đối với tác nhân liên kết 2 là SEQ ID NO:30: GGCGGG.

Sự tạo thành các heterodime có thể được điều khiển bằng cách xử lý kỹ thuật các chuỗi polypeptit đó để chứa các vòng xoắn polypeptit tích điện trái dấu. Do đó, theo một phương án được ưu tiên, một trong các chuỗi polypeptit này được xử lý kỹ thuật để chứa miền “vòng xoắn E” (SEQ ID NO:34: EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK) có các gốc tạo ra điện tích âm ở độ pH = 7, trong khi chuỗi còn lại trong số hai chuỗi polypeptit đó được xử lý kỹ thuật để chứa miền “vòng xoắn K” (SEQ ID NO:35: KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE) có các gốc tạo ra điện tích dương ở độ pH = 7. Sự có mặt của các miền tích điện này thúc đẩy sự kết hợp giữa polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, và do đó tạo điều kiện cho việc heterodime hoá.

Không quan trọng việc vòng xoắn nào được tạo ra cho chuỗi polypeptit thứ nhất hay chuỗi polypeptit thứ hai. Tuy nhiên, kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự được ưu tiên theo sáng chế (“DART-A”) có chuỗi polypeptit thứ nhất có trình tự (SEQ ID NO:1):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
 WTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGG
 GGEVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNG
 ATFYNQFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGT
 LVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Chuỗi 1 của DART-A bao gồm: SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID
 NO:26 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:34. Polynucleotit mã hoá chuỗi 1 của DART-
 A là SEQ ID NO:2:

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccc
 tgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgca
 gcagaagccaggacaggcaccaagggcctgatcggggtacaaacaaaagggtccc
 tggacccctgcacggttttctggaagtctgctggcggaaggccgctctgactatta
 ccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatct
 gtgggtgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggggggtggatccggcggc
 ggaggcgaggtgcagctggtgcagtcgggggtgagctgaagaaacccggagcttcg
 tgaaggtgtcttgcaaagccagtggtcacaccttcacagactactatatgaagtgggt
 caggcaggctccaggacagggactggaatggatcggcgatattccttccaacggg
 gccactttctacaatcagaagtttaaaggcaggggtgactattaccgtggacaaatcaa
 caagcactgcttatatggagctgagctccctgcgctctgaagatacagccgtgtacta
 ttgtgctcggtcacacctgctgagagccagctggtttgcttattggggacagggcacc
 ctggtgacagtgctcttcggaggatgtggcggtggagaagtggccgcactggagaaag
 aggttgctgctttggagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgcagccctgga
 gaaa

Chuỗi polypeptit thứ hai của DART-A có trình tự (SEQ ID NO:3):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS
 TRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGG
 SGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRS
 KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSW
 FAYWGQGTTLTVSSGGCGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Chuỗi 2 của DART-A bao gồm: SEQ ID NO:25 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID
 NO:22 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:35. Polynucleotit mã hoá chuỗi 2 của DART-
 A là SEQ ID NO:4:

gacttcgtgatgacacagttctcctgatagctctggccgtgagttctgggggagcggtga
 ctatgtcttgcaagagctccagtcactgctgaacagcggaatcagaaaaactatct
 gacctggtaccagcagaagccaggccagccccctaaactgctgatctattgggtctcc
 accagggaatctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcacagatttta
 ccctgacaatttctagttctgcaggccgaggacgtggctgtgtactattgtcagaatga
 ttacagctatccctacactttcggccaggggaccaagctggaaattaaaggaggcgga
 tccggcgggcgaggcgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtccagcctg
 gagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgtat
 gaattgggtccgcccagggtccagggaaggggctggagtgggttggaaggatcaggtcc
 aagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaaggatagattcaccatct
 caagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgagga
 cacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattcttacgtgtcttg
 tttgcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtcttccggaggatgtggcggtg

gaaaagtggccgcactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaaggtcgccgcact
taaggaaaaggtcgcagccctgaaagag

Như đề cập dưới đây, kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) được xác định là có khả năng liên kết đồng thời với CD123 và CD3 như được dẫn dắt bởi các tế bào của người và của khỉ. Việc tạo ra DART-A được xác định là nhằm hoạt hoá tế bào T, điều tiết sự giảm tế bào non ác tính, điều khiển sự tăng trưởng tế bào T, cảm ứng sự hoạt hoá tế bào T và nhằm tiêu diệt định hướng lại đối với các tế bào ung thư đích.

II. Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 tương đương nhưng không được làm tối ưu trình tự, “DART-B”

DART-B là kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 không được làm tối ưu trình tự có cấu trúc tổng thể tương tự như DART-A. Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-B bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}), tác nhân liên kết can thiệp 2, miền vòng xoắn E, và đầu tận C.

Miền VL_{CD3} của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-B có trình tự (SEQ ID NO:23):

DIQLTQSPAISASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVP
YRFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

Miền VH_{CD123} của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-B có trình tự (SEQ ID NO:28):

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNGAT
FYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGTLLV
TVSS

Do đó, chuỗi 1 của DART-B bao gồm: SEQ ID NO:23 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:28 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:34. Trình tự của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-B là (SEQ ID NO:5):

DIQLTQSPAISASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVP
YRFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKGGGSGGGGQV
QLVQSGAELKKPGASVKVSKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNGATFY
NQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGTLLVTV
SSGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Polynucleotit mã hoá chuỗi 1 của DART-B là SEQ ID NO:6:

gacattcagctgacccagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtca
ccatgacctgcagagccagttcaagtgttaagtacatgaactggtaccagcagaagtc
aggcacctcccccaaaagatggatttatgacacatccaaagtggcttctggagtcctt
tatcgcttcagtggtcagtggtctgggacctcatactctctcacaatcagcagcatgg
aggctgaagatgctgccacttattactgccaacagtggagtagtaacccgctcacgtt
cgggtgctgggaccaagctggagctgaaaggaggcggtccggcgaggaggccaggtg
cagctggtgcagtcgggggctgagctgaagaaacccggagcttccgtgaaggtgtctt
gcaaagccagtggtacaccttcacagactactatatgaagtgggtcaggcaggctcc
aggacagggactggaatggatcggcgatatcattccttccaacggggccactttctac
aatcagaagtttaaaggcagggtgactattaccgtggacaaatcaacaagcactgctt
atatggagctgagctccctgcgctctgaagatacagccgtgtactattgtgctcggtc
acacctgctgagagccagctggtttgcttattggggacagggcaccctggtgacagtg
tcttccggaggatgtggcggtggagaagtggccgactggagaaagaggttgctgctt
tgagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgagccctggagaaa

Chuỗi polypeptit thứ hai của DART-B bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1) và miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}), tác nhân liên kết can thiệp 2, miền vòng xoắn K, và đầu tận C.

Miền VL_{CD123} của chuỗi polypeptit thứ hai của DART-B có trình tự (SEQ ID NO:27):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK

Miền VH_{CD3} của chuỗi polypeptit thứ hai của DART-B có trình tự (SEQ ID NO:24):

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYT
NYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT
VSS

Do đó, chuỗi 2 của DART-B bao gồm: SEQ ID NO:27 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:24 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:35. Trình tự chuỗi polypeptit thứ hai của DART-B là (SEQ ID NO:7):

DFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGG
SGGGGDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP
SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ
GTTTLTVSSGGCGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Polynucleotit mã hoá chuỗi 2 của DART-B là SEQ ID NO:8:

gacttcgtgatgacacagctctcctgatagctctggccgtgagctctgggggagcgggtga
ctatgtcttgcaagagctcccagtcactgctgaacagcggaatcagaaaaactatct
gacctggtaccagcagaagccaggccagccccctaaactgctgatctattgggcttcc
accagggaatctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcacagatttta

ccctgacaatttctagctctgcaggccgaggacgtggctgtgtactattgtcagaatga
 ttacagctatccctacacttttcggccaggggaccaagctggaaattaaaggaggcgga
 tccggcggcggaggcgatatcaaactgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctg
 gggcctcagtgaagatgtcctgcaagacttctggctacacctttactaggtacacgat
 gcaactgggtaaaacagaggcctggacagggctctggaatggattggatacattaatcct
 agccgtgggttataactaattacaatcagaagttcaaggacaaggccacattgactacag
 acaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgc
 agtctattactgtgcaagatattatgatgatcattactgccttgactactggggccaa
 ggcaccactctcacagtctcctccggaggatgtggcggtggaaaagtggccgcactga
 aggagaaagttgctgctttgaaagagaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgcagc
 cctgaaagag

III. Các biến thể được cải biến của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A)

A. Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền liên kết albumin (DART-A có ABD “w/ABD”)

Theo phương án thứ hai của sáng chế, kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) bao gồm một hoặc nhiều miền liên kết albumin (“ABD”) (DART-A có ABD “w/ABD”) trên một hoặc cả hai chuỗi polypeptit của kháng thể đôi này.

Như được đề cập trong WO 2012/018687, để cải thiện các tính chất dược động học *in vivo* cho kháng thể đôi, thì các kháng thể đôi này có thể được cải biến để chứa đoạn polypeptit của protein liên kết huyết thanh ở một hoặc nhiều đầu tận của kháng thể đôi đó. Tốt nhất là, đoạn polypeptit của protein liên kết huyết thanh này được đặt ở đầu tận C của kháng thể đôi. Đoạn polypeptit của protein liên kết huyết thanh được đặc biệt ưu tiên cho mục đích này là miền liên kết albumin (ABD) từ protein G của liên cầu khuẩn. Miền liên kết albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng *Streptococcus* G148 được đặc biệt ưu tiên.

Miền liên kết albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng *Streptococcus* G148 bao gồm 46 gốc axit amin tạo thành bố ba vòng xoắn ổn định và có tính đặc hiệu liên kết albumin phổ rộng (“Structure, Specificity, and Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules”, J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120 (2002) của Johansson, M.U. et al.). Albumin là protein có nhiều nhất trong huyết tương và có thời gian bán thải ở người là 19 ngày. Albumin có một vài vị trí liên kết phân tử nhỏ cho phép nó liên kết không cộng hoá trị với các protein khác và nhờ đó kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh của nó.

Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự này có miền liên kết albumin chứa tác nhân liên kết thứ ba (tác nhân liên kết 3), tác nhân liên kết này phân cách vòng xoắn E (hoặc vòng xoắn K) của chuỗi polypeptit này với miền liên kết albumin. Trình tự ưu tiên đối với tác nhân liên kết 3 là SEQ ID NO:31: GGGG. Miền liên kết albumin (ABD) được ưu tiên có trình tự (SEQ ID NO:36): LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP.

Do đó, chuỗi thứ nhất được ưu tiên của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền liên kết albumin có trình tự (SEQ ID NO:9):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGG
GGEVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIPSNG
ATFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGSLAEAKVLANRELDK
YGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

Kháng thể đôi CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền liên kết albumin bao gồm: SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:26 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:34 — SEQ ID NO:31 — SEQ ID NO:36. Polynucleotit mã hoá kháng thể đôi CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền liên kết albumin này là SEQ ID NO:10:

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcgggaactgtgaccc
tgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacgccaattgggtgca
gcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcggggtacaaacaaaagggtccc
tggaacctgacaggttttctggaagtctgctgggaggaaaggccgctctgactatta
ccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatct
gtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgctgggaggggtggatccggcggc
ggaggcgaggtgcagctggtgcagtcgggggtgagctgaagaaaccggagcttcg
tgaaggtgtcttgcaaagccagtggtacaccttcacagactactatatgaagtgggt
caggcaggctccaggacagggactggaatggatcggcgatattccttccaacggg
gccactttctacaatcagaaggttaagggcagggtgactattaccgtggacaaatcaa
caagcactgcttatatggagctgagctccctgcgctctgaagatacagccgtgtacta
ttgtgctcggtcacacctgctgagagccagctgggtttgcttattggggacagggcacc
ctggtgacagtgtcttcggaggatgtggcggtggagaagtggcgactggagaaag
aggttgctgctttggagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgagccctgga
gaaaggcgcggtctctggccgaagcaaaagtgtggccaaccggaactggataaa
tatggcgtgagcgattattataagaacctgattgacaacgcaaaatccgcggaaggcg
tgaaagcactgattgatgaaattctggccgcctgcct

Chuỗi polypeptit thứ hai của kháng thể đôi CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền liên kết albumin này có trình tự nêu ở trên (SEQ ID NO:3) và được mã hoá bởi polynucleotit có trình tự của SEQ ID NO:4.

B. Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền Fc IgG (DART-A có Fc “w/Fc”)

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề cập đến kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự bao gồm ba chuỗi polypeptit và có miền Fc IgG (DART-A có Fc “w/Fc” phiên bản 1 và phiên bản 2) (Fig.3A-Fig.3B).

Để tạo ra miền Fc IgG này, chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ ba của kháng thể đôi chứa, từ đầu tận N đến đầu tận C, peptit chứa xystein, (tốt nhất là, peptit 1 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:55): DKTHTCPPCP), một phần hoặc toàn bộ miền CH2 và/hoặc một phần hoặc toàn bộ miền CH3 của miền Fc globulin miễn dịch toàn vẹn, và đầu tận C. Một phần hoặc toàn bộ miền CH2 và/hoặc một phần hoặc toàn bộ miền CH3 kết hợp để tạo thành miền Fc globulin miễn dịch của kháng thể đôi chứa miền Fc đơn trị đặc hiệu kép. Chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai của kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép theo sáng chế được liên kết cộng hoá trị với nhau, ví dụ, bằng cách liên kết disulfua các gốc xystein nằm trong peptit chứa xystein của các chuỗi polypeptit đó.

Các miền CH2 và/hoặc miền CH3 của polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ ba không nhất thiết phải giống nhau, và được cải biến một cách thuận lợi để tạo điều kiện cho việc tạo phức giữa hai polypeptit này. Ví dụ, cải biến thay thế axit amin (tốt hơn là thay thế bằng axit amin bao gồm nhóm mạch bên kích cỡ lớn tạo thành ‘khóa, ví dụ, tryptophan) có thể được đưa vào miền CH2 hoặc miền CH3 sao cho sự cản trở về mặt không gian sẽ ngăn chặn sự tương tác với miền được gây đột biến tương tự và sẽ bắt buộc miền được gây đột biến này cặp đôi với miền mà đột biến bù hoặc tương hợp đã được xử lý kỹ thuật trong đó, có nghĩa là, ‘ổ’ (ví dụ, thay thế bằng glyxin). Bộ các đột biến này có thể được xử lý kỹ thuật thành cặp polypeptit bất kỳ gồm phân tử kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép, và ngoài ra, được xử lý kỹ thuật thành đoạn bất kỳ của các chuỗi polypeptit của cặp nêu trên. Các phương pháp xử lý kỹ thuật cho protein để tạo thuận lợi cho việc heterodime hoá hơn so với homodime hoá là đã biết trong lĩnh vực này, cụ thể là xử lý kỹ thuật đối với các phân tử tương tự globulin miễn dịch, và được bao hàm trong bản mô tả này (xem tài liệu, ví dụ, “‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization”, Protein Engr. 9:617-621 (1996) của Ridgway et al., “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain

Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library”, J. Mol. Biol. 270: 26-35 (1997) của Atwell et al., và “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression and Tumor Cell Lysis”, J. Immunol. Methods 296:95-101 (2005) của Xie et al.; được viện dẫn ở đây để tham khảo). Tốt hơn là, ‘khoá’ được xử lý kỹ thuật thành các miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất và ‘ổ’ được xử lý kỹ thuật thành các miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ ba. Do đó, ‘khoá’ này sẽ giúp ngăn chặn việc chuỗi polypeptit thứ nhất homodime hoá thông qua miền CH2 và/hoặc miền CH3 của nó. Do chuỗi polypeptit thứ ba tốt hơn là chứa cải biến thay thế ‘ổ’ nên nó sẽ heterodime hoá với chuỗi polypeptit thứ nhất cũng như là homodime hoá với chính nó. Khoá ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến miền Fc IgG nguyên thuỷ để chứa cải biến T366W. Ổ ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến miền Fc IgG nguyên thuỷ để chứa các cải biến T366S, L368A và Y407V. Để hỗ trợ việc tinh chế homodime chuỗi polypeptit thứ ba ra khỏi kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép thành phẩm bao gồm các chuỗi polypeptit thứ nhất, thứ hai và thứ ba, thì vị trí liên kết protein A của miền CH2 và miền CH3 của chuỗi polypeptit thứ ba tốt hơn là được đột biến bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 435 (H435R). Do đó, homodime chuỗi polypeptit thứ ba sẽ không liên kết protein A, trong khi đó kháng thể đôi Fc đơn trị đặc hiệu kép vẫn giữ được khả năng liên kết protein A thông qua vị trí liên kết protein A trên chuỗi polypeptit thứ nhất.

Trình tự ưu tiên đối với miền CH2 và CH3 của miền Fc kháng thể có mặt trong chuỗi polypeptit thứ nhất là (SEQ ID NO:56):

```
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Trình tự ưu tiên đối với miền CH2 và CH3 của miền Fc kháng thể có mặt trong chuỗi polypeptit thứ ba là (SEQ ID NO:11):

```
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYITLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
```

C. Cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1

Để minh hoạ cho các kháng thể đôi Fc này, sáng chế đề cập đến cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1. Polypeptide thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên

bản 1 bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}), tác nhân liên kết 2, miền vòng xoắn E, tác nhân liên kết 5, peptit 1, polypeptit chứa miền CH2 và miền CH3 của miền Fc và đầu tận C. Tác nhân liên kết 5 được ưu tiên có trình tự (SEQ ID NO:32): GGG. Polypeptit được ưu tiên chứa miền CH2 và miền CH3 của miền Fc có trình tự (SEQ ID NO:37):

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Do đó, polypeptit thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1 bao gồm:
SEQ ID NO:25 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:22 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID
NO:34 — SEQ ID NO:32 — SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:37.

Trình tự được ưu tiên của polypeptit thứ nhất thuộc cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1 này có trình tự (SEQ ID NO:13):

DFVMTQSPDLSAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGG
SGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRS
KYNMYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSW
FAYWGQGTLLTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCP
PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Polynucleotit được ưu tiên mã hoá polypeptit này là (SEQ ID NO:14):

gacttcgtgatgacacagtcctcctgatagtcctggccgtgagtcctgggggagcggtga
ctatgtccttgcaagagctcccagtcactgctgaacagcggaatcagaaaaactatct
gacctgggtaccagcagaagccagggccagccccctaaactgctgatctattgggcttcc
accagggaatctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggcacagatttta
ccctgacaatttctagtcctgcaggccgaggacgtggctgtgtactattgtcagaatga
ttacagctatccctacactttcggccaggggaccaagctggaaattaaaggaggcgga
tccggcgggcgaggcgaggtgcagctgggtggagtcctgggggaggcttggtccagcctg
gagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgtat
gaattgggtccgcccaggtccaggggaaggggctggagtggttggaaggatcaggtcc
aagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaaggatagattcaccatct
caagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgagga
cacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattcttacgtgtccttg
tttgcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtcttccggaggatgtggcggtg
gagaagtggccgactggagaaagaggttgctgcttgggagaaggaggtcgctgcact
tgaaaaggaggtcgagccctggagaaaggcgggcgaggacaaaactcacacatgccca
ccgtgcccgacacctgaagccgcggggggaccgtcagtccttcttcccccccaaac

ccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgt
 gagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat
 aatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg
 tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
 caacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc
 cgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg
 tcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga
 gagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac
 ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagag
 cctctccctgtctccgggtaaa

Chuỗi thứ hai của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1 bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}), tác nhân liên kết 2, miền vòng xoắn K, và đầu tận C. Do đó, polypeptit thứ hai của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1 này bao gồm: SEQ ID NO:21 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:26 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:35. Polypeptit này có trình tự (SEQ ID NO:15):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
 WTPARFSGSLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYNSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGG
 GGEVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMKWVRQAPGQGLEWIGDIIIPSNQ
 ATFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHLLRASWFAYWGQGT
 LVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Polynucleotit được ưu tiên mã hoá polypeptit này có trình tự (SEQ ID NO:16):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccc
 tgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgca
 gcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcgggggtacaaacaaaagggctccc
 tggacccctgcacgggttttctggaagtctgctggcggaagggcgctctgactatta
 ccgggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatct
 gtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgctgggaggggtggatccggcgggc
 ggaggcgaggtgcagctggtgcagtcgggggctgagctgaagaaaccggagcttcgg
 tgaaggtgtcttgcaaagccagtggtacaccttcacagactactatatgaagtgggt
 caggcaggctccaggacagggactggaatggatcgggcgatatcattccttccaacggg
 gccactttctacaatcagaagtttaagggcagggtgactattaccgtggacaaatcaa
 caagcactgcttatatggagctgagctccctgcgctctgaagatacagccgtgtacta
 ttgtgctcggtcacacctgctgagagccagctggtttgcttattggggacagggcacc
 ctggtgacagtgcttccggaggatgtggcggtggaaaagtggccgcactgaaggaga
 aagttgctgctttgaaagagaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgagccctgaa
 agag

Chuỗi polypeptit thứ ba của DART-A w/Fc phiên bản 1 này sẽ bao gồm miền CH2 và miền CH3 của miền Fc IgG. Polypeptit được ưu tiên bao gồm peptit 1 (SEQ ID NO:55) và miền CH2 và miền CH3 của miền Fc (SEQ ID NO:11) và có trình tự của SEQ ID NO:54:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLVSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

Polynucleotit được ưu tiên mã hoá polypeptit này có trình tự (SEQ ID NO:12):

gacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggaccgtcag
tcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggt
cacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtac
gtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaa
ggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatc
tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatccccggg
aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgagttgcgagtcgcaaggcttctatcccag
cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacg
cctcccgctgctggactccgacggctccttcttctcctcgtcagcaagctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
caaccgctacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa

D. Cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 2

Là ví dụ thứ hai về kháng thể đôi DART-A w/Fc, sáng chế đề cập đến kháng thể đôi ba chuỗi, “Kháng thể đôi DART-A w/Fc phiên bản 2” (Fig.3B).

Polypeptit thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 2 này bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, peptit liên kết (peptit 1), polypeptit chứa miền CH2 và miền CH3 của miền Fc đã được liên kết (thông qua tác nhân liên kết 4) với miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}), tác nhân liên kết 2, miền vòng xoắn K, và đầu tận C.

Polypeptit được ưu tiên chứa miền CH2 và miền CH3 của miền Fc có trình tự (SEQ ID NO:37):

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

“Tác nhân liên kết 4” tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin (SEQ ID NO:57):

APSSS. “Tác nhân liên kết 4” được ưu tiên có trình tự (SEQ ID NO:33): APSSSPME.

Do đó, polypeptit thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 2 này bao gồm: SEQ ID NO:55 — SEQ ID NO:37 — SEQ ID NO:33 — SEQ ID NO:25 — SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:22 — SEQ ID NO:30 — SEQ ID NO:35. Polypeptit này có trình tự (SEQ ID NO:17):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPSSS
 PMEDFVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIY
 WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK
 GGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGR
 IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY
 VSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Polynucleotit được ưu tiên mã hoá polypeptit này có trình tự (SEQ ID NO:18):

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcggggggaccgtcag
 tcttcctcctccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggt
 cacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtac
 gtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaa
 ggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatc
 tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggg
 aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgctggtcaaaggcttctatcccag
 cgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
 cctcccggtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtccttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaagcccttccagctcc
 cctatggaagacttcgtgatgacacagctctcctgatagctggccgtgagctctgggg
 agcgggtgactatgtccttgcaagagctcccagtcactgctgaacagcggaaatcagaa
 aaactatctgacctggtaccagcagaagccaggccagccccctaaactgctgatctat
 tgggcttccaccagggaatctggcgtgcccagacagattcagcggcagcggcagcggca
 cagattttaccctgacaatttctagtctgcaggccgaggacgtgggtgtgtactattg
 tcagaatgattacagctatccctacactttcggccaggggaccaagctggaaattaaa
 ggaggcggatccggcggcggaggcgaggtgcagctgggtggagctctgggggaggcttgg
 tccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcac
 atacgctatgaattgggtccgccaggtccaggggaaggggctggagtggttggaaagg
 atcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaaggatagat
 tcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaa
 aaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattcttac
 gtgtccttggtttgcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtcttccggaggat
 gtggcgggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaaggt
 cgccgcacttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag

Chuỗi polypeptit thứ hai của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 2 này bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1) và miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}). Đoạn này của phân tử được liên kết (thông qua tác nhân liên kết 2) với miền vòng xoắn E. Do đó, polypeptit thứ ba của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 2 này bao gồm: SEQ ID NO:21 – SEQ ID NO:29 – SEQ ID NO:26 – SEQ ID NO:30 – SEQ ID NO:34. Polypeptide có trình tự như vậy là (SEQ ID NO:1), và tốt hơn là được mã hoá bởi polynucleotit có trình tự của SEQ ID NO:2.

Chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm miền CH2 và miền CH3 của miền Fc IgG. Polypeptit được ưu tiên bao gồm peptit 1 (SEQ ID NO:55) và miền CH2 và miền CH3 của miền Fc (SEQ ID NO:11) và có trình tự của SEQ ID NO:54.

Để đánh giá hoạt tính của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 (DART-A, DART-A w/ABD, DART-A w/Fc, DART-B) nêu trên, kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) được tạo ra. DART đối chứng có khả năng liên kết đồng thời với FITC và CD3. Hai chuỗi polypeptit của phân tử này có trình tự tương ứng dưới đây:

Chuỗi 1 của DART đối chứng (SEQ ID NO:19):

DVVMQTQTPFSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYL RWYLQKPGQSPKVLIIYKVS N
RFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKGGGS
GGGGEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWF
AYWGQGT LVTVSSGGCGGGEVA ALEKEVA ALEKEVA ALEKEVA ALEK

Chuỗi 2 của DART đối chứng (SEQ ID NO:20):

QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP
WTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGG
GGEVKLDETGGGLVQPGRPMLKSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKP
NYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT
TVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

IV. Dược phẩm

Các chế phẩm theo sáng chế bao gồm chế phẩm thuốc bán thành phẩm hữu ích để sản xuất dược phẩm (ví dụ, chế phẩm chưa tinh khiết hoặc không vô khuẩn) và các dược phẩm (có nghĩa là, chế phẩm thích hợp để sử dụng cho một đối tượng hoặc bệnh nhân) mà có thể được sử dụng để pha chế các dạng phân liều đơn vị. Các chế phẩm này bao gồm lượng hữu hiệu cho tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế, hoặc tổ hợp của các chất này và chất mang dược dụng. Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế bao gồm lượng hữu hiệu cho tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế và chất mang dược dụng.

Sáng chế còn bao gồm các dược phẩm chứa kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế, và kháng thể trị liệu thứ hai (ví dụ,

kháng thể đơn dòng đặc hiệu khối u) mà đặc hiệu đối với kháng nguyên bệnh ung thư cụ thể, và chất mang được dùng.

Theo một phương án cụ thể, thuật ngữ “được dùng” nghĩa là được phê chuẩn bởi cơ quan quản lý Liên bang hoặc Bang hoặc được đề cập trong Dược điển Mỹ hoặc các dược điển được thừa nhận khác để sử dụng ở động vật, và cụ thể hơn là ở người. Thuật ngữ “chất mang” chỉ chất pha loãng, chất phụ trợ (ví dụ, chất phụ trợ Freund (hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh), tá dược, hoặc chất dẫn thuốc mà thuốc được dùng cùng với chất này. Các chất mang dược phẩm có thể là chất lỏng vô khuẩn, như là nước và dầu, bao gồm dầu có nguồn gốc dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc tổng hợp, như là dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, dầu vừng, và dầu tương tự. Nước là chất mang được ưu tiên khi dược phẩm được sử dụng qua đường tĩnh mạch. Dung dịch nước muối và dextroza trong nước và dung dịch glyxerol cũng có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, đặc biệt là đối với các dung dịch để tiêm. Các tá dược dược phẩm thích hợp bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mì, bột phần, silica gel, natri stearat, glyxerol monostearat, bột talc, natri clorua, bột sữa không kem, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và chất tương tự. Chế phẩm, nếu muốn, cũng có thể chứa chất thẩm ướt hoặc chất nhũ hoá, hoặc chất đệm pH với các lượng nhỏ. Các chế phẩm này có thể ở dạng dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, chế phẩm giải phóng kéo dài và dạng tương tự.

Nói chung, các thành phần của dược phẩm theo sáng chế được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn với nhau ở dạng phân liều đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột đông khô hoặc dạng cô đặc không chứa nước trong vật chứa kín như ống thuốc tiêm hoặc túi nhỏ chỉ rõ lượng hoạt chất. Trong trường hợp dược phẩm được sử dụng bằng cách truyền, thì dược phẩm đó có thể được cho dùng kèm theo chai truyền chứa nước hoặc nước muối bậc dược vô khuẩn. Trong trường hợp dược phẩm được sử dụng bằng cách tiêm, thì ống thuốc tiêm chứa nước hoặc nước muối vô khuẩn để tiêm có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi dùng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối dược dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các muối được tạo thành với anion như là các muối thu được từ axit clohydric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tarttric, v.v., và các muối tạo thành với cation như là các muối

thu được từ natri, kali, amoni, canxi, sắt hydroxit, isopropylamin, trietylamin, 2-ethylamino etanol, histidin, procain, v.v.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit hoặc gói dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều vật chứa chứa các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế một mình hoặc cùng với chất mang dược dụng. Hơn nữa, một hoặc nhiều chất phòng bệnh hoặc trị liệu hữu ích để điều trị bệnh cũng có thể được bao gồm trong bộ kit hoặc gói dược phẩm này. Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit hoặc gói dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều vật chứa chứa một hoặc nhiều thành phần của dược phẩm theo sáng chế. Tùy ý kết hợp với (các) vật chứa này có thể là tờ hướng dẫn sử dụng theo quy định của cơ quan quản lý việc sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán dược phẩm hoặc sinh phẩm, tờ hướng dẫn này thể hiện sự phê chuẩn của cơ sở sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán rằng sản phẩm đó thích hợp để sử dụng cho người.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit có thể được sử dụng theo các phương pháp nêu trên. Bộ kit này có thể bao gồm các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế. Bộ kit này còn có thể bao gồm một hoặc nhiều chất phòng bệnh và/hoặc trị liệu khác hữu ích để điều trị bệnh ung thư, trong một hoặc nhiều vật chứa; và/hoặc bộ kit này còn có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể gây độc tế bào liên kết một hoặc nhiều kháng nguyên ung thư có liên quan đến bệnh ung thư. Theo một số phương án nhất định, chất phòng bệnh hoặc trị liệu là chất hoá trị. Theo các phương án khác, chất phòng bệnh hoặc trị liệu là chất trị liệu sinh phẩm hoặc hormon.

V. Phương pháp sử dụng

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được đề xuất để điều trị, phòng ngừa, và cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc lây nhiễm bằng cách cho đối tượng dùng một lượng hữu hiệu của protein dung hợp hoặc phân tử đã được liên hợp theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa protein dung hợp hoặc phân tử đã được liên hợp theo sáng chế. Theo một khía cạnh được ưu tiên, các chế phẩm này về cơ bản là tinh khiết (có nghĩa là, về cơ bản không có những chất làm hạn chế tác dụng của chúng hoặc gây ra các tác dụng phụ không mong muốn). Theo một phương án cụ thể, đối tượng này là động vật, tốt hơn là động vật có vú như động vật không phải động vật linh trưởng (ví dụ, bò, ngựa, mèo, chó, động vật gặm nhấm, v.v.) hoặc động

vật linh trưởng (ví dụ, khỉ như là khỉ đuôi dài, người, v.v.). Theo một phương án được ưu tiên, đối tượng này là người.

Nhiều hệ phân phối đa dạng đã được biết đến và có thể được sử dụng để dùng các chế phẩm theo sáng chế, ví dụ, đóng nang trong các liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện kháng thể hoặc protein dung hợp, nhập nội bào qua trung gian thụ thể (xem tài liệu, ví dụ, “Receptor-Mediated *In Vitro* Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System”, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987) của Wu et al.), xây dựng cấu trúc cho axit nucleic như là một phần của vật truyền retrovirus hoặc vật truyền khác, v.v..

Các phương pháp sử dụng phân tử theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sử dụng ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, trong da, trong bắp cơ, trong phúc mạc, trong tĩnh mạch và dưới da), ngoài màng cứng, và niêm mạc (ví dụ, đường trong mũi và đường miệng). Theo một phương án cụ thể, các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế được sử dụng trong bắp cơ, trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Các chế phẩm có thể được sử dụng theo đường dùng thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm liều cao, bằng cách hấp thu qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc khu trú. Ngoài ra, phương pháp sử dụng qua đường phổi cũng có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách sử dụng dụng cụ xông hít hoặc xông khí dung, và bào chế với chất tạo sol khí. Xem tài liệu, ví dụ, các Patent Mỹ số 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; và 4880078; và các công bố đơn PCT số WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; và WO 99/66903, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế được đóng gói trong vật chứa kín như ống thuốc tiêm hoặc túi nhỏ chỉ rõ lượng phân tử đó. Theo một phương án, các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế được cung cấp dưới dạng bột đông khô vô khuẩn hoặc dạng cô đặc không chứa nước trong vật chứa kín và có thể được pha hoàn nguyên, ví dụ, với nước hoặc nước muối đến nồng độ thích hợp để dùng được cho đối tượng. Tốt hơn là, các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế được cung cấp dưới dạng bột đông khô vô khuẩn

trong vật chứa kín ở liều đơn vị ít nhất là 5 µg, tốt hơn nếu ít nhất là 10 µg, ít nhất là 15 µg, ít nhất là 25 µg, ít nhất là 50 µg, ít nhất là 100 µg, hoặc ít nhất là 200 µg.

Nên bảo quản các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự dạng đông khô theo sáng chế ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong vật chứa gốc của chúng và nên sử dụng các phân tử này trong vòng 12 giờ, tốt hơn là trong vòng 6 giờ, trong vòng 5 giờ, trong vòng 3 giờ, hoặc trong vòng 1 giờ sau khi pha hoàn nguyên. Theo một phương án khác, các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế được cung cấp dưới dạng lỏng trong vật chứa kín chỉ rõ khối lượng và nồng độ của phân tử, protein dung hợp, hoặc phân tử được liên hợp. Tốt hơn là, dạng lỏng của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế được cung cấp trong vật chứa kín, trong đó các phân tử có mặt ở nồng độ ít nhất là 1 µg/ml, tốt hơn nữa ít nhất là 2,5 µg/ml, ít nhất là 5 µg/ml, ít nhất là 10 µg/ml, ít nhất là 50 µg/ml, hoặc ít nhất là 100 µg/ml.

Liều lượng của chế phẩm theo sáng chế mà hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn bệnh có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Liều chính xác cần sử dụng trong chế phẩm này cũng tùy thuộc vào đường dùng, và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, và nên được quyết định theo cân nhắc của bác sĩ và tình trạng của từng bệnh nhân. Các liều dùng hữu hiệu có thể được ngoại suy từ các đường cong đáp ứng liều dùng thu được từ các hệ thử nghiệm mô hình *in vitro* hoặc động vật.

Đối với các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế, tốt hơn là liều lượng được sử dụng cho bệnh nhân được quyết định dựa trên khối lượng cơ thể (kg) của đối tượng dùng. Liều lượng được sử dụng thường nằm trong khoảng từ ít nhất 0,3 ng/kg/ngày đến 0,9 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 1 ng/kg/ngày đến 3 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 3 ng/kg/ngày đến 9 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 10 ng/kg/ngày đến 30 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 30 ng/kg/ngày đến 90 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 100 ng/kg/ngày đến 300 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 200 ng/kg/ngày đến 600 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 300 ng/kg/ngày đến 900 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 400 ng/kg/ngày đến 800 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 500 ng/kg/ngày đến 1000 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 600 ng/kg/ngày đến 1000 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 700 ng/kg/ngày đến 1000 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất

800 ng/kg/ngày đến 1000 ng/kg/ngày, khoảng từ ít nhất 900 ng/kg/ngày đến 1000 ng/kg/ngày, hoặc ít nhất là khoảng 1000 ng/kg/ngày.

Theo một phương án khác, bệnh nhân được cho dùng phác đồ điều trị gồm một hoặc nhiều liều dùng của các lượng hữu hiệu cho tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế, trong đó phác đồ điều trị này được sử dụng trong thời gian 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày hoặc 7 ngày. Theo một số phương án nhất định, phác đồ điều trị này bao gồm việc sử dụng cách quãng các liều dùng của các lượng hữu hiệu cho tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế (ví dụ, sử dụng một liều dùng vào Ngày 1, Ngày 2, Ngày 3 và Ngày 4 trong tuần và không sử dụng các liều dùng của lượng hữu hiệu cho tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế vào Ngày 5, Ngày 6 và Ngày 7 của tuần điều trị đó). Thông thường, có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều hơn 5 đợt điều trị. Mỗi đợt điều trị có thể là cùng một phác đồ hoặc các phác đồ khác nhau.

Theo một phương án khác, liều được sử dụng sẽ tăng dần trong một phần tư, một phần hai, hai phần ba hoặc ba phần tư của (các) phác đồ (ví dụ, trong các phác đồ thứ nhất, thứ hai, hoặc thứ ba khi điều trị 4 đợt) cho đến khi đạt được lượng hữu hiệu hằng ngày cho tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế.

Bảng 1 đề cập đến 5 ví dụ về các phác đồ liều dùng khác nhau nêu ở trên cho một đợt điều trị thông thường.

Bảng 1						
Phác đồ	Ngày	Liều lượng kháng thể đôi (ng kháng thể đôi/kg/ngày)				
1	1, 2, 3, 4	100	100	100	100	100
	5, 6, 7	0	0	0	0	0
2	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1000
	5, 6, 7	0	0	0	0	0
3	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1000
	5, 6, 7	0	0	0	0	0
4	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1000
	5, 6, 7	0	0	0	0	0

Liều lượng và tần suất sử dụng các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế có thể giảm đi hoặc thay đổi bằng cách tăng cường sự hấp thu và ngấm qua mô của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự đó bằng các cải biến như, ví dụ, lipit hoá.

Liều lượng của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế dùng cho một bệnh nhân có thể được tính toán để sử dụng dưới hình thức là liệu pháp đơn chất. Theo cách khác, các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế được sử dụng kết hợp với các chế phẩm trị liệu khác và liều lượng dùng cho bệnh nhân thấp hơn so với khi các phân tử này được sử dụng dưới hình thức là liệu pháp đơn chất.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng khu trú tại vị trí cần điều trị; việc này có thể có thể đạt được bằng cách, ví dụ, và không nhằm giới hạn sáng chế, truyền khu trú, tiêm, hoặc cấy, chế phẩm cấy có thể làm từ vật liệu xốp, không xốp hoặc dạng gelatin, bao gồm các màng, như màng sialastic, hoặc sợi. Tốt hơn là, khi sử dụng phân tử theo sáng chế thì cần lưu ý đến việc sử dụng các vật liệu mà phân tử này không hấp phụ.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được phân phối dưới dạng nang, cụ thể là liposom (xem tài liệu “New Methods Of Drug Delivery”, Science 249:1527-1533, (1990) của Langer; Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (biên tập), Liss, New York, trang 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, trang 317-327; của Treat et al.).

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được phân phối trong hệ giải phóng có kiểm soát hoặc hệ giải phóng kéo dài. Kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan có thể được sử dụng để sản xuất chế phẩm giải phóng kéo dài chứa một hoặc nhiều kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế. Xem tài liệu, ví dụ, Patent Mỹ số 4526938; Công bố đơn PCT số WO 91/05548; Công bố đơn PCT số WO 96/20698; “Intratatumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel”, Radiotherapy & Oncology 39:179-189, (1996) của Ning et al.; “Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions”, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, (1995) của Song et al.;

“Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application”, Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, (1997) của Cleek et al.; và “Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery”, Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, (1997) Lam et al., được viện dẫn ở đây để tham khảo. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng trong hệ giải phóng có kiểm soát (Xem tài liệu của Langer, nêu trên; “Implantable Pumps”, CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240, (1987) của Sefton; “Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis”, Surgery 88:507-516, (1980) của Buchwald et al.; và “A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery”, N. Engl. J. Med. 321:574-579, (1989) của Saudek et al.). Theo một phương án khác, các vật liệu polyme có thể được sử dụng để giải phóng có kiểm soát được các phân tử (xem tài liệu, ví dụ, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (biên tập), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (biên tập), Wiley, New York (1984); “Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate”, Science 228:190-192 (1985) của Levy et al.; “Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: *In Vivo* Characterization”, Ann. Neurol. 25:351-356, (1989) của During et al.; “Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits”, J. Neurosurg. 7(1):105-112, (1989) của Howard et al.; Patent Mỹ số 5,679,377; Patent Mỹ số 5,916,597; Patent Mỹ số 5,912,015; Patent Mỹ số 5,989,463; Patent Mỹ số 5,128,326; Công bố đơn PCT số WO 99/15154; và Công bố đơn PCT số WO 99/20253). Ví dụ về các polyme được sử dụng trong các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, poly(2-hydroxyethylmetacrylat), poly(metylmetacrylat), poly(axit acrylic), poly(etylen-co-vinyl axetat), poly(axit metacrylic), polyglycolit (PLG), polyanhydrit, poly(N-vinylpyrrolidon), poly(vinylalcohol), polyacrylamit, poly(etylenglycol), polylactit (PLA), poly(lactit-co-glycolit) (PLGA), và polyorthoeste. Hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở gần đích trị liệu (ví dụ, phổi), do đó chỉ cần đến một phần của liều dùng toàn thân (xem tài liệu, ví dụ, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, nêu trên, tập 2, trang

115-138 (1984) của Goodson). Các chế phẩm polyme hữu ích để làm chế phẩm cấy giải phóng có kiểm soát có thể được sử dụng theo Dunn et al. (Xem Patent Mỹ số 5945155). Phương pháp cụ thể này là dựa trên tác dụng trị liệu của việc giải phóng có kiểm soát *in situ* chất có hoạt tính sinh học từ hệ polyme. Có thể cấy ở vị trí bất kỳ trong cơ thể của bệnh nhân cần điều trị trị liệu. Hệ phân phối kéo dài không phải polyme có thể được sử dụng, trong đó chế phẩm cấy không phải polyme trong cơ thể đối tượng được sử dụng dưới dạng hệ phân phối thuốc. Khi cấy vào cơ thể, dung môi hữu cơ của chế phẩm cấy sẽ tiêu tan, khuếch tán hoặc rò rỉ từ chế phẩm này vào dịch mô xung quanh, và vật liệu không phải polyme sẽ từ từ đông tụ hoặc kết tủa để tạo thành chất nền lỗ xốp li ti, dạng rắn (xem Patent Mỹ số 5888533).

Các hệ giải phóng có kiểm soát được tổng kết bởi Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan có thể được sử dụng để sản xuất các chế phẩm giải phóng kéo dài chứa một hoặc nhiều chất trị liệu theo sáng chế. Xem tài liệu, ví dụ, Patent Mỹ số 4526938; Công bố đơn PCT số WO 91/05548 và WO 96/20698; "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, (1996) của Ning et al.; "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397 (1995) của Song et al.; "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 (1997) của Cleek et al.; và "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, (1997) của Lam et al., được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Trong trường hợp chế phẩm theo sáng chế là axit nucleic mã hoá kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế, thì axit nucleic này có thể được sử dụng *in vivo* để thúc đẩy sự biểu hiện của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự đã mã hoá của nó, bằng cách xây dựng cấu trúc cho axit nucleic này như là một phần của vật truyền biểu hiện axit nucleic thích hợp và sử dụng nó sao cho nó sẽ ở bên trong tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng vật truyền retrovirus (xem Patent Mỹ số 4980286), hoặc bằng cách tiêm trực tiếp, hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật bắn phá bằng vi hạt (ví dụ, súng bắn gen; Biolistic, Dupont), hoặc

bao phủ bằng các lipit hoặc các thụ thể bề mặt tế bào hoặc các tác nhân chuyển nhiễm, hoặc bằng cách sử dụng nó ở dạng liên kết với các peptit tương tự hợp điều khiển (homeobox) mà đã biết là đi vào nhân tế bào (xem tài liệu, ví dụ, “Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868, (1991) của Joliot et al.), v.v. Theo cách khác, axit nucleic có thể được đưa vào bên trong tế bào và được hợp nhất vào ADN của tế bào vật chủ để biểu hiện bằng cách tái tổ hợp tương đồng.

Việc điều trị cho đối tượng bằng lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa bệnh của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế có thể bao gồm một lần điều trị hoặc, tốt hơn là, có thể bao gồm nhiều lần điều trị. Trong một ví dụ được ưu tiên, đối tượng được điều trị bằng kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự theo sáng chế một lần/tuần trong khoảng từ 1 đến 10 tuần, tốt hơn là từ 2 đến 8 tuần, tốt hơn nữa là từ khoảng 3 đến 7 tuần, và tốt hơn nữa là trong khoảng 4, 5, hoặc 6 tuần. Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng một lần/ngày, hai lần/ngày hoặc ba lần/ngày. Theo cách khác, các dược phẩm có thể được sử dụng một lần/tuần, hai lần/tuần, hai tuần một lần, một lần/tháng, sáu tuần một lần, hai tháng một lần, hai lần/năm hoặc một lần/năm. Cũng cần hiểu rằng liều lượng hữu hiệu của các phân tử được sử dụng để điều trị có thể tăng lên hoặc giảm đi trong một đợt điều trị cụ thể.

VI. Sử dụng các chế phẩm theo sáng chế

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự của sáng chế có khả năng điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ có liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự biểu hiện của CD123. Do đó, không mang tính giới hạn sáng chế, các phân tử này có thể được sử dụng trong chẩn đoán hoặc điều trị bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML), bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính (CML), bao gồm con tế bào non ác tính ở bệnh CML và gen ung thư Abelson có liên quan đến bệnh CML (hoán vị Bcr-ABL), hội chứng loạn sản tủy (MDS), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho B cấp tính (B-ALL), bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL), bao gồm hội chứng Richter hoặc biến đổi Richter ở bệnh CLL, bệnh bạch cầu tế bào nhung mao (HCL), bệnh ung thư tế bào tua tương bào huyết non ác tính (BPDCN), u bạch huyết không phải Hodgkin (NHL), bao gồm bệnh bạch cầu tế bào Mantle (MCL), và u bạch huyết lympho bào nhỏ (SLL), u bạch huyết Hodgkin, u tế bào bón toàn thân, và u bạch huyết

Burkitt (xem Ví dụ 2); bệnh luput tự miễn (SLE), dị ứng, bệnh hen và viêm khớp dạng thấp. Các kháng thể đôi đặc hiệu kép theo sáng chế còn có thể được sử dụng để sản xuất thuốc để điều trị các tình trạng bệnh nêu trên.

Phần trên mô tả chung về sáng chế và sẽ được hiểu một cách dễ dàng nhờ dựa vào các ví dụ dưới đây, các ví dụ này chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa sáng chế và không nhằm giới hạn sáng chế trừ khi có quy định khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Xây dựng cấu trúc cho các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 và protein đối chứng

Bảng 2 đề cập danh mục các kháng thể đôi đặc hiệu kép đã được biểu hiện và tinh chế. Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) và kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 không được làm tối ưu trình tự (DART-B) có khả năng liên kết đồng thời với CD123 và CD3. Kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) có khả năng liên kết đồng thời với FITC và CD3. Các kháng thể đôi đặc hiệu kép này là heterodime hoặc heterotrime của các trình tự axit amin đã đề cập. Các phương pháp tạo ra kháng thể đôi đặc hiệu kép được đề cập trong các tài liệu: WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 và WO 2012/162067.

Bảng 2		
Kháng thể đôi đặc hiệu kép	Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit	Trình tự mã hoá axit nucleic
Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) (Liên kết với CD3 ở epitop 1)	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:4
Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 không được làm tối ưu trình tự (DART-B) (Liên kết với CD3 ở epitop 2)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:6 SEQ ID NO:8
Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền liên kết albumin (DART-A w/ABD) (Liên kết với CD3 ở epitop 1) Bao gồm miền liên kết albumin	SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:10 SEQ ID NO:4

Bảng 2		
Kháng thể đôi đặc hiệu kép	Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit	Trình tự mã hoá axit nucleic
(ABD) để kéo dài thời gian bán thải <i>in vivo</i>		
Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền Fc IgG phiên bản 1 (DART-A w/Fc phiên bản 1) (Liên kết với CD3 ở epitop 1) Bao gồm miền Fc để kéo dài thời gian bán thải <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:54 SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:16
Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự có miền Fc IgG phiên bản 2 (DART-A w/Fc phiên bản 2) (Liên kết với CD3 ở epitop 1) Bao gồm miền Fc để kéo dài thời gian bán thải <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:54 SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:2
Kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng (hoặc DART đối chứng) (Liên kết với CD3 ở epitop 1) (Liên kết với đích không liên quan - FITC)	SEQ ID NO:19 SEQ ID NO:20	

Ví dụ 2

Đánh dấu kháng thể cho các tế bào đích dùng cho FACS định lượng (QFACS)

Tổng cộng 10^6 tế bào đích được thu gom từ dịch nuôi cấy, được tái tạo huyền phù trong huyết thanh AB người 10% trong dịch đệm FACS (PBS + BSA 1% + NaAzit 0,1%) và ủ trong 5 phút để phong bế các thụ thể Fc. Đánh dấu kháng thể cho các vi cầu có khả năng liên kết kháng thể khác nhau (Quantum™ Simply Cellular® (QSC), Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN) và các tế bào đích được đánh dấu bằng kháng thể PE kháng CD123 (BD Biosciences) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vấn đề là, thêm một giọt mỗi vi cầu QSC vào ống nghiệm polypropylen dung tích 5 mL và thêm kháng thể kháng CD123 đã được đánh dấu PE ở nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$ vào các tế bào đích và các vi cầu. Ủ các ống nghiệm trong bóng tối trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Rửa các tế bào và các vi cầu bằng cách thêm 2 mL dịch đệm FACS vào và ly tâm ở tốc độ 25000m/s² trong 5 phút. Một giọt quần thể vi cầu mẫu trắng được thêm vào sau khi rửa. Các vi cầu được phân tích trước tiên trên máy đếm tế bào theo dòng chảy để cài đặt ở chế độ riêng cho thử nghiệm này (điện áp PMT và giá trị bù trừ). Bằng cách sử

dụng cùng chế độ cài đặt, ghi nhận các giá trị huỳnh quang trung bình số học của các vi cầu và các tế bào đích. Tạo ra đường cong tiêu chuẩn của các vị trí liên kết kháng thể đối với các quần thể vi cầu từ giá trị huỳnh quang trung bình số học của các quần thể vi cầu. Tính các vị trí liên kết kháng thể trên các tế bào đích dựa trên giá trị huỳnh quang trung bình số học của các tế bào đích bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn đã tạo ra cho các vi cầu trong bảng tính QuickCal (Bangs Laboratories).

Để xác định các dòng tế bào đích thích hợp để đánh giá các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3, thì các mức biểu hiện bề mặt CD123 đối với các dòng đích Kasumi-3 (AML), Molm13 (AML), THP-1 (AML), TF-1 (Erythroleukemia), và RS4-11 (ALL) được đánh giá bằng phương pháp FACS định lượng (QFACS). Số lượng tuyệt đối của các vị trí liên kết kháng thể CD123 trên bề mặt tế bào được tính bằng cách sử dụng bộ kit QFACS. Như thể hiện trong Bảng 3, số lượng tuyệt đối của các vị trí liên kết kháng thể CD123 trên các dòng thể bào là theo thứ tự Kasumi-3 (mức cao) > Molm13 (mức trung bình) > THP-1 (mức trung bình) > TF-1 (mức trung bình mức thấp) > RS4-11 (mức thấp). Ba dòng tế bào biểu hiện mức cao nhất là các dòng tế bào AML: Kasumi-3, MOLM13, và THP-1. Các dòng tế bào không phải AML: TF-1 và RS4-11 lần lượt có mức biểu hiện CD123 trung bình thấp/thấp.

Bảng 3	
Dòng tế bào đích	Biểu hiện bề mặt CD123 (các vị trí liên kết kháng thể)
Kasumi-3	118620
Molm13	27311
THP-1	58316
TF-1	14163
RS4-11	957
A498	âm tính
HT29	âm tính

Ví dụ 3

Thử nghiệm gây độc tế bào CTL (thử nghiệm giải phóng LDH)

Các tế bào khối u đích bám dính được bóc tách bằng dung dịch Trypsin-EDTA 0,25% và thu gom bằng cách ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút. Hỗn dịch dòng tế bào đích được thu gom từ dịch nuôi cấy, rửa bằng môi trường thử nghiệm. Xác định nồng độ tế bào và khả năng sống sót bằng kỹ thuật loại trừ Xanh Trypan sử dụng máy đếm Beckman Coulter Vi-Cell. Các tế bào đích được pha loãng đến mật độ 4×10^5

tế bào/mL trong môi trường thử nghiệm. 50 μ L hỗn dịch tế bào đã pha loãng được thêm vào đĩa đã xử lý dịch nuôi cấy tế bào đáy chữ U 96 lỗ (BD Falcon Cat#353077).

Ba bộ mẫu đối chứng để xác định mức giải phóng đích tối đa (MR), độ gây độc tế bào độc lập kháng thể (AICC) và mức giải phóng tức thì tế bào đích (SR) được chuẩn bị như sau:

1) MR: 200 μ L môi trường thử nghiệm không có kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 và 50 μ L tế bào đích; bổ sung thêm chất điện hoạt khi kết thúc thử nghiệm để xác định mức giải phóng LDH tối đa.

2) AICC: 50 μ L môi trường thử nghiệm không có kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3, 50 μ L tế bào đích và 100 μ L tế bào T.

3) SR: 150 μ L môi trường không có kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 và 50 μ L tế bào đích.

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 (DART-A, DART-A w/ABD và DART-B) và mẫu đối chứng ban đầu được pha loãng đến nồng độ 4 μ g/mL, và các dịch pha loãng theo bậc tiếp đó được pha đến nồng độ cuối cùng = 0,00004 ng/mL (có nghĩa là, 40 fg/mL). 50 μ L dịch pha loãng được thêm vào đĩa chứa 50 μ L tế bào đích/lỗ.

Các tế bào T đã tinh chế được rửa một lần bằng môi trường thử nghiệm và được tái tạo huyền phù trong môi trường thử nghiệm ở mật độ tế bào 2×10^6 tế bào/mL. 2×10^5 tế bào T trong 100 μ L được thêm vào mỗi lỗ, cho tỷ lệ tế bào tác động:tế bào đích cuối cùng = 10:1. Ủ các đĩa trong khoảng 18 giờ ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5%.

Sau khi ủ, thêm 25 μ L dung dịch phân huỷ 10x (Promega # G182A) hoặc 1 mg/mL digitonin vào các lỗ đối chứng giải phóng tối đa, trộn bằng pipet 3 lần và ủ các đĩa trong 10 phút để phân huỷ hoàn toàn các tế bào đích. Ly tâm các đĩa ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 5 phút và 50 μ L dịch nổi trên bề mặt được chuyển từ từng lỗ của đĩa thử nghiệm sang đĩa ELISA đáy bằng và thêm 50 μ L dung dịch cơ chất LDH (Promega #G1780) vào mỗi lỗ đó. Ủ các đĩa trong thời gian từ 10 đến 20 phút ở nhiệt độ phòng (RT) trong bóng tối, tiếp đó thêm 50 μ L dung dịch dừng phản ứng vào. Xác định mật độ quang (O.D.) ở bước sóng 490 nm trong vòng 1 giờ trên thiết bị đọc đĩa Victor2 Multilabel (Perkin Elmer #1420-014). Phần trăm gây độc tế bào được tính như

nêu dưới đây và các đường cong đáp ứng liều dùng được tạo ra bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad PRISM5®.

Tính độ phân huỷ tế bào cụ thể từ dữ liệu O.D. bằng cách sử dụng công thức dưới đây:

$$\text{Độ gây độc tế bào (\%)} = 100 \times (\text{OD của mẫu} - \text{OD của AICC}) / (\text{OD của MR} - \text{OD của SR})$$

Tiêu diệt định hướng lại đối với các dòng tế bào đích có nồng độ bề mặt CD123 ở các mức khác nhau:

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 thể hiện khả năng tiêu diệt định hướng lại mạnh với nồng độ cần để đạt được 50% hoạt tính tối đa (EC₅₀) trong khoảng nồng độ dưới ng/mL, bất kể tính đặc hiệu epitop CD3 (DART-A so với DART-B) ở các dòng tế bào đích biểu hiện CD123 ở mức cao, Kasumi-3 (EC₅₀=0,01 ng/mL) (Fig.4 Đồ thị D), biểu hiện CD123 ở mức trung bình, Molm13 (EC₅₀=0,18 ng/mL) và THP-1 (EC₅₀=0,24 ng/mL) (Fig.4, lần lượt là Đồ thị C và Đồ thị E,) và biểu hiện CD123 ở mức trung bình thấp hoặc thấp, TF-1 (EC₅₀=0,46 ng/mL) và RS4-11 (EC₅₀=0,5 ng/mL) (Fig.4, lần lượt là Đồ thị B và Đồ thị A). Tương tự, các phân tử đặc hiệu kép CD123 x CD3 điều tiết khả năng tiêu diệt định hướng lại cũng được quan sát ở nhiều dòng tế bào đích với các tế bào T từ các đối tượng cho khác nhau và nhận thấy không có hoạt tính tiêu diệt định hướng lại ở các dòng tế bào không biểu hiện CD123. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 4.

Bảng 4			
Dòng tế bào đích	Biểu hiện bề mặt CD123 (các vị trí liên kết kháng thể)	EC ₅₀ của các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (ng/mL) E:T=10:1	% tiêu diệt tối đa
Kasumi-3	118620	0,01	94
Molm13	27311	0,18	43
THP-1	58316	0,24	40
TF-1	14163	0,46	46
RS4-11	957	0,5	60
A498	Âm tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính
HT29	Âm tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính

Nếu cần thực hiện lặp lại ví dụ này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể, trong giới hạn hợp lý và chấp nhận được, thay đổi quy trình đã mô tả ở trên theo cách thích hợp để lặp lại các kết quả đã đề cập. Do đó, quy trình nêu làm ví dụ này không cần phải tuân thủ theo cách thực sự nghiêm ngặt.

Ví dụ 4

Hoạt hoá tế bào T trong quá trình tiêu diệt định hướng lại bởi các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A, DART-A w/ABD và DART-A w/Fc)

Các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự thể hiện khả năng tiêu diệt định hướng lại mạnh bất kể có hay không có công nghệ kéo dài thời gian bán thải (DART-A so với DART-A w/ABD so với DART-A w/Fc) ở các dòng tế bào đích biểu hiện CD123 ở mức cao, Kasumi-3, và biểu hiện CD123 ở mức trung bình, THP-1, (Fig.5, tương ứng là đồ thị A và đồ thị B). Để xác định đặc tính hoạt hoá tế bào T trong quá trình tiêu diệt định hướng lại qua trung gian kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự, thì các tế bào T từ các thử nghiệm tiêu diệt định hướng lại sẽ được nhuộm màu chỉ thị hoạt hoá tế bào T CD25 và phân tích bằng FACS. Như được thể hiện trên Fig.5, Đồ thị D, CD25 được điều hoà tăng trong các tế bào T CD8 theo cách phụ thuộc liều dùng chỉ ra rằng các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự gây cảm ứng sự hoạt hoá tế bào T trong quá trình tiêu diệt định hướng lại. Trái lại, khi không có các tế bào đích thì không có sự hoạt hoá tế bào T CD8 (Fig.5, Đồ thị C), chỉ ra rằng các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự không hoạt hoá các tế bào T khi không có các tế bào đích. Tương tự, các tế bào T CD8 không được hoạt hoá khi ủ với các tế bào đích và kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) (Fig.5, Đồ thị D) cho thấy cần liên kết ngang tế bào T và tế bào đích với các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự.

Ví dụ 5

Nhuộm màu nội bào Granzyme B và Perforin

Để xác định nồng độ nội bào của granzyme B và perforin trong các tế bào T, thử nghiệm CTL được thiết lập như nêu trên. Sau khoảng 18 giờ, nhuộm màu các tế bào từ đĩa thử nghiệm bằng các kháng thể kháng CD4 và kháng CD8 bằng cách ủ

trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi nhuộm màu bề mặt, ủ các tế bào trong 100 µL dịch đệm cố định và thẩm thấu (BD BioSciences) trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Rửa các tế bào bằng dịch đệm thẩm thấu/rửa (BD BioSciences) và ủ trong 50 µL hỗn hợp kháng thể granzyme B và perforin (được pha trong 1X dịch đệm thẩm thấu/rửa) ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Tiếp đó rửa các tế bào bằng 250 µL dịch đệm thẩm thấu/rửa và tái tạo huyền phù trong dịch đệm thẩm thấu/rửa để phân tích FACS.

Điều hoà tăng Granzyme B và Perforin bằng kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) ở các tế bào T trong quá trình tiêu diệt định hướng lại

Để khảo sát cơ chế có thể có để gây độc tế bào qua trung gian kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) bởi các tế bào T, nồng độ granzyme B và perforin nội bào được xác định trong các tế bào T sau quá trình tiêu diệt được định hướng lại. Nhận thấy có sự điều hoà tăng nồng độ granzyme B và perforin phụ thuộc liều dùng ở các tế bào T CD8 và CD4 sau khi ủ các tế bào T và tế bào Kasumi-3 với DART-A (Fig.6, Đồ thị A). Thử ví là, mức điều hoà tăng ở các tế bào T CD8 cao hơn gần như gấp hai lần so với các tế bào T CD4 (Fig.6, Đồ thị A). Khi tiến hành thử nghiệm với sự có mặt của các chất ức chế granzyme B và perforin thì nhận thấy không có sự tiêu diệt tế bào. Không có sự điều hoà tăng granzyme B hoặc perforin ở các tế bào T CD8 hoặc CD4 khi các tế bào T được ủ với các tế bào đích Kasumi-3 và kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) (Fig.5, Đồ thị B). Dữ liệu này cho thấy rằng quá trình tiêu diệt tế bào đích qua trung gian DART-A có thể được điều tiết thông qua cơ chế granzyme B và perforin.

Ví dụ 6

Hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A)

Phân lập các PBMC và các tế bào T từ máu toàn phần của người

Các PBMC từ người cho khoẻ mạnh được phân lập từ máu toàn phần bằng cách sử dụng kỹ thuật ly tâm gradien Ficoll. Vắn tắt là, máu toàn phần được pha loãng tỷ lệ 1:1 với PBS vô khuẩn. 35 mL máu đã pha loãng được xếp lớp lên trên 15 mL Ficoll-Paque™ Plus trong các ống nghiệm dung tích 50 mL và ly tâm các ống này ở tốc độ 1400 vòng/phút trong 20 phút có nút hãm. Lớp phủ đệm ở giữa hai pha được gom vào

ống nghiệm dung tích 50 mL và rửa bằng 45 mL PBS bằng cách ly tâm các ống này ở tốc độ 6000m/giây² (1620 vòng/phút) trong 5 phút. Gạn bỏ dịch nổi trên bề mặt và rửa viên kết tế bào một lần bằng PBS và xác định số lượng tế bào sống sót được bằng phương pháp loại trừ nhuộm Xanh Trypan. Các PBMC được tái tạo huyền phù đến nồng độ cuối cùng = $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL trong môi trường đầy đủ (RPMI 1640, FBS 10%, Glutamin 2 mM, HEPES 10mM, penixilin/Streptomycin (P/S) 100μ/100μ/mL).

Phân lập tế bào T: Các tế bào T nguyên vẹn được phân lập bằng cách chọn lọc âm tính từ PBMC từ máu toàn phần của người bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T người nguyên vẹn Dynabeads (Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi phân lập, các tế bào T này được nuôi cấy qua đêm trong môi trường RPMI với FBS 10%, penixilin 1%/Streptomycin.

Mô hình khối u

Các tế bào T và các tế bào khối u của người (Molm13 hoặc RS4-11) được kết hợp theo tỷ lệ 1:5 (tương ứng là 1×10^6 và 5×10^6) và tạo hỗn dịch trong 200 μL nước muối vô khuẩn và được tiêm dưới da (SC) vào ngày nghiên cứu 0 (SD0). Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) hoặc kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) được sử dụng qua đường tĩnh mạch (IV) bằng cách tiêm qua tĩnh mạch đuôi trong 100 μL như nêu sơ lược trong Bảng 5 (MOLM13) và Bảng 6 (RS4-11).

Bảng 5 Thiết kế nghiên cứu cho mô hình MOLM13			
Nhóm điều trị	Liều dùng (mg/kg)	Phác đồ	Số lượng con vật
Đối chứng chất dẫn thuốc (các tế bào MOLM-13 được cấy đơn độc hoặc + các tế bào T)	-	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,5	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,2	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,1	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,02	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,004	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,0008	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,00016	SD0, 1, 2, 3	8

Bảng 6 Thiết kế nghiên cứu cho mô hình RS4-11			
Nhóm điều trị	Liều dùng (mg/kg)	Phác đồ	Số lượng con vật
Đối chứng chất dẫn thuốc (các tế bào RS4-11 được cấy đơn độc)	-	SD0, 1, 2, 3	8
Đối chứng chất dẫn thuốc (RS4-11 + các tế bào T được cấy)	-	SD0, 1, 2, 3	8
DART đối chứng	0,2	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,5	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,2	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,1	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,02	SD0, 1, 2, 3	8
DART-A	0,004	SD0, 1, 2, 3	8

Thu thập dữ liệu và phân tích thống kê:

Khối lượng các con vật – ghi khối lượng từng con hai lần/tuần cho đến khi kết thúc nghiên cứu bắt đầu lúc tiêm tế bào khối u.

Tỷ lệ mắc bệnh/Tỷ lệ chết - Theo dõi các con vật hai lần/tuần về tỷ lệ mắc bệnh nói chung và theo dõi chúng hằng ngày về tỷ lệ chết. Đánh giá các con chết xem có liên quan đến thuốc hay do các yếu tố kỹ thuật, bao gồm quan sát tổng thể và sụt cân; trường hợp chết được ghi lại hằng ngày.

Kích cỡ khối u - Ghi kích cỡ từng khối u hai lần/tuần bắt đầu ở tuần cấy ghép khối u và tiếp tục cho đến khi kết thúc nghiên cứu.

$$\text{Kích cỡ khối u (mm}^3\text{)} = (\text{chiều dài (mm)} \times \text{chiều rộng}^2)/2$$

Các con vật bị chết do yếu tố kỹ thuật hoặc có liên quan đến thuốc bị loại bỏ khỏi tính toán dữ liệu.

Ước chế phát triển khối u – các giá trị ước chế phát triển khối u (TGI) được tính cho mỗi nhóm gồm các con vật được điều trị bằng cách sử dụng công thức:

$$1 - [(\text{kích cỡ khối u cuối cùng trung bình (được điều trị)} - (\text{kích cỡ khối u ban đầu trung bình (được điều trị)})/[(\text{kích cỡ khối u cuối cùng trung bình (đối chứng)} - (\text{kích cỡ khối u ban đầu trung bình (đối chứng)})] \times 100$$

Các con vật có đáp ứng một phần hoặc hoàn toàn, hoặc các con vật bị chết do yếu tố kỹ thuật hoặc có liên quan đến thuốc bị loại khỏi các tính toán TGI. Theo Viện

Ung thư Quốc gia, tiêu chí cho hoạt tính của hợp chất là TGI>58% (Anticancer Drug Development Guide; Totowa, NJ: Humana 99-123, (2004) của Corbett et al.).

Đáp ứng khối u một phần/hoàn toàn – Từng con chuột nhất có số đo khối u dưới 1mm³ vào Ngày 1 được phân loại là có đáp ứng một phần (PR) và phần trăm teo nhỏ khối u (% TR) được xác định bằng cách sử dụng công thức:

$$1 - [\text{Kích cỡ khối u cuối cùng (mm}^3\text{)} / \text{kích cỡ khối u ban đầu (mm}^3\text{)}] * 100\%$$

Các con chuột nhất không có khối u dễ nhận thấy được phân loại là có đáp ứng hoàn toàn (CR).

Số liệu thống kê kích cỡ khối u – tiến hành phân tích thống kê giữa nhóm được điều trị và nhóm đối chứng để so sánh kích cỡ khối u. Đối với các phân tích này, phân tích hai chiều biến, tiếp theo là kiểm định Bonferroni được sử dụng. Tất cả các phân tích đều được tiến hành bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad PRISM® (phiên bản 5.02). Dữ liệu về khối lượng và kích cỡ khối u của từng con bị chết do yếu tố kỹ thuật hoặc có liên quan đến thuốc bị loại khỏi phân tích. Tuy nhiên, dữ liệu về khối u của các con có đáp ứng một phần hoặc hoàn toàn được đưa vào trong các tính toán này.

Kết quả MOLM13

Dòng tế bào AML MOLM13 được trộn sơ bộ với các tế bào T đã hoạt hoá và cấy dưới da vào chuột nhất đã bất hoạt gen NOD/SCID gamma (NSG) (N = 8/nhóm) vào SD0 như nêu trên. Các khối u MOLM13 ở nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc (các tế bào MOLM13 đơn độc hoặc + các tế bào T) đã chứng tỏ có profin phát triển khối u tương đối mạnh *in vivo* (Fig.7, các đồ thị A và B). Ở SD8, kích cỡ trung bình của các khối u ở nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc là 129,8 ± 29,5 mm³ và đến SD15 thì khối u đạt kích cỡ trung bình là 786,4 ± 156,7 mm³. Cho đến khi kết thúc thử nghiệm vào SD18, khối u đạt kích cỡ trung bình là 1398,8 ± 236,9 mm³.

Bắt đầu điều trị bằng DART-A vào cùng ngày mà hỗn hợp tế bào khối u/tế bào T được cấy ghép [(SD0)] và tiếp đó tiến hành tiêm hằng ngày thêm 7 ngày nữa cho tổng cộng 8 lần tiêm hằng ngày. Các con chuột được điều trị bằng DART-A ở 9 mức liều dùng (0,5, 0,2, 0,1, 0,02, và 0,004 mg/kg và 20, 4, 0,8 và 0,16 µg/kg). Các kết quả được thể hiện trên Fig.7, Đồ thị A (0,5, 0,2, 0,1, 0,02, và 0,004 mg/kg) và Fig.7, Đồ thị B (20, 4, 0,8 và 0,16 µg/kg). Sau ngày nghiên cứu 11, sự phát triển của các khối u

MOLM13 bị ức chế đáng kể ở mức liều 0,16, 0,5, 0,2, 0,1, 0,02, và 0,004 mg/kg ($p < 0,001$). Hơn nữa, việc điều trị cho các con chuột nhất có khối u MOLM13 ở mức liều dùng 20 và 4 $\mu\text{g/kg}$ lần lượt cho kết quả 8/8 và 7/8 đáp ứng hoàn toàn (CR). Cho đến khi kết thúc thử nghiệm vào SD18, kích cỡ trung bình của các khối u được điều trị bằng DART-A ở liều dùng từ 0,8 đến 20 $\mu\text{g/kg}$ nằm trong khoảng từ $713,60 \pm 267,4$ đến 0 mm^3 , tất cả đều nhỏ hơn đáng kể so với các khối u ở nhóm điều trị bằng chất dẫn thuốc. Các giá trị TGI là 100, 94, và 49% lần lượt đối với các nhóm liều dùng 20, 4, và 0,8 $\mu\text{g/kg}$. So với nhóm tế bào khối u MOLM13 được điều trị bằng chất dẫn thuốc, nhóm dùng DART-A ở mức liều dùng 20 và 4 $\mu\text{g/kg}$ đạt kết quả có ý nghĩa thống kê vào SD15 trong khi nhóm được điều trị ở mức liều dùng 0,8 $\mu\text{g/kg}$ đạt kết quả có ý nghĩa vào SD18.

Kết quả trên RS4-11

Dòng tế bào ALL RS4-11 được trộn sơ bộ với các tế bào T đã hoạt hoá và cấy dưới da vào chuột nhất bất hoạt gen NOD/SCID gamma (N = 8/nhóm) vào SD0 như nêu trên. Các khối u RS4-11 ở nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc (các tế bào RS4-11 đơn độc hoặc + các tế bào T) đã chứng tỏ có profin phát triển khối u tương đối mạnh *in vivo* (Fig.8).

Bắt đầu điều trị bằng DART-A vào cùng ngày mà hỗn hợp tế bào khối u/tế bào T được cấy ghép [(SD0)] và tiếp đó tiến hành tiêm hằng ngày thêm 3 ngày nữa cho tổng cộng 4 lần tiêm hằng ngày. Các con chuột nhất được điều trị bằng DART-A ở 5 mức liều dùng (0,5, 0,2, 0,1, 0,02, và 0,004 mg/kg). Các kết quả được thể hiện trên Fig.8.

Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) ức chế hữu hiệu sự phát triển của các khối u MOLM13 AML và RS4-11ALL cấy dưới da vào chuột nhất NOD/SCID theo mô hình Winn khi bắt đầu cho dùng thuốc vào ngày cấy ghép khối u và tiếp tục trong 3 ngày liên tục hoặc lâu hơn. Dựa trên các tiêu chí đã thiết lập bởi Viện Ung thư Quốc gia, DART-A ở mức liều dùng 0,1 mg/kg và cao hơn (TGI >58) được xem là có hoạt tính ở mô hình RS4-11 và liều dùng DART-A 0,004 mg/kg và cao hơn có hoạt tính ở mô hình MOLM13. Các liều dùng DART-A thấp hơn có liên quan đến việc ức chế sự phát triển khối u ở mô hình MOLM13 so với mô hình RS4-11 là nhất quán với dữ liệu *in vitro*, cho thấy rằng các tế bào MOLM13

có mức biểu hiện CD123 cao hơn so với các tế bào RS4-11, điều này có liên quan đến độ nhạy cảm gia tăng với độ gây độc tế bào qua trung gian DART-A ở các tế bào MOLM13 *in vitro*.

Nếu cần thực hiện lặp lại ví dụ này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể, trong giới hạn hợp lý và chấp nhận được, thay đổi quy trình mô tả ở trên theo cách thích hợp để lặp lại các kết quả đã đề cập. Do đó, quy trình nêu làm ví dụ không cần phải tuân thủ theo cách thực sự nghiêm ngặt.

Ví dụ 7

Sự biểu hiện bề mặt CD123 trên tế bào non ác tính bệnh bạch cầu và tế bào gốc trong mẫu mô cấp một từ bệnh nhân AML 1

Để xác định kiểu biểu hiện CD123 trong các mẫu cấp 1 của bệnh nhân AML 1, tuỷ xương của bệnh nhân AML cấp một được bảo quản lạnh và các mẫu PBMC được đánh giá về sự biểu hiện bề mặt CD123 trên tế bào non ác tính bệnh bạch cầu.

Mẫu tuỷ xương AML – Báo cáo lâm sàng

Tuổi: 42

Giới tính: Nữ

Phân loại AML: M2

Phần trăm tế bào ung thư dựa trên hình thái học: 67,5%

Kiểu hình miễn dịch tuỷ xương:

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

Sự biểu hiện CD123 ở tế bào non ác tính bệnh bạch cầu trong các tế bào đơn nhân tuỷ xương (BM MNC)

Tổng cộng $0,5 \times 10^6$ tế bào đơn nhân tuỷ xương (BM MNC) và tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ bệnh nhân AML 1 được đánh giá về sự biểu hiện CD123. Dòng tế bào Kasumi-3 được sử dụng làm đối chứng. Tế bào non ác tính bệnh bạch cầu được nhận biết bằng cách sử dụng chỉ thị tuỷ bào CD33. Như được thể hiện trên Fig.9, Đồ thị A, 87% tế bào từ tuỷ xương AML từ bệnh nhân 1 biểu hiện CD123 và CD33.

Mức biểu hiện CD123 thấp hơn một chút so với dòng tế bào AML Kasumi-3 biểu hiện CD123 mức cao (Fig.9, Đồ thị B).

Ví dụ 8

Thử nghiệm tiêu diệt CTL (lympho bào T gây độc tế bào) tự thân bằng cách sử dụng mẫu bệnh phẩm cấp một từ bệnh nhân AML

Mẫu bệnh phẩm AML cấp một được bảo quản lạnh (các tế bào đơn nhân tủy xương (BMNC) và các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ bệnh nhân AML 1 được rã đông trong RPMI 1640 với FBS 10% và để hồi phục qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5%. Rửa các tế bào bằng môi trường thử nghiệm (RPMI 1640+FBS 10%) và xác định số lượng tế bào sống sót được bằng phương pháp loại trừ Xanh Trypan. 150.000 tế bào/lỗ trong 150 µL môi trường thử nghiệm được thêm vào đĩa đáy chữ U 96 lỗ (BD Biosciences). Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) được pha loãng đến nồng độ 0,1, và 0,01 ng/mL và 50 µL mỗi dịch pha loãng được thêm vào từng lỗ (thể tích cuối cùng = 200 µL). Kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) được pha loãng đến nồng độ 0,1 ng/mL và 50 µL mỗi dịch pha loãng được thêm vào từng lỗ (thể tích cuối cùng = 200 µL). Chuẩn bị mỗi đĩa thử nghiệm riêng cho từng thời điểm (48, 72, 120 và 144 giờ) và ủ các đĩa ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Ở mỗi thời điểm, các tế bào được nhuộm màu bằng các kháng thể CD4, CD8, CD25, CD45, CD33, và CD123. Phân tích các tế bào đã được đánh dấu trong máy đếm tế bào theo dòng chảy FACS Calibur có trang bị phần mềm CellQuest Pro, phiên bản 5.2.1 (BD Biosciences). Tiến hành phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Flowjo v9.3.3 (Treestar, Inc). Xác định mức tăng trưởng tế bào T bằng cách chặn quần thể tế bào CD4+ và CD8+ và xác định mức hoạt hoá bằng cách đo cường độ huỳnh quang trung bình CD25 (MFI) ở các quần thể tế bào bị chặn CD4+ và CD8+. Nhận biết quần thể tế bào non ác tính bệnh bạch cầu bằng cách chặn CD45+CD33+.

Suy kiệt tế bào khối u tự thân, tăng trưởng và hoạt hoá tế bào T và bởi kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) trong các mẫu bệnh phẩm cấp một lấy từ bệnh nhân AML 1

Để xác định hoạt tính qua trung gian kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) ở bệnh nhân AML 1, các mẫu bệnh phẩm được ủ

với 0,1 ng/mL hoặc 0,01 ng/mL DART-A và phần trăm tế bào non ác tính bệnh bạch cầu và tế bào T được xác định ở các thời điểm khác nhau sau khi điều trị. Tế bào non ác tính bệnh bạch cầu được nhận biết bằng cách chặn CD45+/CD33+. Việc ủ các mẫu tủy xương cấp một AML với DART-A gây suy kiệt quần thể tế bào bệnh bạch cầu theo thời gian (Fig.10, Đồ thị A), kèm theo tăng trưởng đồng phát của các tế bào T tồn lưu (Fig.10, Đồ thị B) và gây cảm ứng các chỉ thị hoạt hoá tế bào T (Fig.10, Đồ thị C). Trong các mẫu được điều trị bằng DART-A, các tế bào T tăng trưởng từ khoảng 7 % lên khoảng 80% ở 120 giờ. Sự hoạt hoá tế bào T được xác định bằng mức biểu hiện CD25 trên các tế bào CD4 và CD8 đạt mức pic ở 72 giờ và giảm đi ở thời điểm 120 giờ.

Nếu cần thực hiện lặp lại ví dụ này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể, trong giới hạn hợp lý và chấp nhận được, thay đổi quy trình mô tả ở trên theo cách thích hợp để lặp lại các kết quả đã đề cập. Do đó, quy trình nêu làm ví dụ này không cần phải tuân thủ theo cách thực sự nghiêm ngặt.

Ví dụ 9

Sự biểu hiện bề mặt CD123 trên tế bào non ác tính bệnh bạch cầu và tế bào gốc trong mẫu mô cấp một từ bệnh nhân ALL

Để xác định kiểu biểu hiện CD123 trong các mẫu cấp một của bệnh nhân ALL, mẫu PBMC của bệnh nhân ALL cấp một được bảo quản lạnh được đánh giá về mức biểu hiện bề mặt CD123 trên tế bào non ác tính bệnh bạch cầu.

Sự biểu hiện CD123 ở tế bào non ác tính bệnh bạch cầu trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC)

Tổng cộng $0,5 \times 10^6$ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ đối tượng cho khoẻ mạnh và bệnh nhân ALL được đánh giá về sự biểu hiện CD123. Như được thể hiện trên Fig.11, các đồ thị từ E đến H, đa số các tế bào từ tủy xương ALL đều biểu hiện CD123. Trái lại, như mong đợi, các tế bào B ở đối tượng cho bình thường âm tính với CD123 và pDC và các bạch cầu đơn nhân to dương tính với CD123 (Fig.11, Đồ thị D).

Nhận biết quần thể tế bào T trong mẫu bệnh phẩm ALL bằng cách nhuộm màu các tế bào đối với CD4 và CD8. Như được thể hiện trên Fig.12, Đồ thị B, chỉ một tỷ lệ

nhỏ trong tổng số các tế bào PBMC ở mẫu bệnh nhân ALL là các tế bào T (khoảng 0,5% là tế bào T CD4 và khoảng 0,4% là tế bào T CD8).

Ví dụ 10

Thử nghiệm tiêu diệt CTL tự thân bằng cách sử dụng mẫu bệnh phẩm cấp một ALL

Mẫu ALL cấp một được bảo quản lạnh (các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được rửa đông trong RPMI 1640 với FBS 10% và để hồi phục qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5%. Rửa các tế bào này bằng môi trường thử nghiệm (RPMI 1640+FBS 10%) và xác định số lượng tế bào sống sót được bằng phương pháp loại trừ Xanh Trypan. 150.000 tế bào/lỗ trong 150 µL môi trường thử nghiệm được thêm vào đĩa đáy chữ U 96 lỗ (BD Biosciences). Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) được pha loãng đến các nồng độ 10, 1 ng/mL, và 50 µL mỗi dịch pha loãng được thêm vào từng lỗ (thể tích cuối cùng = 200 µL). Chuẩn bị mỗi đĩa thử nghiệm riêng cho từng thời điểm (48, 72, 120 và 144 giờ) và ủ các đĩa ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Ở mỗi thời điểm, các tế bào được nhuộm màu bằng các kháng thể CD4, CD8, CD25, CD45, CD33, và CD123. Phân tích các tế bào đã được đánh dấu trong máy đếm tế bào theo dòng chảy FACS Calibur có trang bị phần mềm CellQuest Pro, phiên bản 5.2.1 (BD Biosciences). Tiến hành phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Flowjo v9.3.3 (Treestar, Inc). Xác định mức tăng trưởng tế bào T bằng cách chặn quần thể tế bào CD4+ và CD8+ và xác định mức hoạt hoá bằng cách xác định CD25 MFI ở các quần thể tế bào bị chặn CD4+ và CD8+. Nhận biết quần thể tế bào non ác tính bệnh bạch cầu bằng cách chặn CD45+CD33+.

Suy kiệt tế bào khối u tự thân, tăng trưởng và hoạt hoá tế bào T bởi kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) trong các mẫu bệnh phẩm cấp một lấy từ các bệnh nhân ALL

Để xác định hoạt tính qua trung gian kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) trong các mẫu bệnh phẩm cấp một của bệnh nhân ALL, các mẫu bệnh phẩm được ủ với 1 ng/mL DART-A và phần trăm tế bào non ác tính bệnh bạch cầu và tế bào T được xác định ở các thời điểm khác nhau sau khi điều trị. Tế bào non ác tính bệnh bạch cầu được nhận biết bằng cách chặn CD45+/CD33+. Việc ủ các mẫu ALL tủy xương cấp một với DART-A gây suy kiệt quần thể tế bào bệnh bạch cầu theo thời gian so với mẫu đối chứng không được điều trị hoặc DART

đối chứng (Fig.13, Đồ thị H so với các đồ thị F và G). Khi đếm số lượng tế bào T (nhuộm màu CD8 và CD4) và sự hoạt hoá (nhuộm màu CD25) được thử nghiệm, thì các tế bào T có tăng trưởng và được hoạt hoá trong mẫu DART-A (Fig.14, tương ứng đồ thị I và đồ thị L,) so với mẫu không được điều trị hoặc DART đối chứng (Fig.14, tương ứng các đồ thị H, G, K và J).

Ví dụ 11

Sự biểu hiện bề mặt CD123 trên tế bào non ác tính bệnh bạch cầu và tế bào gốc trong mẫu mô cấp một từ bệnh nhân AML 2

Để xác định kiểu biểu hiện CD123 trong các mẫu cấp một bệnh nhân AML 2, tủy xương của bệnh nhân AML cấp một được bảo quản lạnh và các mẫu PBMC được đánh giá về sự biểu hiện bề mặt CD123 ở tế bào non ác tính bệnh bạch cầu.

Sự biểu hiện CD123 ở tế bào non ác tính bệnh bạch cầu trong các tế bào đơn nhân tủy xương (BMNC)

Tổng cộng $0,5 \times 10^6$ tế bào đơn nhân tủy xương (BM MNC) và tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ bệnh nhân AML 2 được đánh giá về đặc điểm nhận biết tế bào non ác tính bệnh bạch cầu. Tế bào non ác tính bệnh bạch cầu được nhận biết bằng cách sử dụng chỉ thị tủy bào CD33 và CD45. Như được thể hiện trên Fig.15, Đồ thị B, 94% tế bào từ tủy xương AML là tế bào non ác tính bệnh bạch cầu. Nhận biết quần thể tế bào T bằng khả năng biểu hiện CD3. Như được thể hiện trên Fig.15, Đồ thị C, khoảng 15% tế bào từ mẫu tủy xương AML và PBMC là các tế bào T.

Ví dụ 12

Thử nghiệm tiêu diệt CTL tự thân bằng cách sử dụng mẫu bệnh phẩm cấp một của bệnh nhân AML 2

Mẫu bệnh phẩm AML cấp một được bảo quản lạnh (các tế bào đơn nhân tủy xương (BM MNC) và các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ bệnh nhân AML 2 được rã đông trong RPMI 1640 với FBS 10% và để hồi phục qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂. Rửa các tế bào này bằng môi trường thử nghiệm (RPMI 1640+FBS 10%) và xác định số lượng tế bào sống sót được bằng phương pháp loại trừ Xanh Trypan. 150.000 tế bào/lỗ trong 150 µL môi trường thử nghiệm được thêm vào đĩa đáy chữ U 96 lỗ (BD Biosciences). Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được

làm tối ưu trình tự (DART-A) và kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng) được pha loãng đến các nồng độ 0,1, và 0,01 ng/mL, và 50 μ L mỗi dịch pha loãng được thêm vào từng lỗ (thể tích cuối cùng = 200 μ L). Chuẩn bị mỗi đĩa thử nghiệm riêng cho từng thời điểm (48, 72, 120 và 144 giờ) và ủ các đĩa ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Ở mỗi thời điểm, các tế bào được nhuộm màu bằng các kháng thể CD4, CD8, CD25, CD45, CD33, và CD123. Phân tích các tế bào đã được đánh dấu trong máy đếm tế bào theo dòng chảy FACS Calibur có trang bị phần mềm CellQuest Pro, phiên bản 5.2.1 (BD Biosciences). Tiến hành phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Flowjo v9.3.3 (Treestar, Inc). Xác định sự tăng trưởng tế bào T bằng cách chặn quần thể tế bào CD4+ và CD8+ và xác định mức hoạt hoá bằng cách đo MFI của CD25 ở các quần thể tế bào bị chặn CD4+ và CD8+. Nhận biết quần thể tế bào non ác tính bệnh bạch cầu bằng cách chặn CD45+CD33+.

Suy kiệt tế bào khối u tự thân, tăng trưởng và hoạt hoá tế bào T trong các mẫu bệnh phẩm cấp một từ bệnh nhân AML 2

Để xác định hoạt tính qua trung gian kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) trong các mẫu bệnh phẩm cấp một của bệnh nhân AML 2, các mẫu bệnh phẩm này được ủ với DART-A ở nồng độ 0,1 hoặc 0,01 ng/mL và phần trăm tế bào non ác tính bệnh bạch cầu và tế bào T được xác định ở các thời điểm khác nhau sau khi điều trị. Việc ủ các mẫu tủy xương cấp một AML với DART-A gây suy kiệt quần thể tế bào bệnh bạch cầu theo thời gian (Fig.16, Đồ thị A), kèm theo sự tăng trưởng đồng phát của các tế bào T tồn lưu (cả CD4 và CD8) (tương ứng Fig.16, Đồ thị B và Fig.16, Đồ thị C). Để xác định xem các tế bào T có được hoạt hoá hay không, nhuộm màu các tế bào đối với CD25 hoặc Ki-67, hai chỉ thị về khả năng hoạt hoá tế bào T. Như được thể hiện trên Fig.17, đồ thị A và đồ thị B, việc ủ các mẫu tủy xương cấp một AML với DART-A gây hoạt hoá tế bào T. Các dữ liệu này là ở thời điểm 144 giờ.

Nhuộm màu nội bào đối với Granzyme B và Perforin

Để xác định nồng độ nội bào của granzyme B và Perforin trong các tế bào T, tiến hành thử nghiệm CTL. Sau khoảng 18 giờ, nhuộm màu các tế bào từ đĩa thử nghiệm bằng các kháng thể kháng CD4 và kháng CD8 bằng cách ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi nhuộm màu bề mặt, ủ các tế bào này trong 100 μ L dịch đệm có

định và thẩm thấu trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Rửa các tế bào bằng dịch đệm thẩm thấu/rửa và ủ trong 50 µl hỗn hợp kháng thể granzyme B và perforin đã được pha trong 1X dịch đệm thẩm thấu/rửa ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Tiếp đó rửa các tế bào này bằng 250 µl dịch đệm thẩm thấu/rửa và tái tạo huyền phù trong dịch đệm thẩm thấu/rửa để phân tích FACS.

Điều hoà tăng Granzyme B và Perforin bởi kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) ở các tế bào T trong quá trình tiêu diệt định hướng lại.

Để khảo sát cơ chế có thể có để gây độc tế bào qua trung gian kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) của các tế bào T, xác định nồng độ granzyme B và perforin nội bào trong các tế bào T sau khi tiêu diệt định hướng lại. Không có sự điều hoà tăng granzyme B và perforin khi các tế bào T được ủ với kháng thể đôi đặc hiệu kép đối chứng (DART đối chứng). Nhận thấy có sự điều hoà tăng nồng độ granzyme B và perforin ở cả các tế bào T CD8 và CD4 với kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) (Fig.17, Đồ thị C và Đồ thị D). Thú vị là, mức điều hoà tăng ở các tế bào T CD8 cao hơn gần như gấp hai lần so với các tế bào T CD4 (Fig.17, Đồ thị C và Fig.17, Đồ thị D). Dữ liệu này cho thấy rằng khả năng tiêu diệt tế bào đích qua trung gian DART-A được điều tiết thông qua con đường granzyme B và perforin.

Ví dụ 13

Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự phản ứng chéo với các protein CD123 và CD3 của động vật linh trưởng không phải là người.

Để định lượng mức độ liên kết giữa kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) và CD3 của người hoặc khỉ đuôi dài, tiến hành phân tích BIACORE™. Phân tích BIACORE™ xác định tốc độ phân ly, kd. Ái lực liên kết (KD) giữa kháng thể và đích của nó là hàm số của các hằng số động học về kết hợp (tốc độ kết hợp, k_a) và phân ly (tốc độ phân ly, kd) theo công thức: $KD = [kd]/[k_a]$. Phân tích BIACORE™ sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt để trực tiếp đo các thông số động học này. CD3 tái tổ hợp của người hoặc khỉ đuôi dài được cố định trực tiếp vào chất nền. CD123 tinh khiết của người hoặc khỉ đuôi dài được bắt giữ và cố định vào chất nền. Tiến trình phân ly theo thời gian được xác định

và tiến hành khớp dữ liệu hai giá trị. Thu được các hằng số và ái lực liên kết bằng cách sử dụng tỷ lệ khớp liên kết 1:1. Các kết quả phân tích BIACORE™ so sánh liên kết với các protein CD123 và CD3 của người so với của khỉ cynomologus được thể hiện trên Fig.18. Ái lực liên kết với protein CD123 (Fig.18D) và CD3 (Fig.18B) của khỉ đuôi dài là tương đương với ái lực liên kết đối với các protein CD123 (Fig.18C) và CD3 (Fig.18A) của người.

Ví dụ 14

Suy kiệt bạch cầu đơn nhân to tự thân *in vitro* với các PBCM của người và khỉ đuôi dài

Các PBMC từ mẫu máu toàn phần của người hoặc khỉ đuôi dài được cho vào các đĩa đáy chữ U ở mật độ tế bào 200.000 tế bào/lỗ trong 150 µL môi trường thử nghiệm. Pha loãng các kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A hoặc DART-A w/ABD) trong môi trường thử nghiệm. 50 µL mỗi pha loãng của DART-A hoặc DART-A w/ABD được thêm vào đĩa chứa các PBMC trong các lỗ lặp lại hai lần. Ủ các đĩa này trong khoảng thời gian từ 18 đến 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sử dụng các dịch nổi trên bề mặt để xác định độ gây độc tế bào như nêu ở trên. Như được thể hiện trên Fig.19 (đồ thị A và đồ thị B), nhận thấy có sự suy kiệt các tế bào pDC ở cả PBMC của người (Fig.19, Đồ thị A) và khỉ đuôi dài (Fig.19, Đồ thị B). Các kết quả này cho thấy là pDC trong máu có thể được sử dụng làm chỉ thị được lực học cho các nghiên cứu độc tính tiền lâm sàng ở khỉ đuôi dài.

Nếu cần thực hiện lặp lại ví dụ này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể, trong giới hạn hợp lý và chấp nhận được, thay đổi quy trình mô tả ở trên theo cách thích hợp để lặp lại các kết quả đã đề cập. Do đó, quy trình nêu làm ví dụ không này cần phải tuân thủ theo cách thực sự nghiêm ngặt.

Ví dụ 15

Suy kiệt tế bào tua tương bào huyết ở khỉ đuôi dài được điều trị bằng kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A)

Là một phần của nghiên cứu độc tính xác định khoảng liều dùng, khỉ đuôi dài được cho dùng kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) bằng cách truyền trong 4 ngày ở các liều dùng 0,1, 1, 10, 30 100, 300, hoặc

1000 ng/kg. DART đối chứng được sử dụng ở liều dùng 100 ng/kg. Để nhận biết các pDC và quần thể tế bào bạch cầu đơn nhân to trong PBMC của khỉ đuôi dài, các tế bào được đánh dấu bằng kháng thể CD14-FITC. Các bạch cầu đơn nhân to được nhận biết là quần thể CD14⁺ và các pDC được nhận biết là quần thể CD14⁻CD123⁺. Như được thể hiện trên Fig.20, đồ thị K và đồ thị L, các pDC bị suy kiệt 4 ngày sau khi truyền DART-A ở liều thấp 10 ng/kg. Không nhận thấy có sự suy kiệt pDC ở khỉ được điều trị bằng kháng thể đối đặc hiệu kép đối chứng-(DART đối chứng) hoặc khỉ được điều trị bằng chất dẫn thuốc + chất mang ở thời điểm 4 ngày này (Fig.20, tương ứng các đồ thị G, H, C và D). Xác định nồng độ xytokin của interferon-gamma, TNF-alpha, IL6, IL5, IL4 và IL2 ở 4 giờ sau khi truyền. Có sự tăng rất ít hoặc không tăng đối với nồng độ xytokin ở các con khỉ được điều trị bằng DART-A so với các con khỉ được điều trị bằng DART đối chứng hoặc chất dẫn thuốc.

Fig.21 và Fig.22 thể hiện các kết quả phân tích FACS của các tế bào B (CD20⁺) (Fig.21, Đồ thị A), các bạch cầu đơn nhân to (CD14⁺) (Fig.21, Đồ thị B), các tế bào giết tự nhiên (NK) (CD159⁺CD16⁺) (Fig.21, Đồ thị C), pDC (CD123^{HI}, CD14⁻) (Fig.21, Đồ thị D), và các tế bào T (tổng cộng, CD4⁺, và CD8⁺) (tương ứng Fig.22, Đồ thị A, Fig.22, Đồ thị B, và Fig.22, Đồ thị D).

Việc điều trị cho các con khỉ bằng DART đối chứng không có tác dụng đáng kể đến các lympho bào T hoặc B, các tế bào NK, các bạch cầu đơn nhân to và pDC. Việc điều trị cho các con khỉ bằng DART-A ở liều dùng 10 ng/kg/ngày hoặc cao hơn làm tiêu huỷ các pDC (Fig.21, Đồ thị D). Khi độ suy kiệt pDC là hoàn toàn và kéo dài, quay trở lại mức trước khi dùng thuốc vài tuần sau khi ngừng điều trị. Nồng độ trong máu của các lympho bào T giảm đi khi sử dụng DART-A, nhưng quay trở lại mức trước khi dùng thuốc vào cuối mỗi tuần điều trị, điều này gợi ý rằng các thay đổi là về mặt vận chuyển chứ không phải sự gây suy kiệt thực sự. Lympho bào T CD4 và CD8 đều có kiểu biểu hiện như nhau. Chỉ thị hoạt hoá lympho bào T, CD69 (Fig.22, Đồ thị C), chỉ ở mức gần dương tính ở các tế bào trong máu và không phát hiện được khi điều trị bằng DART-A. Mức lympho bào B, bạch cầu đơn nhân to và tế bào NK dao động trong đợt điều trị bằng DART-A với độ biến thiên đáng kể giữa các con khỉ. Xu hướng tăng nồng độ trong máu của lympho bào B và bạch cầu đơn nhân to được thấy ở cả hai con khỉ ở liều dùng cao nhất.

Tóm lại, các kết quả trên chứng tỏ hiệu lực trị liệu của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A). Kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) này có thể được sử dụng làm chất trị liệu để điều trị nhiều loại bệnh và tình trạng bệnh, bao gồm: bệnh AML, bệnh ABL (ALL), bệnh CLL, bệnh MDS, bệnh pDCL, bệnh bạch cầu tế bào Mantle, bệnh bạch cầu tế bào nhung mao, biến đổi Richter của bệnh CLL, con tế bào non ác tính của bệnh CML, bệnh BLL (phân nhóm CD123+) (xem Ví dụ 2); bệnh luput tự miễn (SLE), dị ứng (các bạch cầu ưa kiềm là CD123+), bệnh hen, v.v.

Ví dụ 16

Các tính chất tương đương của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự (DART-A) và kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 không được làm tối ưu trình tự (DART-B)

Lợi ích bất ngờ và các tính chất của kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 được làm tối ưu trình tự

Như đề cập ở trên, DART-A và DART-B được thiết kế tương tự nhau và polypeptit thứ nhất của hai cấu trúc này bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}), tác nhân liên kết 2, miền vòng xoắn E, và đầu tận C. Tương tự, polypeptit thứ hai của hai cấu trúc này bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}), peptit liên kết can thiệp (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}), tác nhân liên kết 2, miền vòng xoắn K và đầu tận C.

Như chỉ ra trong Ví dụ 1, cả hai kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 đều được xác định là có khả năng liên kết đồng thời với CD3 và CD123. Ngoài ra, như được đề cập trong Ví dụ 3 và trên Fig.4, đồ thị C và đồ thị D, hai kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 này thể hiện khả năng tiêu diệt định hướng lại mạnh với nồng độ cần để đạt 50% hoạt tính tối đa (EC_{50}) ở khoảng nồng độ dưới ng/mL, bất kể tính đặc hiệu liên kết epitop CD3 (DART-A so với DART-B) ở các dòng tế bào đích với mức biểu hiện CD123 cao. Do đó, các thay đổi không đáng kể ở trình tự cụ thể của các

kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 này không loại bỏ hoàn toàn hoạt tính sinh học.

Tuy nhiên, trong tất cả các dòng tế bào được thử nghiệm, DART-A được xác định là có hoạt tính hơn và tác dụng tiêu diệt được định hướng lại mạnh hơn so với DART-B (xem, ví dụ, Fig.4, các đồ thị A, C, và D). Do đó, DART-A có lợi ích bất ngờ hơn so với DART-B tương tự.

Ví dụ 17

Dược lý của DART-A ở động vật linh trưởng không phải là người để điều trị các bệnh ác tính liên quan đến máu

Chuỗi alpha thụ thể intolokin 3 (IL-3), CD123, được biểu hiện quá mức trên các tế bào ác tính ở nhiều loại bệnh ác tính liên quan đến máu (“Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematological Malignancies”, *Haematologica* 86:1261-1269, (2001) của Munoz, L. et al.; “CD123 Is A Membrane Biomarker and A Therapeutic Target In Hematological Malignancies” *Biomark. Res.* 2:4, (2014) của Testa, U. et al.) và có liên quan đến sự tiên lượng xấu của bệnh (“High Levels Of CD34+CD38low/-CD123+ Blasts Are Predictive Of An Adverse Outcome In Acute Myeloid Leukemia: A Groupe Ouest-Est Des Leucemies Aigues Et Maladies Du Sang (GOELAMS) Study”, *Haematologica* 96:1792-1798, (2011) của Vergez, F. et al.). Hơn nữa, CD123 đã được báo cáo là có biểu hiện ở tế bào gốc bệnh bạch cầu (LSC) (“The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells”, *Leukemia* 14:1777-1784, (2000) của Jordan, C.T. et al.; “Monoclonal Antibody-Mediated Targeting Of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells” *Cell Stem Cell* 5:31-42, (2009) của Jin, L. et al.), đây là dấu hiệu hấp dẫn giúp nhắm đích nguyên nhân gốc rễ của các bệnh này. Nhất quán với kết luận này, CD123 cũng tham gia vào vòng lặp tự tiết IL-3 duy trì sự cảm ứng và phát triển bệnh bạch cầu, như được thể hiện bởi khả năng của kháng thể đơn dòng phong bế CD123 trong việc làm giảm sự ghép tế bào gốc bệnh bạch cầu và cải thiện khả năng sống sót ở mô hình chuột nhắt bị bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML) (“Monoclonal Antibody-Mediated Targeting Of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells”, *Cell Stem Cell* 5:31-42, (2009) của Jin, L. et al.). Tuy nhiên, trong nghiên

cứu pha 1 ở các bệnh nhân AML nguy cơ cao, kháng thể đơn dòng này không thể hiện hoạt tính kháng bệnh bạch cầu (“A Phase I Study Of Anti-CD123 Monoclonal Antibody (mAb) CSL360 Targeting Leukemic Stem Cells (LSC) In AML”, J. Clin. Oncol. 28(Suppl):e13012, (2010) của Roberts, A. W. et al.). Do đó, mong muốn có các phương pháp hướng đích CD123 thay thế, bao gồm các phương pháp làm suy kiệt. Mặc dù CD123 được biểu hiện bởi phân nhóm các tế bào nguồn tạo máu (HPC) bình thường, các tế bào gốc tạo máu (HSC) biểu hiện rất ít cho đến không biểu hiện CD123 (“The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemic Stem Cells”, Leukemia 14:1777-1784, (2000) của Jordan, C.T. et al.; “Regulation Of Th17 Cell Differentiation and EAE Induction By MAP3K NIK”, Blood 113:6603-6610, (2009) của Jin, W. et al.), điều này cho thấy các phương pháp làm suy kiệt tế bào CD123 cho phép khôi phục lại thông qua quá trình tạo máu bình thường.

Tạo điều kiện cho các lympho bào T trong cơ thể bệnh nhân hướng đích các tế bào bệnh bạch cầu là phương pháp trị liệu miễn dịch có triển vọng để điều trị các bệnh ác tính liên quan đến máu. Tiềm năng trị liệu của phương pháp này đã được thử nghiệm bằng cách sử dụng blinatumomab (BiTE gốc kháng thể đặc hiệu kép có khả năng liên kết cả kháng nguyên CD3 và CD19 của tế bào B) ở các bệnh nhân có u bạch huyết tế bào B và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tiền chất B (“Immunopharmacologic Response Of Patients With B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia To Continuous Infusion Of T Cell-Engaging CD19/CD3-Bispecific BiTE Antibody Blinatumomab”, Blood 119:6226-6233, (2012) của Klinger, M. et al.; “Long-Term Follow-Up Of Hematologic Relapse-Free Survival In A Phase 2 Study Of Blinatumomab In Patients With MRD In B-Lineage ALL”, Blood 120:5185-5187, (2012) của Topp, M.S. et al.; “Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate and Prolonged Leukemia-Free Survival”, J. Clin. Oncol. 29:2493-2498, (2011) của Topp, M.S. et al.).

Các phân tử kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 theo sáng chế, như DART-A, bao gồm phương thức dựa trên kháng thể đặc hiệu kép thay thế mà đem lại độ ổn định cải thiện và các đặc tính sản xuất mạnh hơn (“Effector Cell Recruitment

With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis and *In Vivo* B-Cell Depletion”, J. Mol. Biol. 399:436-449, (2010) của Johnson, S. et al.; “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma”, Blood 117:4542-4551, (2011) của Moore, P.A. et al.).

Để chứng tỏ tính ưu việt và độ hữu hiệu của các phân tử kháng thể đôi đặc hiệu kép CD123 x CD3 theo sáng chế, hoạt tính của DART-A nêu trên *in vitro* và ở các mô hình tiền lâm sàng bệnh bạch cầu được khẳng định, và các tính chất được động học, dược lực học và dược lý an toàn của nó ở khỉ đuôi dài (*Macaca fascicularis*) được đánh giá so với DART đối chứng nêu trên (đặc hiệu kép đối với CD3 và fluorescein) hoặc “DART-2 đối chứng” mà đặc hiệu kép đối với CD123 và fluorescein).

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của “DART-2 đối chứng” (CD123VL – Tác nhân liên kết– 4-4420VH – Tác nhân liên kết– vòng xoắn E; các tác nhân liên kết được gạch chân) (SEQ ID NO:58):

```
DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLN NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVKLDETGG GLVQPGRPML LSCVASGFTF
SDYWMNWVRQ SPEKGLEWVA QIRNKPYNYE TYYSDSVKGR FTISRDDSKS
SVYLGQMNLR VEDMGIIYCT GSYYGMDYWG QGTSVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALKE VAALEKEVAA LEK
```

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai của “DART-2 đối chứng” (4420VL – Tác nhân liên kết– CD123VH – Tác nhân liên kết– vòng xoắn K) (SEQ ID NO:59):

```
DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNER SGVPDRFSGS SSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT
DYYMKWVRQA PGQGLEWIGD IIPSNQATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARSH LLRASWFAYW GQGTLLTVSS GCGGGKVAAL
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE
```

ELISA hai chức năng

Đĩa ELISA MaxiSorp (Nunc) phủ IL3R-alpha dễ tan của người hoặc khỉ đuôi dài (0,5 µg/mL) qua đêm trong dịch đệm bicarbonat được phong bế bằng BSA 0,5%; Tween-20 0,1% trong PBS (PBST/BSA) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Đưa các phân tử DART-A vào, tiếp đó thêm lần lượt CD3εδ-biotin của người và Streptavidin HRP (Jackson ImmunoResearch). Phát hiện hoạt tính HRP bằng cách

chuyển hoá cơ chất tetramethylbenzidin (BioFX) trong 5 phút; chấm dứt phản ứng bằng 40 μ L/lỗ dung dịch H₂SO₄ 1% và đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm.

Phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt

Phân tích khả năng liên kết các protein CD3 hoặc CD123 của người và khi đuôi dài của DART-A bằng cách sử dụng BIAcore 3000 (GE, Healthcare) như Johnson, S. et al. mô tả trong tài liệu: (“Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis and *In Vivo* B-Cell Depletion”, J. Mol. Biol. 399:436-449, (2010)) và Moore, P.A. et al. trong (“Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma”, Blood 117:4542-4551, (2011)). Vắn tắt là, các nhóm carboxyl trên chip cảm biến CM5 được hoạt hoá bằng cách tiêm N-etyl-N-(3diethylamino-propyl) carbodiimide 0,2M và N-hydroxy-succinimide 0,05M. Tiêm CD3 hoặc CD123 (1 μ g/ml) dễ tan lên bề mặt CM5 đã hoạt hoá trong natri-acetat 10mM, độ pH = 5,0, ở tốc độ dòng chảy 5 μ L/phút, tiếp đó là etanolamin 1M để khử hoạt hoá. Tiến hành các thử nghiệm liên kết trong HEPES 10mM, độ pH = 7,4, NaCl 150mM, EDTA 3mM và chất hoạt động bề mặt P20 0,005%. Tiến hành tái tạo các bề mặt thụ thể đã cố định bằng cách tiêm theo nhịp glycine 10mM, độ pH = 1,5. Xác định các giá trị KD bằng cách khớp tổng thể các đường cong liên kết vào mô hình liên kết 1:1 Langmuir (phần mềm BIAevaluation v4.1).

Thử nghiệm tiêu diệt tế bào

Các dòng tế bào dùng cho thử nghiệm tiêu diệt tế bào có được từ Thư viện Giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC) (Manassas, VA). Phân lập các PBMC từ máu đối tượng cho khoẻ mạnh bằng cách sử dụng bộ kit Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare); tinh chế các tế bào T bằng bộ kit chọn lọc âm tính (Life Technologies). Xác định mật độ bề mặt tế bào CD123 bằng cách sử dụng các hạt Quantum Simply Cellular (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Tiến hành các thử nghiệm về tính gây độc tế bào theo Moore, P.A. et al. mô tả trong tài liệu: “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma”, Blood 117:4542-4551, (2011). Vắn tắt là, các dòng tế bào đích (10⁵ tế bào/mL) được điều trị bằng dịch pha loãng theo bậc của các protein DART-A hoặc DART đối chứng khi có mặt các tế bào T ở tỷ lệ tế bào tác động:tế bào đích chỉ định và ủ ở nhiệt độ

37°C qua đêm. Xác định mức tiêu diệt tế bào dưới dạng mức giải phóng lactat dehydrogenaza (LDH, Promega) trong dịch nổi nuôi cấy. Đối với mức tiêu diệt tế bào dựa trên dòng chảy, các tế bào đích được đánh dấu bằng CMTMR (Life Technologies) và theo dõi sự tiêu diệt tế bào bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng chảy FACSCalibur. Dữ liệu được phân tích bằng sử dụng phần mềm PRISM® 5 (GraphPad) và được trình bày dưới dạng phần trăm gây độc tế bào.

Dược lý ở khi đuôi dài

Tiến hành các thử nghiệm trên động vật linh trưởng không phải là người ở phòng thí nghiệm Charles River Laboratories (Reno, NV), theo hướng dẫn của Hội đồng Chăm sóc và Sử dụng Động vật địa phương (IACUC)'. Khi đuôi dài (*Macaca fascicularis*) gốc Trung quốc, chưa qua thí nghiệm, được nhân giống cho mục đích này (độ tuổi: 2,5-9 tuổi, khoảng cân nặng: 2,7-5 kg) được truyền qua tĩnh mạch chất dẫn thuốc hoặc DART-A qua tĩnh mạch đùi và tĩnh mạch cảnh bằng cách sử dụng bơm truyền lập trình được chạy bằng pin (CADD-Legacy®, SIMS Deltec, Inc., St. Paul, MN). Thu gom các mẫu máu ngoại vi hoặc tuỷ xương trong các ống nghiệm chứa chất chống đông máu ở các thời điểm chỉ định. Tiến hành phân tích kiểu hình bề mặt tế bào bằng máy phân tích LSR Fortessa (BD Biosciences) có trang bị laze có các bước sóng 488nm, 640nm và 405nm và các kháng thể dưới đây: CD4-V450, CD8-V450, CD123-PE-Cy7, CD45-PerCP, CD4-APC-H7, CD8-FITC, CD25-PE-Cy7, CD69-PerCP, PD-1-PE, TIM3-APC, CD3-Pacific Blue, CD95-APC, CD28-BV421, CD16-FITC, CD3-Alexa488, CD38-PE, CD123-PE-Cy7, CD117-PerCP-Cy5.5, CD34-APC, CD90-BV421, CD45RA-APC -H7 và CD33-APC (BD Biosciences). Số lượng tuyệt đối của các tế bào được xác định bằng cách sử dụng TruCOUNT (BD Biosciences). Xác định nồng độ trong huyết thanh của cytokin IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α , và IFN- γ bằng bộ kit Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array dùng cho động vật linh trưởng không phải là người (BD Bioscience). Xác định nồng độ DART-A trong các mẫu huyết thanh khi bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch 'sandwich' có phát hiện điện hoá phát quang (MesoScale Diagnostics, MSD, Rockville, MD). Vắc xin là, đĩa thử nghiệm (MSD) được phủ bằng IL-3 Ra người tái tổ hợp (R&D System) và phong bế bằng BSA 5%. Áp dụng các tiêu chuẩn hiệu chỉnh hoặc các mẫu thử đã pha loãng, tiếp đó bổ sung thêm kháng thể đơn dòng đã được biotinyl hoá có khả năng liên kết đặc hiệu miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34) và miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35) nêu trên

của phân tử A. Thử liên hợp streptavidin được đánh dấu SULFO-TAG™ (MSD) được thêm vào và sự hình thành phức hợp được phân tích trên máy tạo ảnh MSD SECTOR®. Xác định nồng độ DART-A từ các đường cong tiêu chuẩn tạo ra bằng cách khớp dữ liệu cường độ ánh sáng vào mô hình logic năm tham số.

Qua xác định đặc tính hoá lý của DART-A đã tinh chế cho thấy rằng heterodime đồng nhất có phân tử khối bằng 58,9 kDa (Fig.23; Fig.24A-Fig.24B), phân tử này ổn định ở khoảng nhiệt độ từ 2 đến 8°C cho đến 12 tháng trong PBS. Phân tích SPR cho thấy rằng DART-A có ái lực liên kết gần như nhau với các kháng nguyên dễ tan CD3 và CD123 của người và khi đuôi dài (Fig.25A-Fig.25D và Bảng 7). Hơn nữa, DART-A liên kết đồng thời cả hai kháng nguyên dưới hình thức ELISA trong đó sử dụng CD123 người hoặc CD123 khi để bắt giữ và CD3 người để phát hiện (Fig.26A-Fig.26B), và cho thấy sự liên kết tương tự với các lympho bào T của người và khi (Fig.26C-Fig.26E). Dữ liệu trong Bảng 7 là giá trị trung bình của 3 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm được tiến hành hai lần.

Bảng 7 Hằng số phân ly cân bằng (K_D) đối với liên kết của DART-A với CD3 và CD123 của người và khi đuôi dài			
Kháng nguyên	$k_a (\pm SD)$ ($M^{-1} s^{-1}$)	$k_d (\pm SD)$ (s^{-1})	$K_D (\pm SD)$ (nM)
CD3ε/δ của người	$5,7 (\pm 0,6) \times 10^5$	$5,0 (\pm 0,9) \times 10^{-3}$	$9,0 \pm 2,3$
CD3ε/δ của khi đuôi dài	$5,5 (\pm 0,5) \times 10^5$	$5,0 (\pm 0,9) \times 10^{-3}$	$9,2 \pm 2,3$
CD123-His của người	$1,6 (\pm 0,4) \times 10^6$	$1,9 (\pm 0,4) \times 10^{-4}$	$0,13 \pm 0,01$
CD123-His của khi đuôi dài	$1,5 (\pm 0,3) \times 10^6$	$4,0 (\pm 0,7) \times 10^{-4}$	$0,27 \pm 0,02$

DART-A điều tiết quá trình tiêu diệt được định hướng lại bởi các lympho bào T của người hoặc khi đuôi dài

DART-A điều tiết quá trình tiêu diệt tế bào đích được định hướng lại bởi các tế bào tác động của người hoặc khi kháng lại các dòng tế bào bệnh bạch cầu Kasumi-3 CD123+ (Fig.27A-Fig.27D), quá trình này kèm theo việc gây cảm ứng các chỉ thị hoạt hoá. Không thấy có hoạt tính kháng lại các đích âm tính với CD123 (tế bào U937) hoặc với DART đối chứng, điều này cho thấy việc hoạt hoá tế bào T tuyệt đối phụ thuộc vào sự liên kết tế bào đích và liên kết đơn trị của DART-A với CD3 là không đủ để khơi mào sự hoạt hoá tế bào T. Do CD123 được biểu hiện bởi phân nhóm các bạch

cầu trong máu bình thường, bao gồm các pDC và các bạch cầu đơn nhân to (Fig.27E), nên tác dụng của DART-A được khảo sát tiếp trong các PBMC người và khi bình thường.

Thấy có tác dụng phân hạng giữa các PBMC của người, với sự suy kiệt nhanh chóng phụ thuộc liều dùng của các tế bào CD14⁺CD123^{mức cao} (pDC và các bạch cầu ưa kiềm) thấy được ngay ở thời điểm 3 giờ sau khi bắt đầu điều trị, trong khi các bạch cầu đơn nhân to (tế bào CD14⁺) vẫn không bị ảnh hưởng ở thời điểm này (Fig.27F-Fig.27G). Sự suy kiệt các tế bào CD14⁺CD123^{mức cao} gia tăng theo thời gian ở tất cả các nồng độ phân tử DART-A, trong khi các bạch cầu đơn nhân to có giảm nhẹ ở thời điểm 6 giờ và chỉ suy kiệt sau 18 giờ và ở nồng độ cao hơn 1 ng/mL. Việc ủ các PBMC khi với DART-A gây suy kiệt phụ thuộc liều dùng tương đương đối với các tế bào CD14⁺CD123^{mức cao} (Fig.27H), củng cố thêm cho sự thật rằng khi là loại động vật thích hợp để nghiên cứu dược lý của DART-A (các tế bào CD14⁺ của khi biểu hiện rất ít hoặc không biểu hiện CD123 và không bị suy kiệt).

Dược động học của DART-A ở khi đuôi dài

Khi đuôi dài được chọn là mô hình dược lý thích hợp để phân tích DART-A dựa trên sự phân bố tương đương của cả hai kháng nguyên đích ở loài này so với người dựa trên hoá mô miễn dịch bằng các mAb tiền chất, nhất quán với các thông tin đã công bố ("Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies", *Haematologica* 86:1261-1269, (2001) của Munoz, L. et al.; "IL-3 Receptor Expression, Regulation and Function In Cells Of The Vasculature", *Immunol. Cell Biol.* 74:1-7, (1996) của Korpelainen, E.I. et al.).

Nghiên cứu tiến hành theo sáng chế bao gồm 6 nhóm điều trị, mỗi nhóm có 8 con khi đuôi dài (4 đực, 4 cái) (Bảng 8). Tất cả các nhóm này đều được truyền lần thứ nhất là đối chứng chất dẫn thuốc; tiếp đó là chất dẫn thuốc hoặc DART-A được sử dụng qua đường tĩnh mạch cho các đợt điều trị 4 tuần. Nhóm 1 được cho dùng đối chứng chất dẫn thuốc cho tất cả 4 lần truyền sau đó, còn các nhóm từ Nhóm 2 đến Nhóm 5 được truyền DART-A hằng tuần với các liều dùng tăng dần trong 4 ngày mỗi tuần cho tất cả các lần truyền sau đó. Nhóm 6 được điều trị bằng cách truyền DART-A 7 ngày liên tục mỗi tuần với các liều dùng tăng dần cho tất cả các lần truyền sau đó. Phác đồ 4 ngày truyền/3 ngày nghỉ và 7 ngày truyền được thiết kế để phân biệt tác

dụng kéo dài với tác dụng nhất thời liên quan đến việc dùng DART-A. Giết 2 con đực và 2 con cái mỗi nhóm khi kết thúc pha điều trị (Ngày 36), còn mổ xác các con khi còn lại sau thời gian phục hồi 4 tuần (Ngày 65). Phân nhóm các con khi có phát triển kháng thể kháng thuốc (ADA) nhằm kháng lại Fv biến đổi giống như của người của cả CD3 và CD123 và các dữ liệu sau khi xuất hiện ADA bị loại trừ khỏi phân tích PK. Tất cả các con khi đều phơi nhiễm DART-A trong thời gian nghiên cứu.

Bảng 8							
Lần truyền	Ngày nghiên cứu	Chất dẫn thuốc	Truyền DART-A				
			(4 ngày truyền/3 ngày nghỉ) ng/kg/ngày [ng/kg/4 ngày]				
		Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4	Nhóm 5	(7 ngày truyền) ng/kg/ngày [ng/kg/7 ngày] Nhóm 6
1	1	Chất dẫn thuốc	Chất dẫn thuốc	Chất dẫn thuốc	Chất dẫn thuốc	Chất dẫn thuốc	Chất dẫn thuốc
2	8	Chất dẫn thuốc	100 [400]	100 [400]	100 [400]	100 [400]	100 [700]
3	15	Chất dẫn thuốc	100 [400]	300 [1200]	300 [1200]	300 [1200]	300 [2100]
4	22	Chất dẫn thuốc	100 [400]	300 [1200]	600 [2400]	600 [2400]	600 [4200]
5	29	Chất dẫn thuốc	100 [400]	300 [1200]	600 [2400]	1000 [4000]	1000 [7000]
Hồi phục	36-65						

Mô hình hai ngăn được sử dụng để ước tính các thông số PK (Bảng 9 và Fig.28). $T_{1/2\alpha}$ là ngắn (4-5 phút), phản ánh sự liên kết nhanh chóng với các đích có trong máu; $T_{1/2\beta}$ cũng ngắn, như kỳ vọng đối với phân tử có kích cỡ này là sẽ thanh thải qua thận. Phân tích các mẫu huyết thanh được thu gom mỗi lần truyền xong từ các con khi nhóm 6 cho thấy sự gia tăng phụ thuộc liều dùng của $C_{\max}$ DART-A. Trong Bảng 9, chất dẫn thuốc là PBS, độ pH = 6,0, chứa 0,1 mg/mL albumin tái tổ hợp của người, 0,1 mg/mL PS-80, và rượu benzylic 0,24% được sử dụng cho tất cả các lần truyền chất dẫn thuốc trong 4 ngày đầu của mỗi tuần truyền, tiếp đó là vials hỗn hợp này nhưng không có rượu benzylic cho 3 ngày còn lại trong tuần của mỗi tuần truyền. DART-A được sử dụng ở các thời điểm chỉ định bằng cách truyền trong tĩnh mạch liên tục dung dịch chứa PBS, độ pH = 6,0, chứa 0,1 mg/mL albumin tái tổ hợp của người, 0,1 mg/mL PS-80, và rượu benzylic 0,24% ở nồng độ cần thiết.

Bảng 9 Phân tích hai-ngăn các thông số PK của DART-A ở khi đuôi dài		
Thông số	300 ng/kg/ngày (giá trị trung bình $\pm$ SD)	600 ng/kg/ngày (giá trị trung bình $\pm$ SD)
$C_{\max}$ (pg/mL)	77,4 $\pm$ 9,4	113,8 $\pm$ 33,5
AUC (giờ*pg/mL)	7465 $\pm$ 913	11188 $\pm$ 3282
V_{ss} (L/kg)	1,078 $\pm$ 0,511	2,098 $\pm$ 1,846
$t_{1/2}$, alpha (giờ)	0,07 $\pm$ 0,018	0,067 $\pm$ 0,023
$t_{1/2}$, beta (giờ)	13,79 $\pm$ 4,928	21,828 $\pm$ 18,779
MRT (giờ)	6,73 $\pm$ 3,327	9,604 $\pm$ 8,891

Giải phóng xytokin ở khi đuôi dài được điều trị bằng DART-A

Với các tính chất hoạt hoá tế bào T của DART-A, dự đoán được sự gia tăng lượng xytokin trong máu sau khi truyền và do đó liều dùng ban đầu thấp được sử dụng như phương thức “khử nhạy”, dựa trên kinh nghiệm có từ trước với các hợp chất tương tự (xem tài liệu, ví dụ, “Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate and Prolonged Leukemia-Free Survival”, J. Clin. Oncol. 29:2493-2498, (2011) của Topp, M.S. et al.; “Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses of A T Cell-Engaging Antibody”, Science 321:974-977, (2008) của Bargou, R. et al.). Trong số các xytokin được thử nghiệm, IL-6 cho thấy sự thay đổi nhiều nhất khi truyền, mặc dù có bản chất nhất thời về biên độ tối thiểu và có khác nhau nhiều giữa các con vật và giữa các nhóm (Fig.29A-Fig.29C). Cũng thấy có IL-6 tăng nhất thời với mức độ nhỏ sau khi truyền chất dẫn thuốc (toàn bộ Nhóm 1 và tất cả các lần truyền Ngày 1), điều này cho thấy độ nhạy của xytokin này với ứng suất điều khiển. Tuy nhiên, thấy có sự gia tăng IL-6 phụ thuộc DART-A (<80pg/mL) trong huyết thanh ở một số con khi sau khi truyền DART-A lần thứ nhất (100ng/kg/ngày), sự gia tăng này quay trở lại mức cơ sở sau 72 giờ. Thú vị là, biên độ giải phóng IL-6 giảm đi với mỗi lần truyền DART-A sau đó, ngay cả khi liều dùng gia tăng tối đa đến 1000 ng/kg/ngày. Cũng nhận thấy có sự gia tăng TNF- α tối thiểu và nhất thời có liên quan đến DART-A trong huyết thanh (<10pg/mL); như đối với IL-6, nhận thấy có sự giải phóng TNF- α với biên độ lớn nhất sau khi truyền lần thứ nhất. Không có thay đổi liên quan đến DART-A ở nồng độ của IL-5, IL-4, IL-2, hoặc IFN- γ trong suốt thời gian nghiên cứu khi so với các đối chứng.

Kết luận lại, sự giải phóng xytokin đáp ứng với việc điều trị cho các con khi bằng DART-A là tối thiểu, nhất thời và là tác dụng của liều đầu tiên kiểm soát được bằng cách tăng dần liều ở đối tượng.

Sự suy kiệt qua trung gian DART-A của các tế bào bạch cầu CD14⁻/CD123⁺ trong máu *in vivo*

Xác định nồng độ tuyệt đối của các tế bào CD14⁻/CD123⁺ trong máu trong suốt thời gian nghiên cứu như là điểm cuối được lực học. Trong khi số lượng các tế bào CD123⁺ trong Nhóm đối chứng 1 vẫn ổn định theo thời gian, thì việc điều trị bằng DART-A có liên quan đến sự suy kiệt mạnh của các tế bào CD14⁻/CD123⁺ (94-100% so với mức cơ sở trước khi nghiên cứu) thấy được từ thời điểm đầu tiên đo được (72 giờ) sau khi bắt đầu truyền DART-A liều thứ nhất (100 ng/kg/ngày) ở tất cả các con khi trong toàn bộ các nhóm điều trị tích cực (Fig.30A-Fig.30C). Sự suy kiệt này là kéo dài, do kéo dài trong 3 ngày nghỉ không dùng thuốc mỗi tuần ở các nhóm từ Nhóm 2 đến Nhóm 5, chỉ quay trở lại mức cơ sở trong thời gian hồi phục kéo dài. Để loại trừ khả năng DART-A che giấu hoặc điều biến CD123 (trường hợp không thể xảy ra, khi nồng độ DART-A trong máu thấp), đếm số lượng pDC bằng chỉ thị trực giao CD303. Nhất quán với dữ liệu của CD123, pDC CD303⁺ bị suy kiệt tương tự ở khi được điều trị bằng DART-A (Fig.30D-Fig.30F).

Nồng độ lympho bào T trong máu, phân tích hoạt hoá và phân nhóm

Trái ngược với sự suy kiệt kéo dài của các tế bào CD123⁺ trong máu, DART-A được sử dụng theo phác đồ 4 ngày dùng/3 ngày nghỉ (các nhóm từ Nhóm 2 đến Nhóm 5) có liên quan đến sự dao động theo tuần của các tế bào T trong máu, còn khi sử dụng theo phác đồ truyền liên tục 7 ngày thì khiến giảm nồng độ tế bào T trong máu một cách tương tự sau lần dùng thứ nhất, nồng độ này làm hồi phục chậm và không có dao động ngay cả trong thời gian dùng thuốc (Fig.31A- Fig.31C). Sự khác biệt giữa hai phác đồ liều dùng này cho thấy là tác dụng của DART-A lên các tế bào lympho T là do vận chuyển và/hoặc tạo biên độ, chứ không phải do suy kiệt. Sau khi ngừng dùng thuốc, các tế bào T quay trở lại mức nồng độ gấp khoảng 2 lần mức cơ sở trong thời gian hồi phục. Việc truyền DART-A có liên quan đến sự gia tăng tần suất lũy tiến phụ thuộc phơi nhiễm của các tế bào T biểu hiện chỉ thị hoạt hoá muộn, PD-1, cụ thể là ở các tế bào CD4⁺, với liều dùng ở Nhóm 6 biểu hiện mức tổng thể cao nhất (Fig.31D-

Fig.31I và Fig.32A-Fig.32F và Fig.33A-Fig.33F). Tim-3, một chỉ thị có liên quan đến sự suy kiệt tế bào T, không được phát hiện thấy trên các tế bào T CD4⁺ và chỉ ở tần suất thấp trong số các tế bào CD8⁺ (5,5-9,7%) và bao gồm 20,5-35,5% tế bào dương tính kép với CD8⁺/PD-1⁺. Không có sự thay đổi nhất quán đối với chỉ thị hoạt hoá tế bào T sớm, CD69, và chỉ có biến thiên ở mức độ vừa phải đối với sự biểu hiện CD25 ở các tế bào trong máu.

Để loại trừ sự suy kiệt sau khi sử dụng *in vivo*, khả năng gây độc tế bào *ex vivo* của các tế bào tác động đã phân lập từ khi đuôi dài truyền nhiều lần DART-A được so sánh với khả năng này của các tế bào từ khi chưa qua thí nghiệm. Như được thể hiện trên Fig.34, PBMC đã phân lập từ khi được điều trị bằng DART-A thể hiện khả năng gây độc tế bào tương đương với các tế bào đã phân lập từ khi chưa qua thí nghiệm, điều này cho thấy là việc phơi nhiễm DART-A *in vivo* không tác động bất lợi đến khả năng tiêu diệt các tế bào đích của tế bào T.

Sự phơi nhiễm DART-A làm gia tăng tần suất tương đối của các tế bào CD4 ghi nhớ trung ương và các tế bào ghi nhớ tác động CD8⁺ khi sử dụng quần thể tế bào T chưa qua thí nghiệm tương ứng (Fig.35A-Fig.35F và Fig.32A-Fig.32F và Fig.33A-Fig.33F), điều này cho thấy là việc phơi nhiễm DART-A kích thích sự tăng trưởng và/hoặc vận động của các tế bào này.

Tác dụng lên quá trình tạo máu và các tiền chất tủy xương

DART-A dung nạp tốt ở khi ở tất cả các liều dùng đã thử nghiệm; tuy nhiên, nhận thấy có sự giảm thuận nghịch ở các thông số hồng cầu ở liều dùng cao nhất (Fig.36A-Fig.36C). Việc lấy mẫu máu thường xuyên có thể là yếu tố góp phần tiềm ẩn, do các con điều trị bằng chất dẫn thuốc thể hiện sự giảm khối lượng hồng cầu ở mức vừa phải. Nhận thấy có đáp ứng hồng cầu lưới ở tất cả các con khi, ở mức liều sử dụng cao nhất (Nhóm 6), tuy nhiên, đáp ứng này có vẻ không mạnh bằng đáp ứng giảm tương tự ở khối lượng hồng cầu (Fig.36D-Fig.36F). Phân tích hình thái xét nghiệm kính phết tủy xương trong toàn bộ nghiên cứu không cho kết quả đáng chú ý. Tuy nhiên, phân tích đếm tế bào theo dòng chảy cho thấy rằng tần suất các tế bào CD123⁺ trong quần thể tế bào tủy xương âm tính dòng chưa trưởng thành (Lin⁻) giảm đi ở các con khi được điều trị bằng DART-A khi kết thúc đợt điều trị, tần suất này quay trở lại mức cơ sở khi kết thúc thời gian hồi phục (Fig.37A-Fig.37B). HSC (được

xác định là các tế bào Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90+ (“Human Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells Are Increased In Frequency and Myeloid-Biased With Age”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 108:20012-20017), (2011) của Pang, W.W. et al.) cho thấy độ biến thiên lớn giữa các nhóm; Nhóm 4-6 con khi được điều trị bằng DART-A biểu hiện sự giảm rõ rệt hơn so với mức trước khi điều trị tương ứng, tuy nhiên, không nhận thấy sự giảm ở tất cả các nhóm điều trị so với các con khi được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Dữ liệu này cho thấy là HSC kém nhạy với việc hướng đích bởi DART-A và nhất quán với dữ liệu thuận nghịch đã thấy được về các tác động bất lợi khi điều trị bằng DART-A đến quá trình tạo máu.

Như đã thấy ở trên, khi truyền trong 4 tuần theo phác đồ 4 ngày truyền/3 ngày nghỉ hằng tuần hoặc phác đồ 7 ngày truyền ở liều bắt đầu là 100ng/kg/ngày sau đó tăng dần hằng tuần lên 300, 600, và 1.000ng/kg/ngày, việc sử dụng DART-A cho khi đuôi dài có sự dung nạp tốt. Nhận thấy có sự suy kiệt các tế bào CD123+ trong máu, bao gồm các pDC, sau khi bắt đầu dùng lần đầu và kéo dài trong toàn bộ nghiên cứu ở tất cả các liều dùng và phác đồ. Cũng thấy có sự giảm hồi phục được của tiền chất CD123+ tuỷ xương. Sự giải phóng xytokin, là mối quan ngại về tính an toàn đáng kể nhất đối với liệu pháp hướng đích CD3, dường như có thể kiểm soát được và nhất quán với tác dụng của liều dùng đầu tiên. Nhận thấy có hiện tượng thiếu máu hồi phục được ở mức vừa phải ở liều dùng cao nhất, nhưng không thấy có sự kiện bất lợi nào khác (trúng đích hoặc sai đích).

Khi đuôi dài là mô hình động vật thích hợp để đánh giá dược lý DART-A, do tính tương đồng cao giữa các gen đồng đẳng và khả năng của DART-A trong việc liên kết với các kháng nguyên với ái lực tương tự và điều tiết quá trình tiêu diệt định hướng lại đối với tế bào T ở cả hai loài. Hơn nữa, cả hai kháng nguyên này đều được biểu hiện một cách phù hợp ở khi và người, bao gồm sự biểu hiện tương tự bởi các tiền chất tạo máu và trong bào tương nội mạc của nhiều mô. Các trường hợp ngoại lệ thứ yếu là biểu hiện ở các tế bào Leydig tinh hoàn ở người nhưng không biểu hiện ở khi và biểu hiện CD123 ở mức rất thấp cho đến không biểu hiện ở các bạch cầu đơn nhân to của khi so với người.

Mối quan ngại chủ yếu liên quan đến các phương pháp trị liệu có hoạt hoá tế bào T bao gồm sự giải phóng các xytokin và các tác dụng gây độc tính tế bào sai đích. Một nghiên cứu gần đây với cấu trúc dung hợp miễn dịch scFv đặc hiệu kép

CD3xCD123 có khả năng nhận biết CD3 hoá trị hai cho thấy hoạt tính kháng bệnh bạch cầu *in vitro*, nhưng gây hoạt hoá không đặc hiệu các tế bào T và tiết ra IFN- γ (“Engineering A CD123xCD3 Bispecific scFv Immunofusion For The Treatment Of Leukemia and Elimination Of Leukemia Stem Cells”, Protein Eng. Des. Sel. 25:561-569, (2012) của Kuo, S.R. et al.). Bản chất đơn trị của mỗi nhánh liên kết và dạng monome đồng nhất cao của DART-A đảm bảo rằng việc hoạt hoá tế bào T chỉ phụ thuộc vào sự liên kết tế bào đích: không thấy có sự hoạt hoá tế bào T khi không có các tế bào đích hoặc khi sử dụng phân tử DART đối chứng chỉ có một nhánh hướng đích CD3. Ngoài ra, các liều dùng cao (lên đến 100ug/kg/ngày) của phân tử DART đối chứng không khơi mào sự giải phóng xytokin ở khi đuôi dài.

Liều dùng bắt đầu của phân tử DART-A 100ng/kg/ngày được dung nạp tốt, với sự giải phóng xytokin ở mức tối thiểu. Tuy nhiên, có sự giải phóng ồ ạt xytokin khi liều dùng bắt đầu cao (5 μ g/kg/ngày); tuy nhiên, liều dùng này có thể đạt được một cách an toàn bằng cách tăng dần liều hằng tuần, điều này cho thấy việc giải phóng xytokin qua trung gian DART-A dường như chủ yếu là tác dụng của liều đầu tiên. Sự suy kiệt các tế bào đích CD123+, từ đó loại bỏ nguồn kết nối CD3, có thể giải thích cho tác dụng của liều dùng đầu tiên: nhận thấy có sự suy kiệt gần như hoàn toàn tế bào CD123+ ở các liều dùng thấp trong khoảng 3-10ng/kg/ngày, điều này cho thấy rằng việc giải phóng xytokin *in vivo* là theo đáp ứng liều dùng có chuyển dịch so với tính gây độc tế bào. Profin đáp ứng liều dùng đối với tính gây độc tế bào và giải phóng xytokin bởi các tế bào T của người cũng nhất quán với kết quả quan sát này.

Khử nhạy tế bào T, trong đó việc điều hoà tăng PD1 do DART-A cảm ứng có vai trò nhất định, dường như cũng góp phần làm hạn chế sự giải phóng xytokin khi truyền liều đầu tiên của DART-A. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy rằng sự biểu hiện PD-1 tăng sau khi bắt giữ các tế bào T cảm ứng bởi kháng nguyên ở các vị trí viêm góp phần, thông qua các tương tác với PD-L1, làm chấm dứt tín hiệu ngừng, từ đó giải phóng và khử nhạy các tế bào này (“Tuning Of Antigen Sensitivity By T Cell Receptor-Dependent Negative Feedback Controls T Cell Effector Function In Inflamed Tissues”, Immunity 40:235-247, (2014) của Honda, T. et al.; “Strength Of PD-1 Signaling Differentially Affects T-Cell Effector Functions”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 110:E2480-E2489, (2013) của Wei, F. et al.). Đối ứng của PD-1 - cường độ tín hiệu TCR là không đồng đều: trong khi sự tăng sinh và sản sinh xytokin dường

như nhạy nhất với sự ức chế PD-1, thì tính gây độc tế bào lại ít bị ảnh hưởng nhất (“Strength Of PD-1 Signaling Differentially Affects T-Cell Effector Functions”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 110:E2480-E2489, (2013) của Wei, F. et al.). Nhất quán là, tiềm năng gây độc tế bào ex vivo của các tế bào T từ khi đã truyền nhiều lần DART-A là tương đương với tiềm năng này của các tế bào T từ khi chưa qua thí nghiệm, mặc dù nồng độ PD-1 có tăng ở khi được điều trị bằng DART-A. Hơn nữa, việc điều hoà tăng PD-1 không kèm theo sự biểu hiện TIM3, dấu ấn cho sự suy kiệt tế bào T, như đã được thể hiện đối với các tế bào T bị kích thích kéo dài bằng các kháng thể CD3 hoặc các lây nhiễm mạn tính (“T Cells From Patients Successfully Treated with OKT3 Do Not React With The T-Cell Receptor Antibody”, *Hum. Immunol.* 26:123-129; Wherry, E.J. (2011) “T Cell Exhaustion”, *Nat. Immunol.* 12:492-499, (1989) của Gebel, H.M. et al.).

Sự suy kiệt các tế bào CD123+ trong máu ở các con khi được điều trị bằng DART-A là nhanh chóng và kéo dài trong các ngày nghỉ không dùng thuốc trong tuần ở phác đồ 4 ngày dùng/3 ngày nghỉ, nhất quán với quá trình thải loại tế bào đích. Trái lại, các dao động nhất thời của các tế bào T trong máu có thể là do hậu quả của việc vận chuyển từ/đến các mô và các cơ quan lympho bào phụ thuộc vào nồng độ của DART-A. Việc sử dụng DART-A kích thích sự tăng trưởng và/hoặc vận động của các lympho bào T đã tiếp xúc kháng nguyên, các tế bào ưu tiên cư trú trong mô và dễ tác động hơn đến chức năng tác động gây độc tế bào (“Physiologic and Aberrant Regulation Of Memory T-Cell Trafficking By The Costimulatory Molecule CD28”, *Blood* 109:2968-2977, (2007) của Mirenda, V. et al.; “Memory T-Cell Trafficking: New Directions For Busy Commuters”, *Immunology* 130:158-165, (2010) của Marelli-Berg, F.M. et al.).

Sự suy kiệt các tế bào bình thường CD123+ có thể có vai trò tiềm ẩn. Các pDC và bạch cầu ưa kiềm biểu hiện CD123 ở mức cao, so với các mức thấp ở bạch cầu đơn nhân to và bạch cầu ưa eosin (“Reciprocal Inhibition Of Binding Between Interleukin 3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor To Human Eosinophils”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:7022-7026, (1989) của Lopez, A.F. et al.; “Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies”, *Haematologica* 86:1261-1269, (2001) của Munoz, L. et al.; “Characterization Of Myeloid And Plasmacytoid Dendritic Cells In Human Lung”, J.

Immunol. 177:7784-7793, (2006) của Masten, B.J. et al.; “Interferon-Gamma Upregulates Interleukin-3 (IL-3) Receptor Expression In Human Endothelial Cells and Synergizes With IL-3 In Stimulating Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Cytokine Production”, Blood 86:176-182, (1995) của Korpelainen, E.I. et al.). Các pDC đã cho thấy là có vai trò kiểm soát một số virus ở mô hình chuột nhắt hoặc khi có lây khuẩn, mặc dù chúng dường như không có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát đáp ứng miễn dịch với bệnh cúm (“Specificity and Function Of Immunoglobulin Superfamily NK Cell Inhibitory and Stimulatory Receptors”, Immunol. Rev. 155:127-133, (1997) của Colonna, M. et al.; “Plasmacytoid Dendritic Cells Inhibit Pulmonary Immunopathology and Promote Clearance Of Respiratory Syncytial Virus”, J. Exp. Med. 203:1153-1159, (2006) của Smit, J.J. et al.). Ở các mô hình khối u, pDC có thể kích thích sự phát triển và di căn khối u, trong khi sự suy kiệt pDC lại ức chế khối u (“Depletion Of Plasmacytoid Dendritic Cells Inhibits Tumor Growth and Prevents Bone Metastasis Of Breast Cancer Cells”, J. Immunol. 189:4258-4265, (2012) của Sawant, A. et al.). Nhận thấy có hiện tượng sung phù mắt không phụ thuộc liều dùng ở mức độ vừa phải và có tính nhất thời ở các con khi được điều trị bằng DART-A; tuy nhiên, không nhận thấy có sự gia tăng nồng độ histamin ở các con khi này hoặc khi bạch cầu ưa kiềm của người bị phân hủy bởi việc tiêu diệt tế bào T qua trung gian DART-A. Sự suy kiệt bạch cầu đơn nhân to có thể kéo theo các nguy cơ lây nhiễm gia tăng; do đó cần phải theo dõi hậu quả của việc suy kiệt pDC, bạch cầu ưa bazơ hoặc bạch cầu ưa eosin ở người.

Các tiền chất tạo máu tủy biểu hiện CD123, như tiền chất tủy bào thông thường (CMP) (“The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells”, Leukemia 14:1777-1784, (2000) của Jordan, C.T. et al.; “Hematopoiesis”, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4:a008250, (2012) của Rieger, M.A. et al.), có thể là đích của DART-A, một giải thích có thể có cho hiện tượng thiếu máu ở mức vừa phải quan sát được sau khi sử dụng DART-A ở liều cao nhất. Đáp ứng hồng cầu lưới tạo hồng cầu dường như xảy ra ở tất cả các mức liều dùng DART-A; tuy nhiên, đối với sự giảm tương ứng ở các thông số hồng cầu, các con khi sử dụng DART-A ở mức cao nhất (Nhóm 6, phác đồ 7 ngày dùng) cho thấy đáp ứng hồng cầu lưới giảm đi, điều này gợi ý hoạt tính gây độc tế bào có thể có

lên tiền chất (ví dụ, CMP). Tác dụng này hồi phục được sau khi ngừng điều trị DART-A, nhất quán với sự khôi phục quần thể tế bào từ HSC âm tính/CD123 thấp dự phòng.

Các phương pháp thay thế để làm suy kiệt các tế bào CD123+ bao gồm kháng thể đơn dòng được tăng cường Fc đặc hiệu CD123 thể hệ thứ hai (“Monoclonal Antibody-Mediated Targeting Of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells”, *Cell Stem Cell* 5:31-42, (2009) của Jin, L. et al.; “A Phase I Study Of Anti-CD123 Monoclonal Antibody (mAb) CSL360 Targeting Leukemia Stem Cells (LSC) In AML”, *J. Clin. Oncol.* 28(Suppl):e13012, (2010) của Roberts, A. W. et al.), độc tố bệnh bạch hầu liên kết IL-3 (“Phase I Clinical Study Of Diphtheria Toxin-Interleukin 3 Fusion Protein In Patients With Acute Myeloid Leukemia And Myelodysplasia”, *Leuk. Lymphoma* 49:543-553, (2008) của Frankel, A. et al.), các tế bào tiêu diệt cảm ứng bởi xytokin (CIK) biểu hiện các thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu CD123 (CAR) (“Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor”, *Br. J. Haematol.* 161:389-401, (2013) của Tettamanti, S. et al.) và các tế bào T CD123 CAR (“Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia and Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells”, *Blood* 123(15): 2343-2354, (2014) của Gill, S. et al.; “T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions and Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukaemia”, *Blood* 122:3138-3148, (2013) của Mardiros, A. et al.). Các tế bào T CAR thể hiện hoạt tính tiêu diệt tế bào non ác tính bệnh bạch cầu *in vitro* mạnh và hoạt tính kháng bệnh bạch cầu ở mô hình khác loài AML lan toả (“T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions and Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukaemia”, *Blood* 122:3138-3148, (2013) của Mardiros, A. et al.). Một nghiên cứu gần đây đã báo cáo sự loại bỏ quá trình tạo máu bình thường ở chuột nhắt NSG được ghép khác loài các tế bào CD34+ của người sau khi chuyển tế bào T CD123 CAR (“Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia and Myeloablation Of Normal Hematopoiesis in Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells”, *Blood* 123(15): 2343-2354, (2014) của Gill, S. et al.), mặc dù các tác giả khác không thấy có tác dụng tương tự *in vitro* hoặc *in vivo* (“Targeting Of

Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor”, Br. J. Haematol. 161:389-401, (2013) của Tettamanti, S. et al.; “Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells *in vivo*”, Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62, (2014) của Pizzitola, I. et al.). Trong các thử nghiệm nêu trên, nhận thấy có sự suy kiệt quần thể các tế bào tiền chất tủy xương CD123+, nhưng đã khôi phục được trong giai đoạn hồi phục, hơn nữa, sự suy kiệt quần thể các tế bào thứ yếu này không dẫn đến những thay đổi về đặc tính tế bào tủy xương hoặc tỷ lệ tế bào hồng cầu:tủy bào (E:M) ở tất cả các liều dùng DART-A đã thử nghiệm. Các khác biệt này nhấn mạnh lợi ích tiềm tàng của DART-A so với các liệu pháp tế bào, do DART-A cung cấp một hệ chuẩn độ dựa vào các tế bào T tự thân trái ngược với các tế bào được tải nạp “siêu tích điện” ex vivo mà có thể khó kiểm soát hơn. CD123 được biểu hiện quá mức ở một vài bệnh ác tính liên quan đến máu, bao gồm bệnh AML, bệnh bạch cầu tế bào nhung mao, bệnh ung thư tế bào tua tương bào huyết non ác tính (BPDCN), phân nhóm bệnh bạch cầu lympho nguyên bào cấp tính tiền tế bào B (B-ALL) và bệnh bạch cầu lympho mạn tính, tế bào Reed-Stenberg, bệnh Hodgkin, cũng như ở hội chứng loạn sản tủy và u tế bào bón toàn thân (“Diagnostic and Therapeutic Advances In Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: A Focus On Hematopoietic Cell Transplantation”, Biol. Blood Marrow Transplant. 19:1006-1012, (2013) của Kharfan-Dabaja, M.A. et al.; “Detection Of Molecular Targets On The Surface Of CD34+/CD38—Stem Cells In Various Myeloid Malignancies”, Leuk. Lymphoma 47:207-222, (2006) của Florian, S. et al.; “Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies”, Haematologica 86:1261-1269, (2001) của Munoz, L. et al.; “Flow Cytometric Analysis Of CD123 Is Useful For Immunophenotyping Classical Hodgkin Lymphoma”, Cytometry B Clin. Cytom. 80:91-99, (2011) của Fromm, J.R.). Hoạt tính được lực dự báo được và profin độ an toàn kiểm soát được thấy ở các động vật linh trưởng không phải là người củng cố thêm cho tính hữu ích lâm sàng và độ hiệu nghiệm của DART-A dưới dạng liệu pháp miễn dịch cho các rối loạn bệnh này.

Tóm lại là, DART-A là phân tử gốc kháng thể liên kết cấu trúc siêu phân tử CD3ε của TCR để định hướng lại các lympho bào T kháng các tế bào biểu hiện CD123, một kháng nguyên được điều hoà tăng ở một vài bệnh ác tính liên quan đến

máu. DART-A liên kết với cả kháng nguyên của người và khi đuôi dài với các ái lực tương tự nhau và định hướng lại các tế bào T của cả hai loài này nhằm tiêu diệt các tế bào CD123+. Các con khi được truyền DART-A 4 hoặc 7 ngày/tuần với liều tăng dần hằng tuần cho thấy có sự suy kiệt các tế bào CD123+ trong máu 72 giờ sau khi bắt đầu điều trị, hiện tượng này kéo dài trong suốt 4 tuần điều trị, không phụ thuộc vào phác đồ liều dùng. Cũng có hiện tượng giảm các tế bào T trong máu, nhưng đã khôi phục về mức cơ sở trước lần tiêm sau đó ở các con khi theo phác đồ liều dùng 4 ngày/tuần, kết quả này phù hợp với quá trình vận động được điều tiết bởi DART-A. Việc sử dụng DART-A làm tăng PD1+ trong máu, nhưng không làm tăng TIM-3+, tế bào T; ngoài ra, phân tích ex vivo các tế bào T từ các con khi được điều trị cho thấy sự phân huỷ tế bào đích đã được định hướng lại không thay đổi, điều này cho thấy không có sự suy kiệt các tế bào T. Độc tính bị giới hạn ở sự giải phóng nhất thời xytokin ở mức tối thiểu sau khi truyền liều đầu tiên DART-A, nhưng không có ở các lần truyền sau đó ngay cả khi liều dùng tăng lên, và sự giảm tối thiểu khôi phục được đối với khối lượng hồng cầu đồng thời với sự giảm các tế bào nguồn tủy xương CD123+. Thử nghiệm lâm sàng DART-A ở các bệnh ác tính liên quan đến máu dường như là được đảm bảo.

Tất cả các tài liệu công bố và patent đề cập trong bản mô tả này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn đến phạm vi như khi từng tài liệu công bố hoặc đơn sáng chế đó được nêu một cách cụ thể và riêng rẽ rằng được kết hợp toàn bộ bằng cách viện dẫn. Mặc dù sáng chế đã được mô tả theo các phương án cụ thể của nó, cần hiểu là có khả năng có các cải biến khác và đơn này nhằm bao gồm cả các thay đổi, ứng dụng hoặc chuyển thể của sáng chế nói chung theo các nguyên tắc của sáng chế và bao gồm những thay đổi so với bản mô tả này như đã biết hoặc nằm trong thực tiễn thông thường thuộc lĩnh vực của sáng chế và có thể được ứng dụng cho các dấu hiệu cơ bản nêu trong bản mô tả này ở trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đôi được làm tối ưu trình tự có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123 và với epitop của CD3, trong đó kháng thể đôi này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, được liên kết cộng hoá trị với nhau, trong đó:

A. Chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C:

i. Miền 1, bao gồm:

(1) miền phụ (1A), miền này bao gồm miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:21); và

(2) miền phụ (1B), miền này bao gồm miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VH_{CD123}) (SEQ ID NO:26),

trong đó miền phụ 1A và miền phụ 1B nêu trên được phân cách với nhau bởi tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:29);

ii. Miền 2, trong đó miền 2 này là miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34) hoặc miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35), trong đó miền 2 này được phân cách với miền 1 nêu trên bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:30); và

B. Chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm, từ đầu tận N đến đầu tận C:

i. Miền 1, bao gồm:

(1) miền phụ (1A), miền này bao gồm miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD123 (VL_{CD123}) (SEQ ID NO:25); và

(2) miền phụ (1B), miền này bao gồm miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:22),

trong đó miền phụ 1A và miền phụ 1B nêu trên được phân cách với nhau bởi tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:29);

ii. Miền 2, trong đó miền 2 này là miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35) hoặc miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34), trong đó miền 2 này được phân cách với miền 1 bằng tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:30); và trong đó miền 2 này của chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên không đồng thời là miền vòng xoắn E hoặc miền vòng xoắn K;

và trong đó:

- (a) miền VL của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên và miền VH của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên tạo thành miền liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD3; và
- (b) miền VL của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên và miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên tạo thành miền liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123.
2. Kháng thể đôi theo điểm 1, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên còn bao gồm miền liên kết albumin (SEQ ID NO:36) được liên kết với miền 2 nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:31).
3. Kháng thể đôi theo điểm 1, trong đó chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên còn bao gồm miền 3 bao gồm miền CH2 và CH3 của miền Fc globulin miễn dịch (SEQ ID NO:37), trong đó miền 3 này được liên kết với miền 1 nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:33).
4. Kháng thể đôi theo điểm 1, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên còn bao gồm miền 3 bao gồm miền CH2 và CH3 của miền Fc globulin miễn dịch (SEQ ID NO:37), trong đó miền 3 này được liên kết với miền 1 nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:33).
5. Kháng thể đôi theo điểm 1, trong đó chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên còn bao gồm miền 3 bao gồm miền CH2 và CH3 của miền Fc globulin miễn dịch (SEQ ID NO:37), trong đó miền 3 này được liên kết với miền 2 nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:32).
6. Kháng thể đôi theo điểm 1, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên còn bao gồm miền 3 bao gồm miền CH2 và CH3 của miền Fc globulin miễn dịch (SEQ ID NO:37), trong đó miền 3 này được liên kết với miền 2 nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit (SEQ ID NO:32).
7. Kháng thể đôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 6, trong đó kháng thể đôi này còn bao gồm chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm miền CH2 và CH3 của miền Fc globulin miễn dịch (SEQ ID NO: 11).
8. Kháng thể đôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 7, trong đó kháng thể đôi này còn bao gồm peptit chứa xystein (SEQ ID NO: 55) ở đầu tận N đối với miền CH2

và CH3 của miền Fc globulin miễn dịch.

9. Kháng thể đôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó miền 2 của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên là miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35) và miền 2 của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên là miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34).

10. Kháng thể đôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó miền 2 của chuỗi polypeptit thứ nhất nêu trên là miền vòng xoắn E (SEQ ID NO:34) và miền 2 của chuỗi polypeptit thứ hai nêu trên là miền vòng xoắn K (SEQ ID NO:35).

11. Kháng thể đôi theo điểm bất kỳ nêu trên, trong đó kháng thể đôi này có khả năng phản ứng chéo với các protein CD123 và CD3 của người cũng như của động vật linh trưởng.

12. Kháng thể đôi đặc hiệu kép có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123 và với epitop của CD3, trong đó kháng thể đôi này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, được liên kết cộng hoá trị với nhau, trong đó kháng thể đôi đặc hiệu kép này bao gồm:

- A. Chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:1; và
- B. Chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3;

trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai này được liên kết cộng hoá trị với nhau bằng liên kết disulfua.

13. Kháng thể đôi đặc hiệu kép có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123 và với epitop của CD3, trong đó kháng thể đôi này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, được liên kết cộng hoá trị với nhau, và còn bao gồm chuỗi polypeptit thứ ba, trong đó: kháng thể đôi đặc hiệu kép này bao gồm:

- A. Chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:13;
- B. Chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:15; và
- C. Chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:54,

trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai nêu trên được liên kết cộng hoá trị với nhau bằng liên kết disulfua.

14. Kháng thể đôi đặc hiệu kép có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của CD123 và với epitop của CD3, trong đó kháng thể đôi này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, được liên kết cộng hoá trị với nhau, và còn bao gồm chuỗi polypeptit thứ ba, trong đó kháng thể đôi đặc hiệu kép này bao gồm:

- A. Chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:17;
- B. Chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:1; và
- C. Chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:54,

trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai nêu trên được liên kết cộng hoá trị với nhau bằng liên kết disulfua.

15. Dược phẩm chứa kháng thể đôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 và chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý.

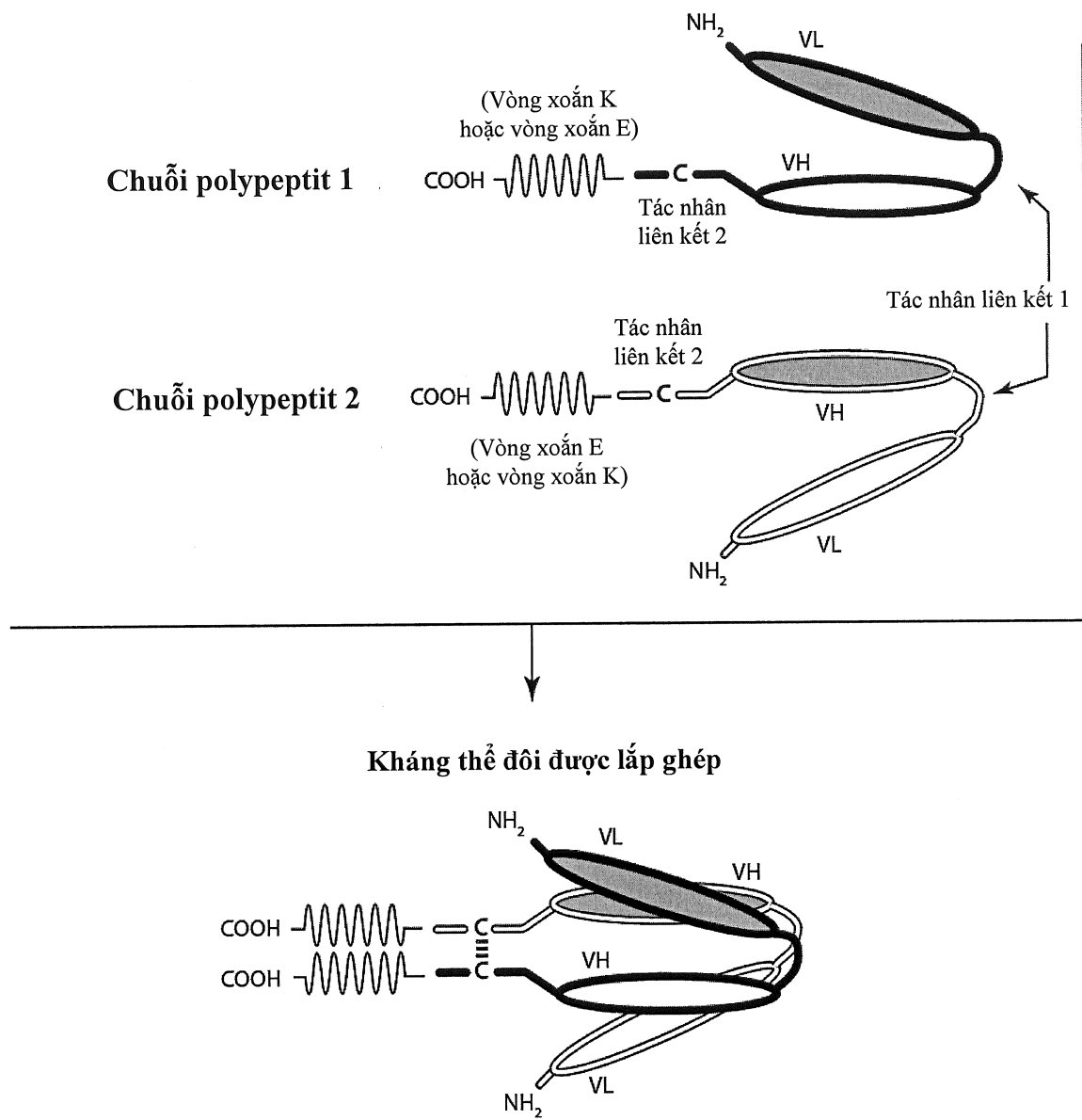


Fig.2

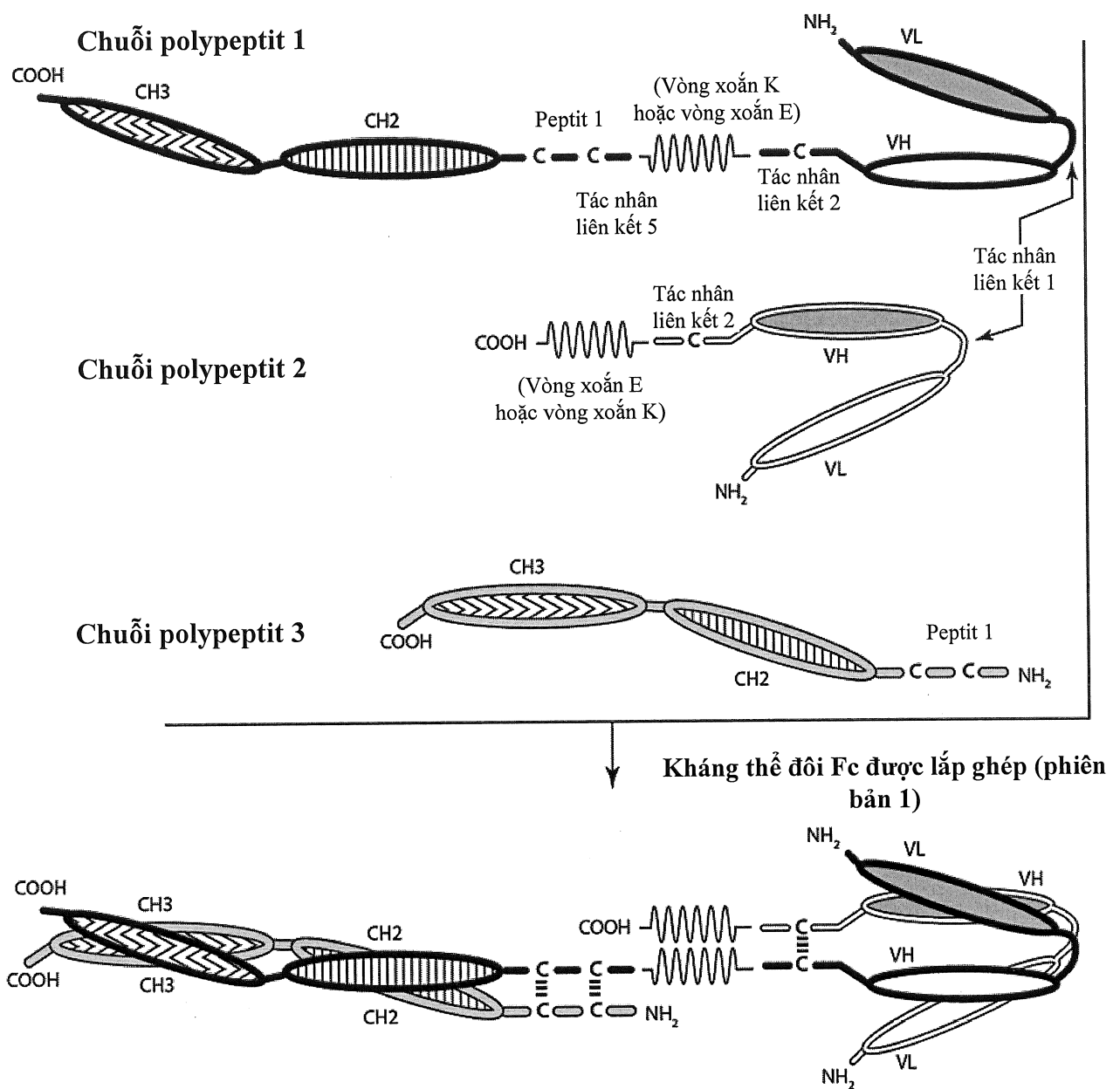


Fig.3A

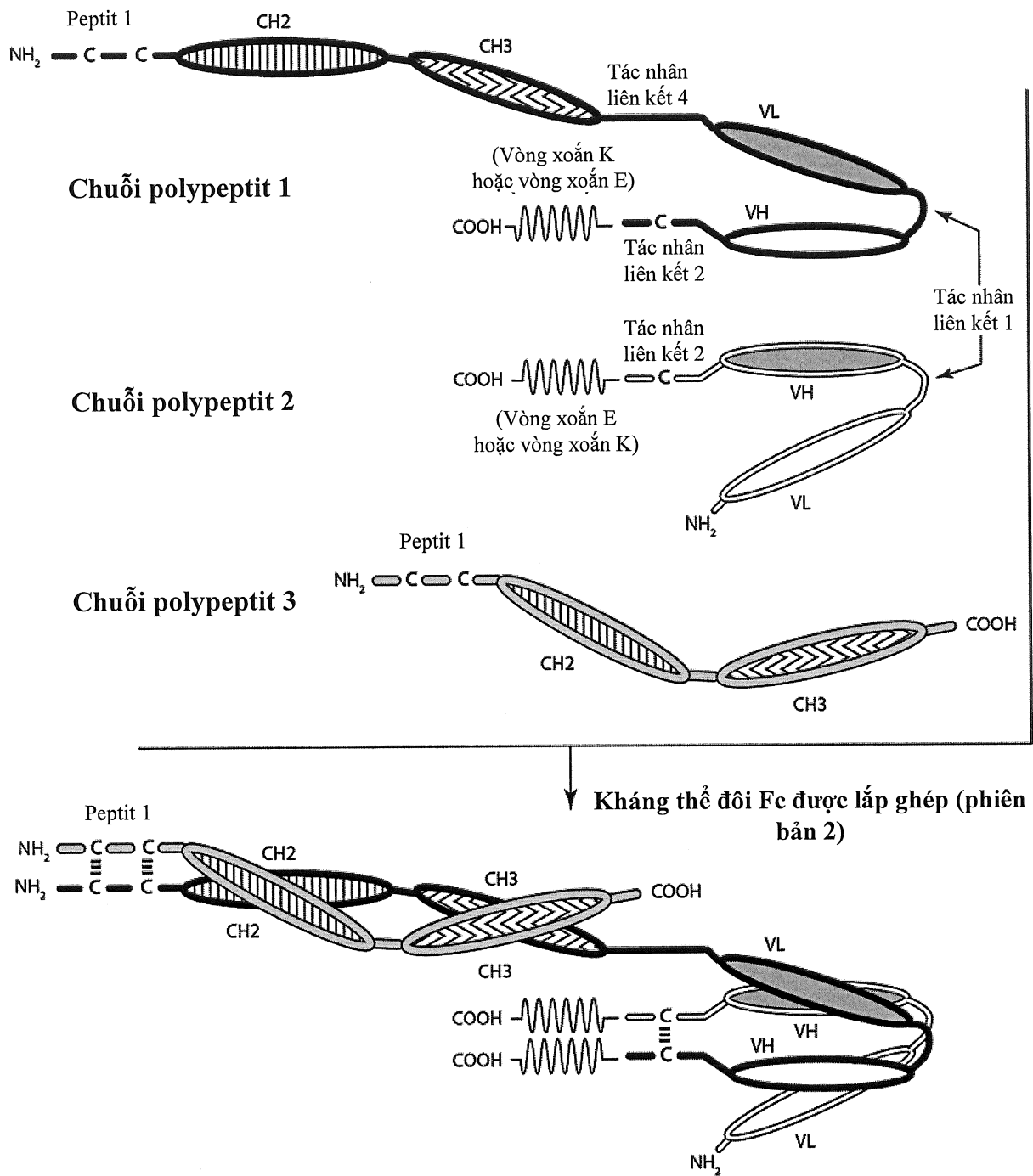


Fig.3B

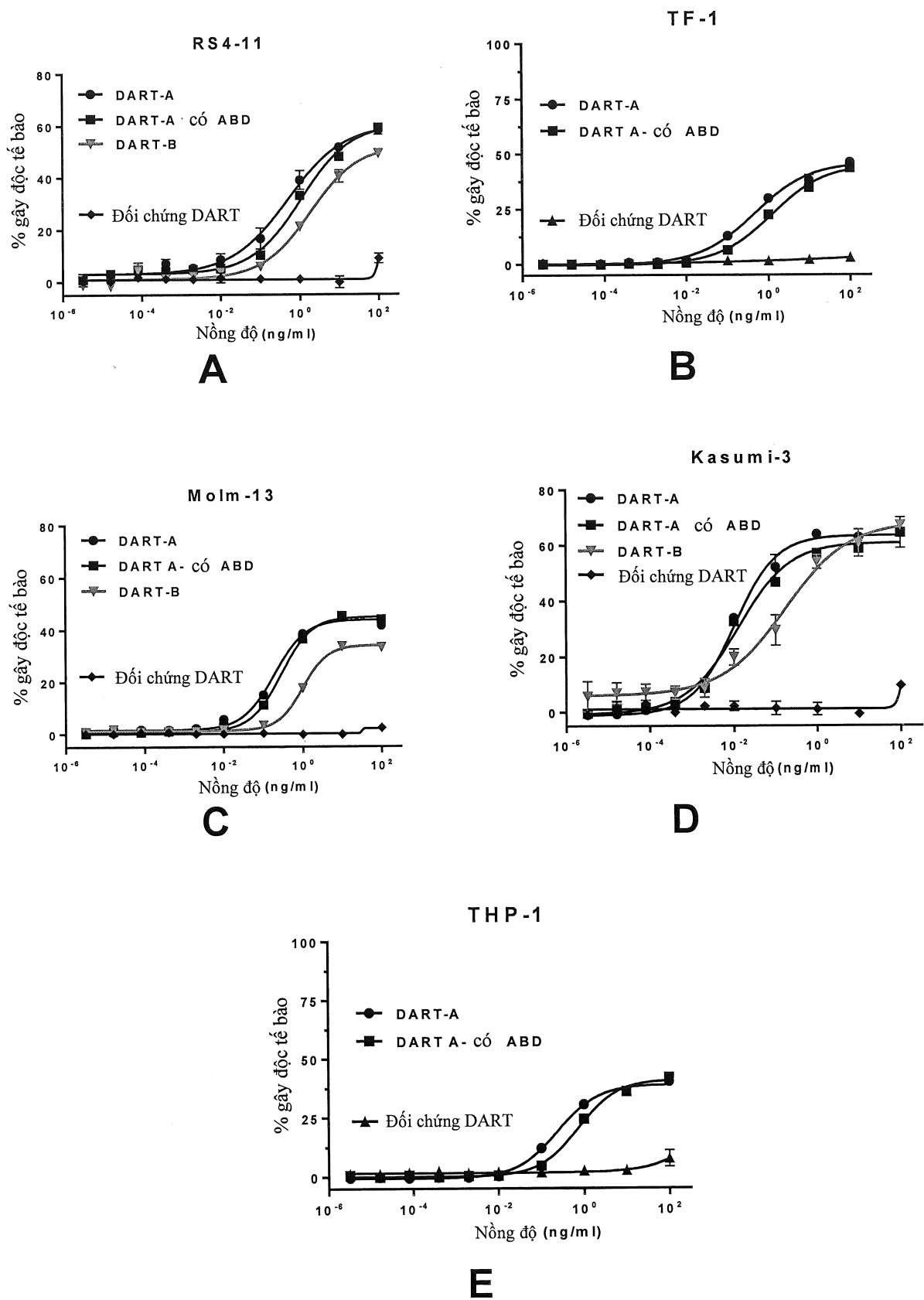
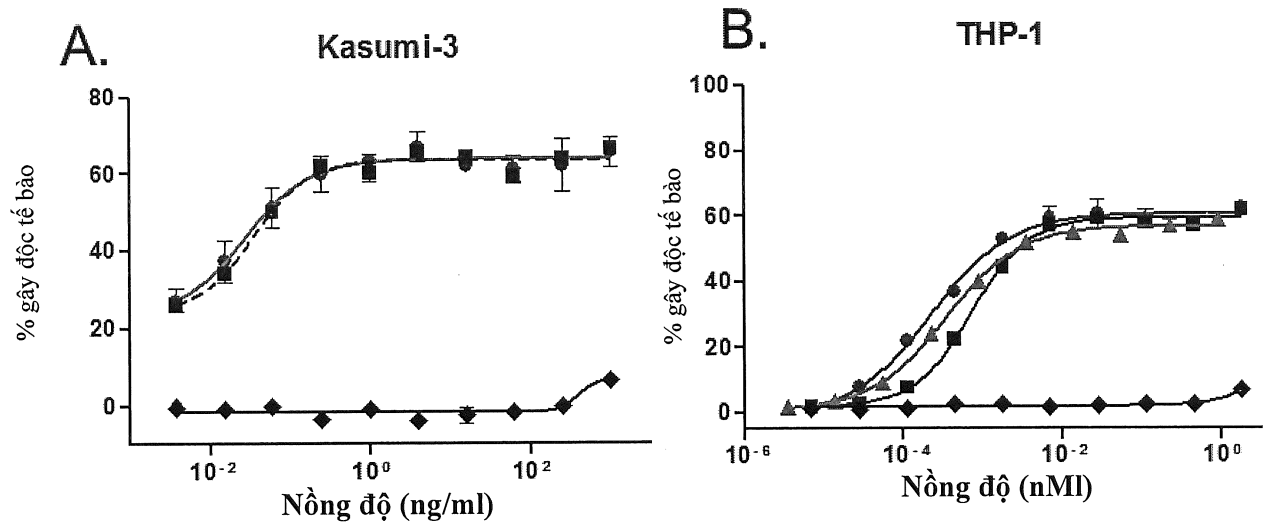
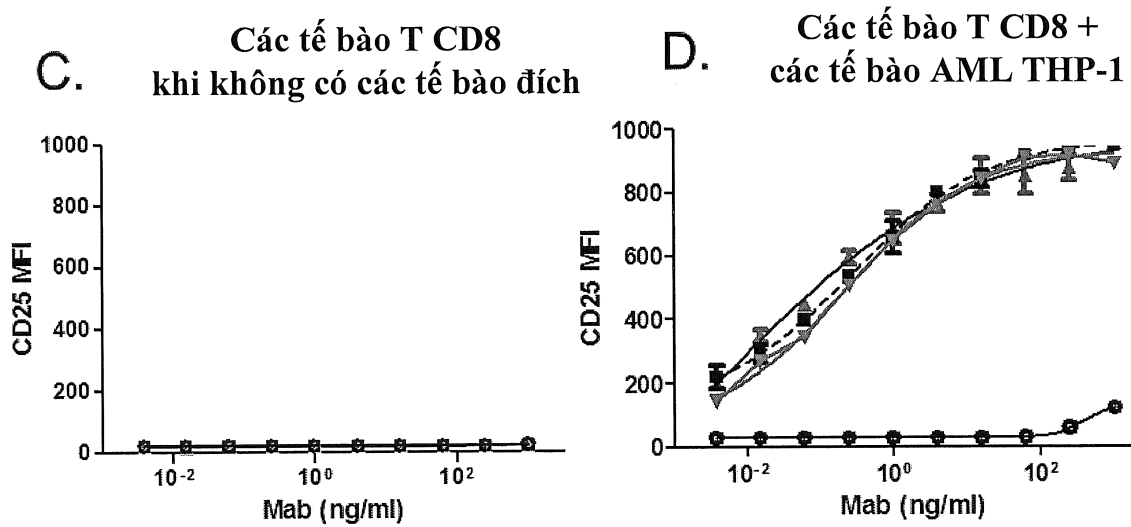


Fig.4

Hoạt tính CTL hiệu nghiệm đối với các tế bào AML



Không hoạt hóa tế bào T khi không có sự liên kết đồng thời



- ◆ DART-A
- DART-A w/ABD
- ▲ DART-A w/Fc
- DART đối chứng

Fig.5

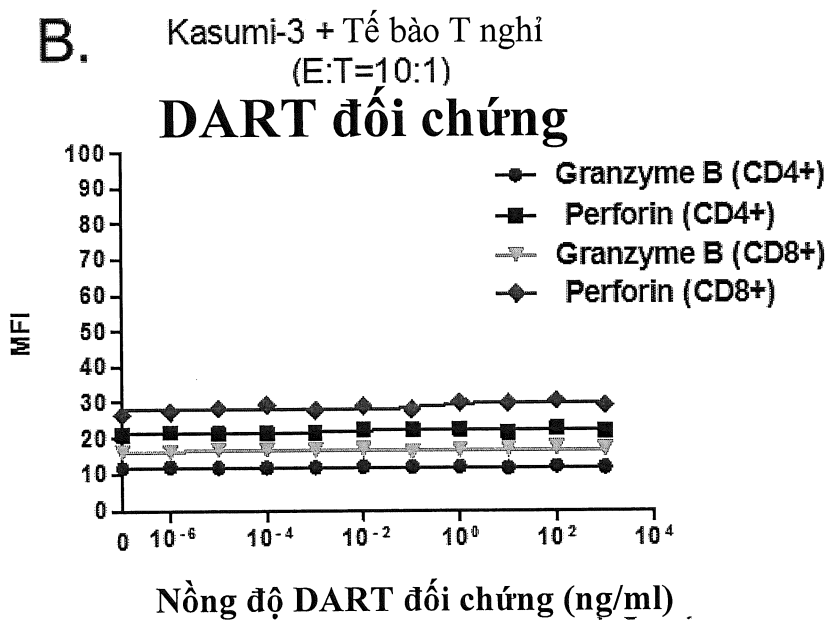
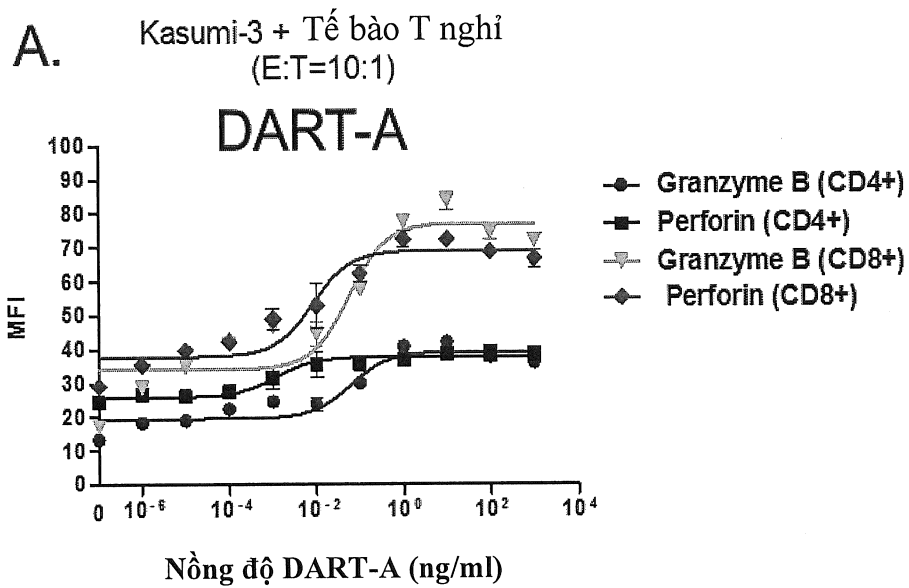
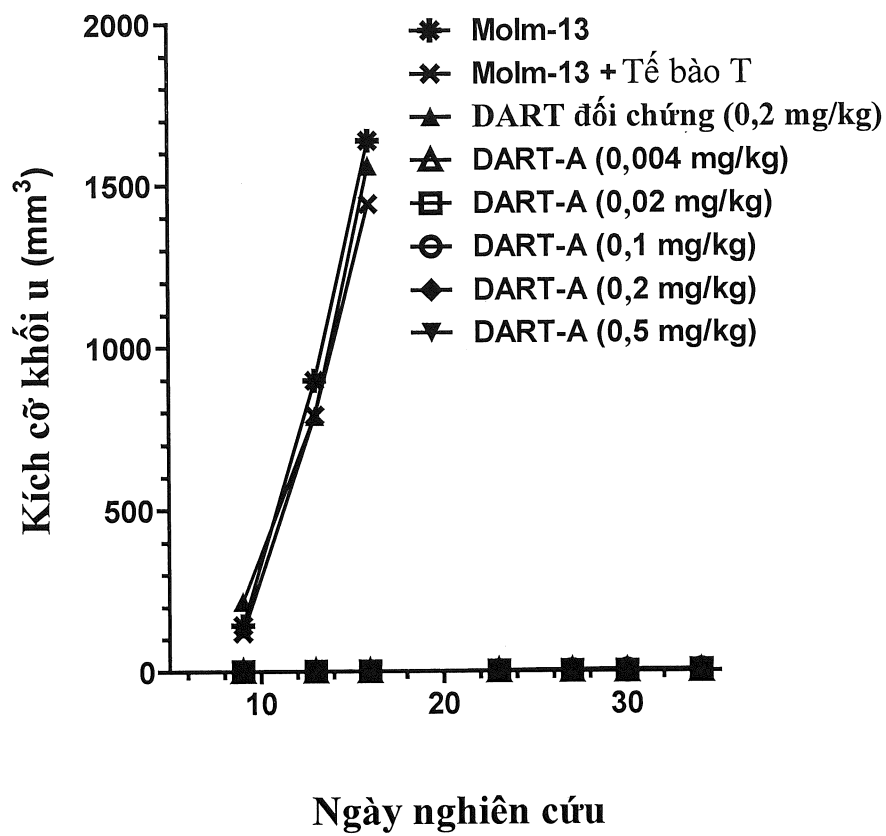


Fig.6

A.



B.

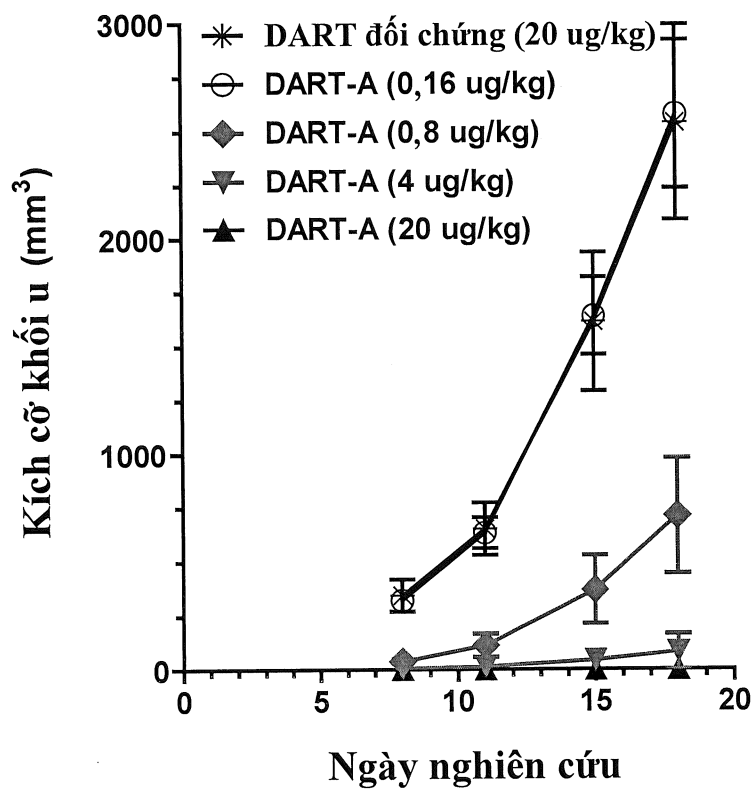


Fig.7

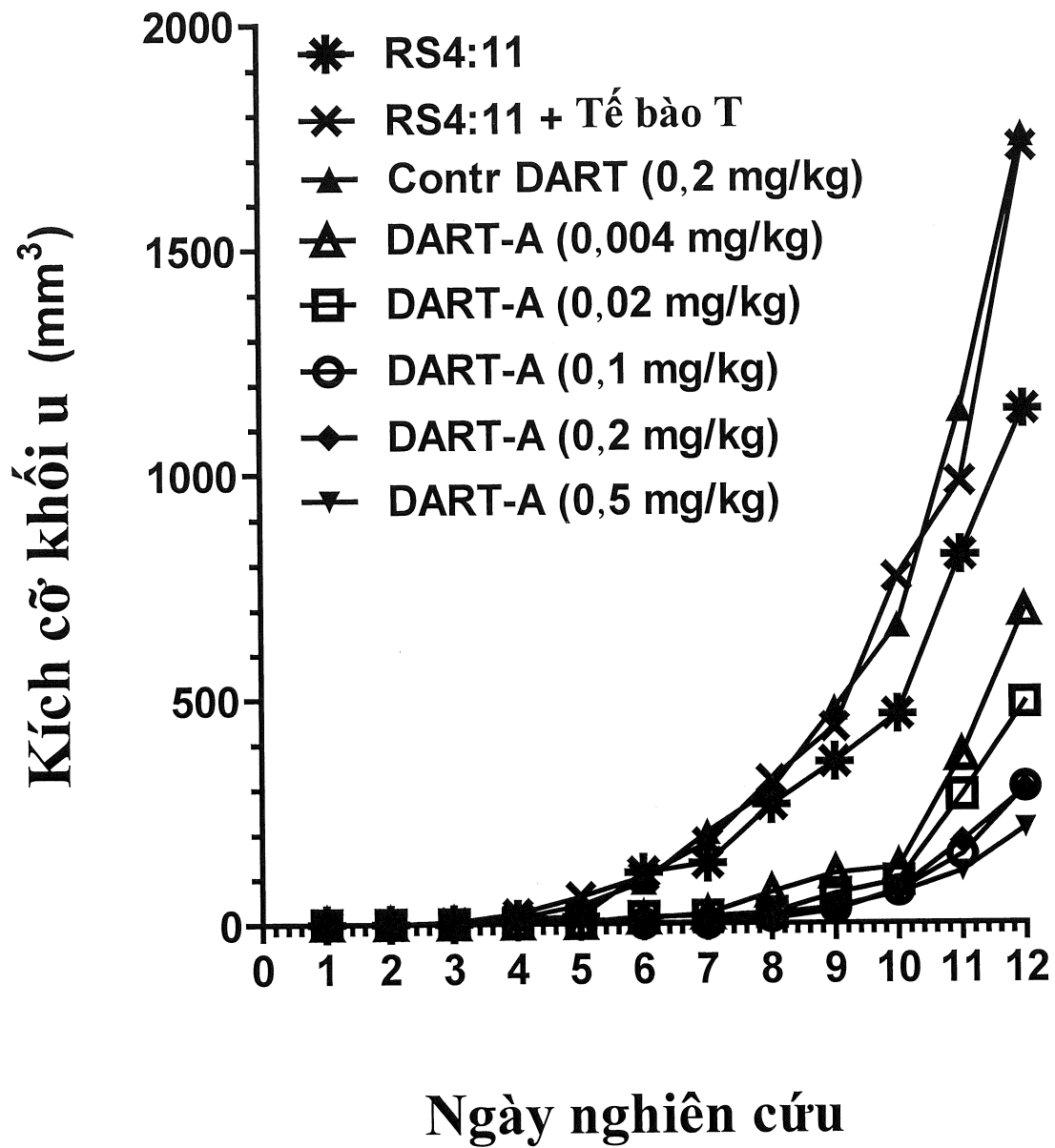
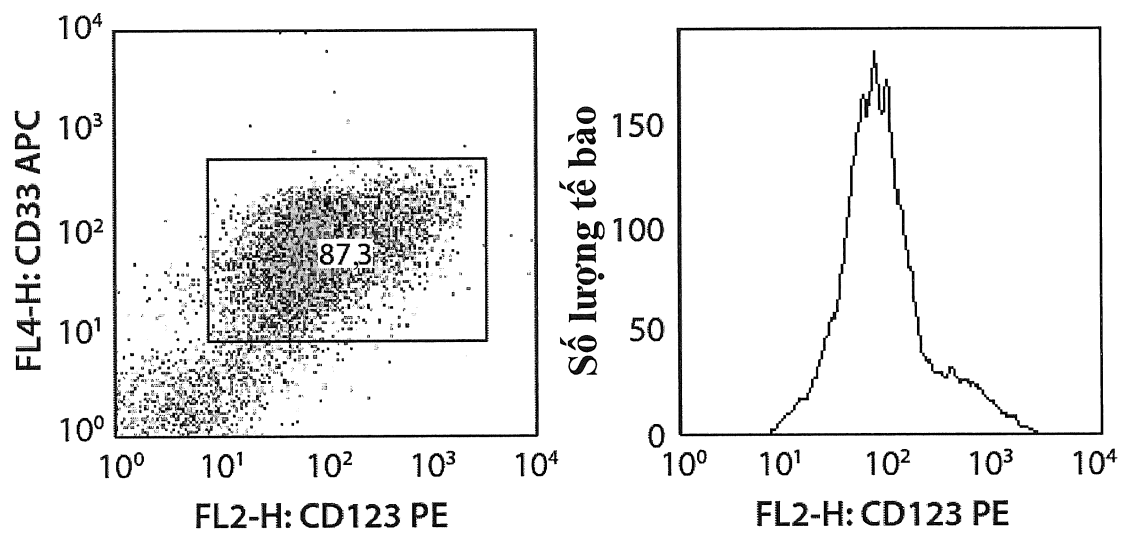
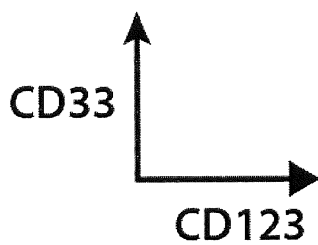
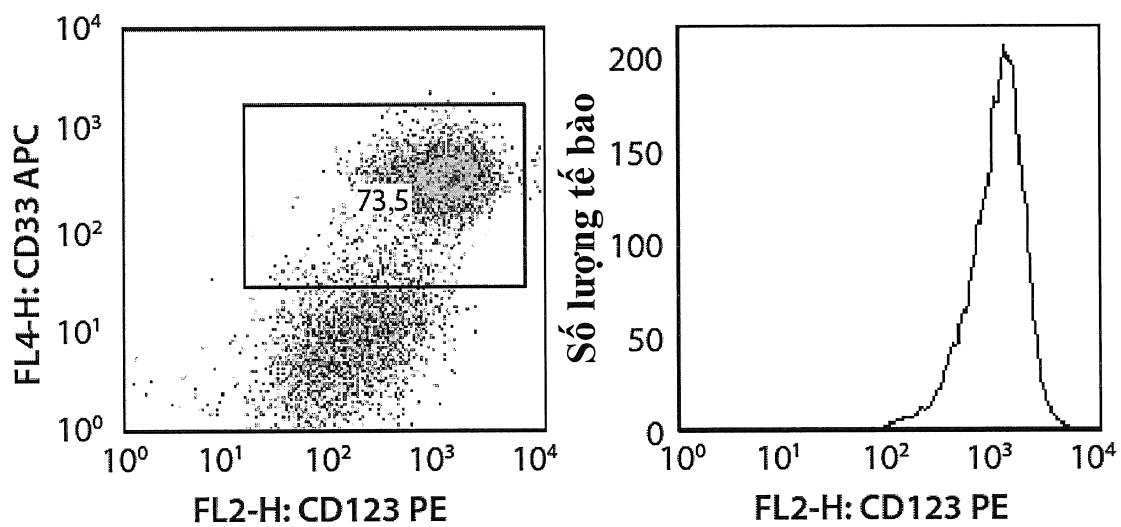
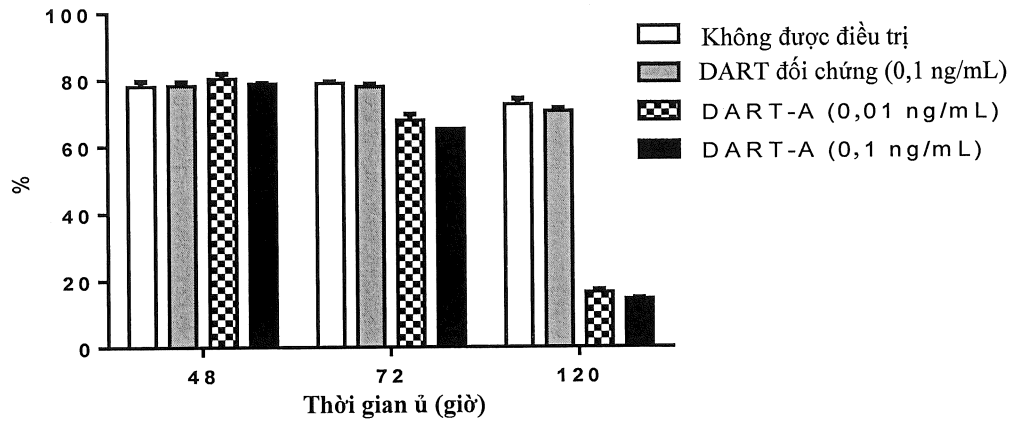
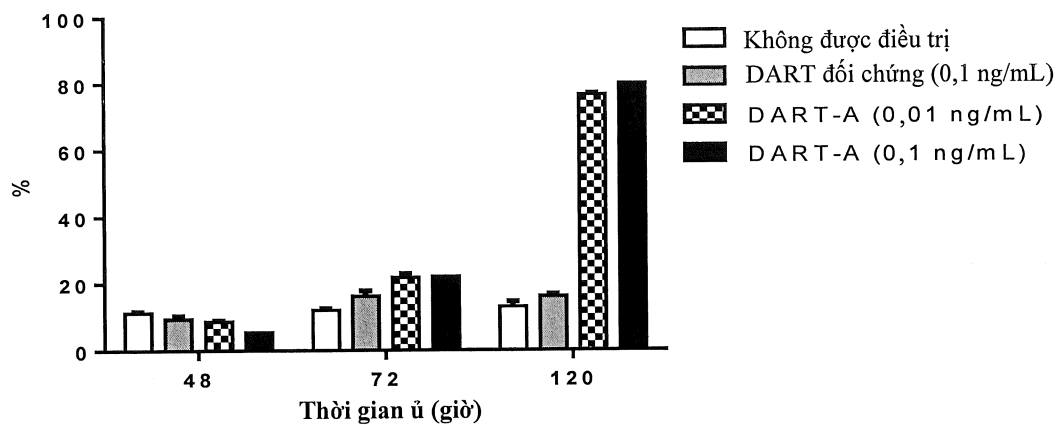
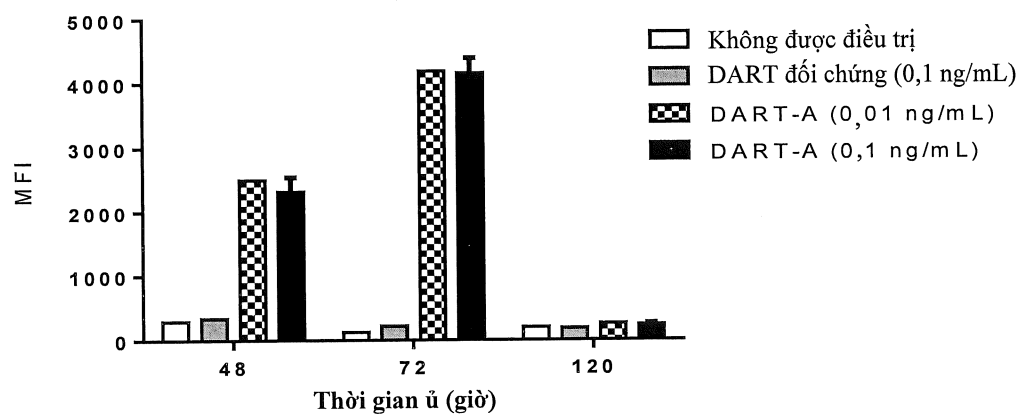


Fig.8

A AML BM MNC**B Kasumi-3****Fig.9**

A**Các tế bào non ác tính bệnh bạch cầu****B****Tế bào T****C****CD 25 MFI****Fig.10**

PBMC bình thường

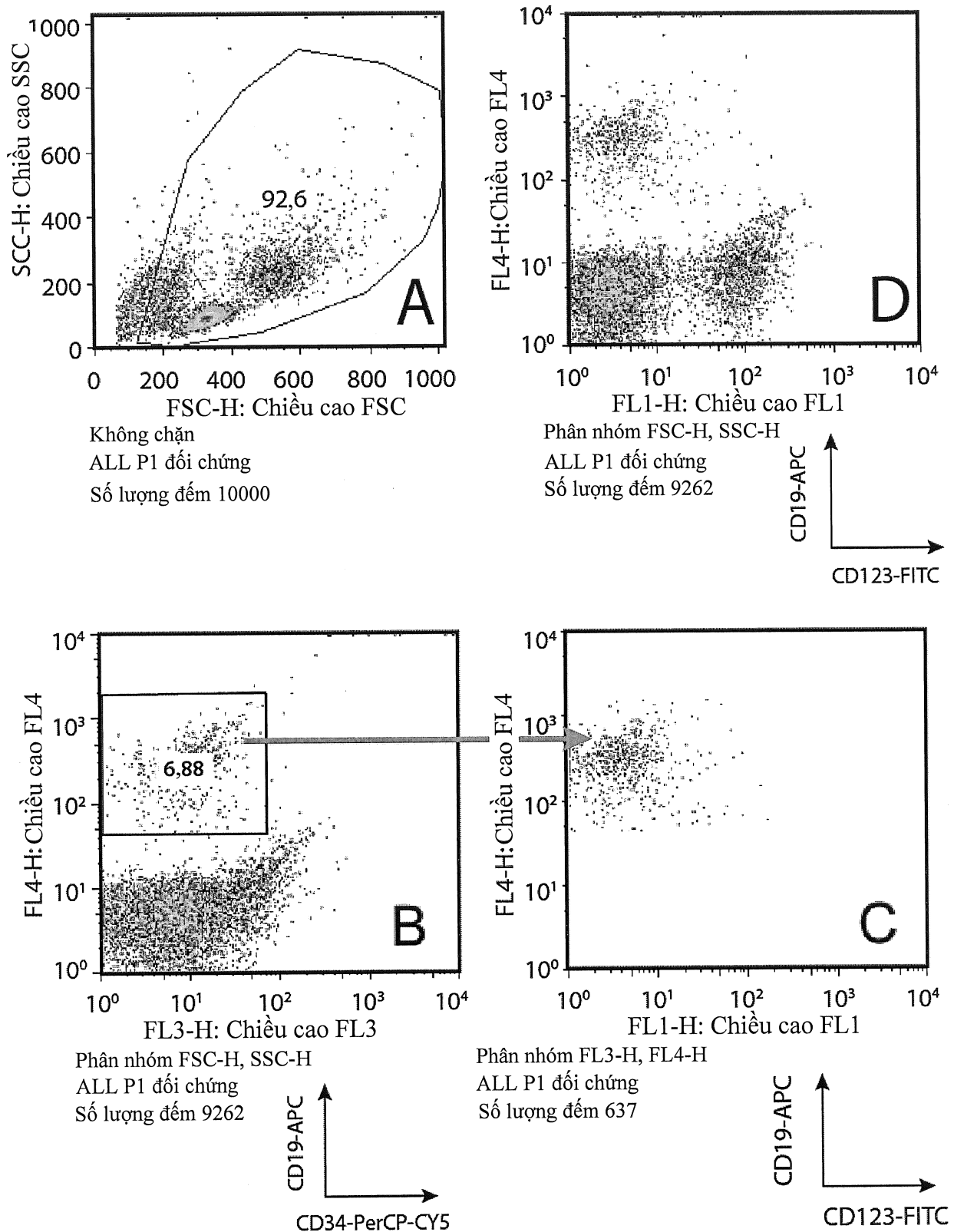


Fig.11

ALL PBMC

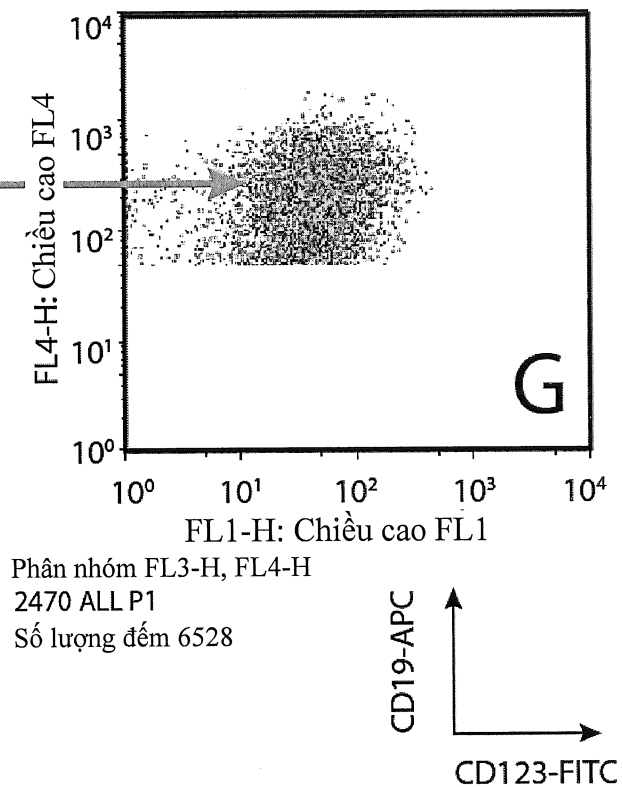
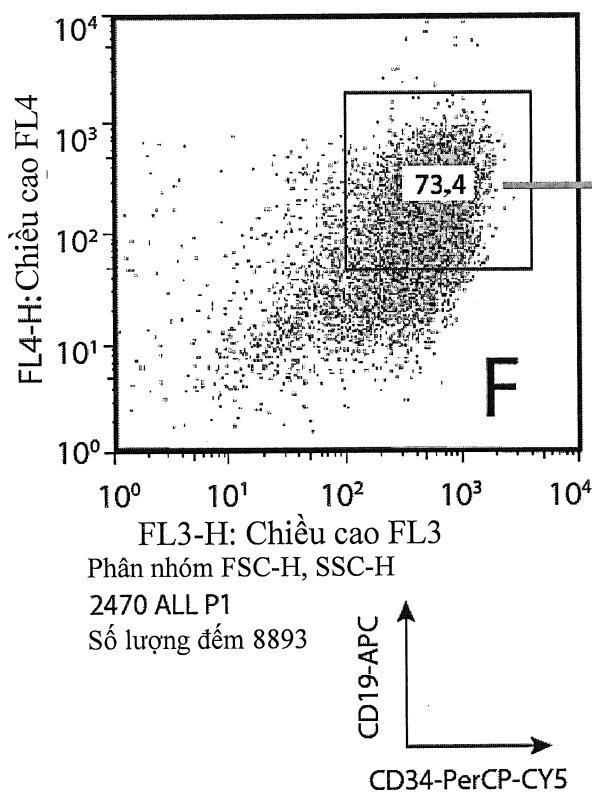
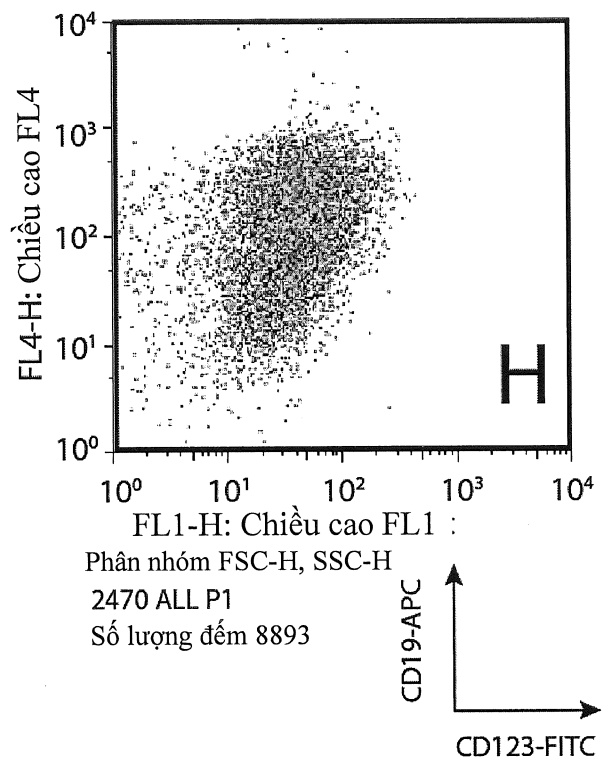
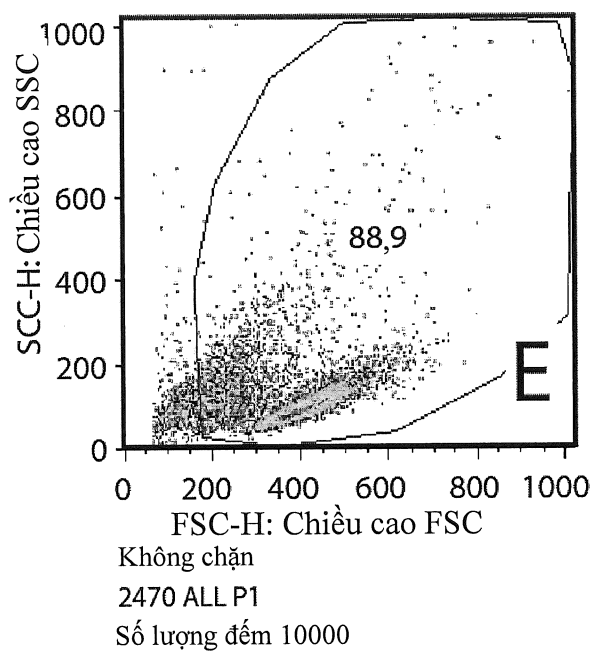
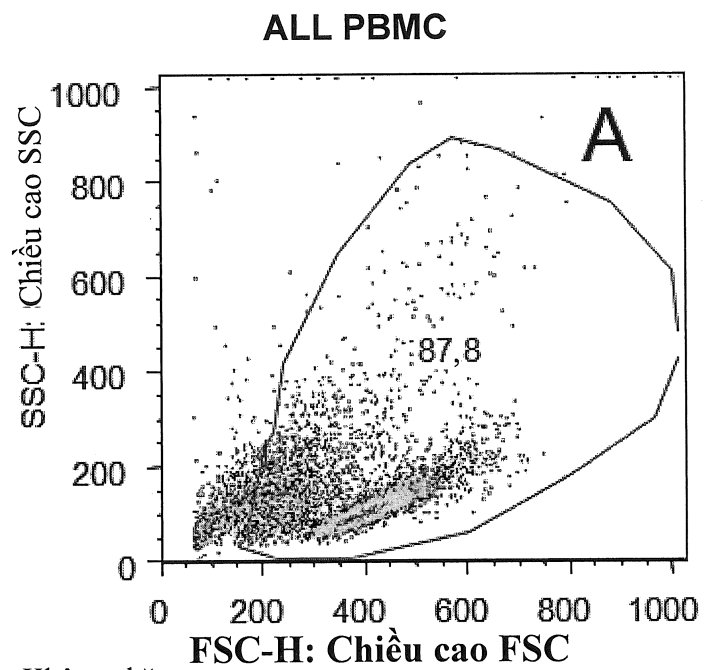


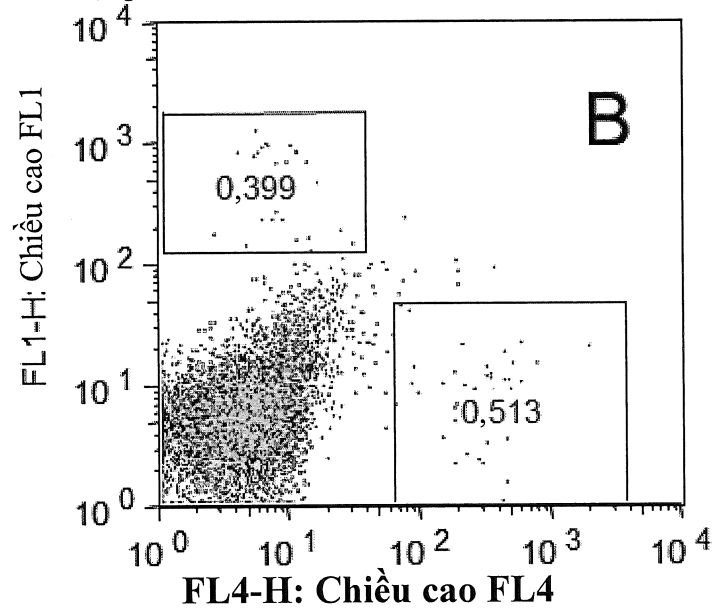
Fig.11 (tiếp)



Không chặn

2470 Tế bào T ALL

Số lượng đếm 10000



Phân nhóm FSC-H, SSC-H

2470 Tế bào T ALL

Số lượng đếm 8777

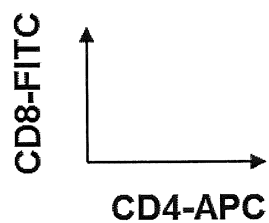
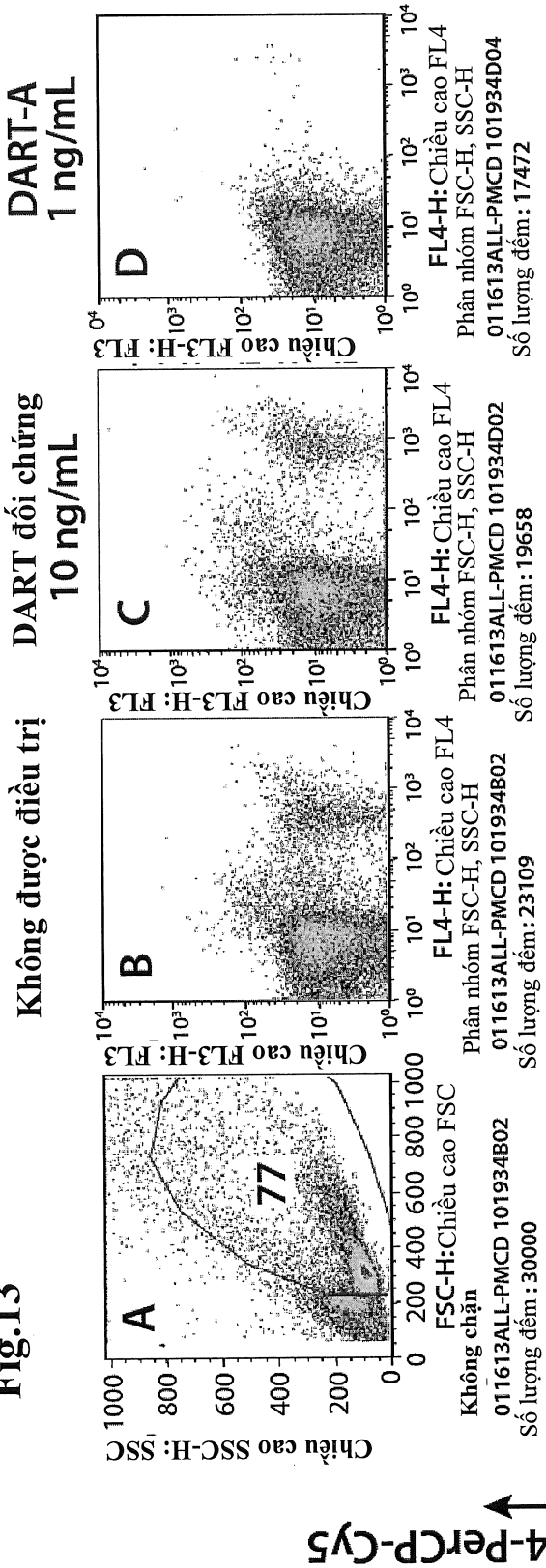


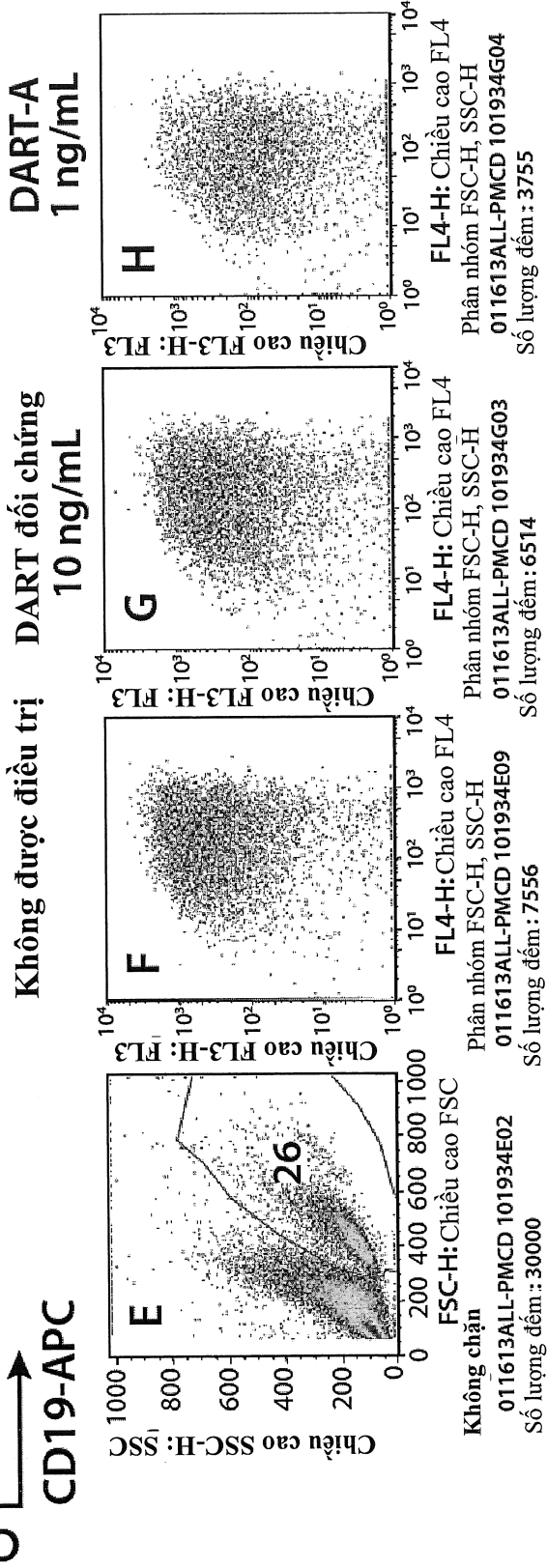
Fig.12

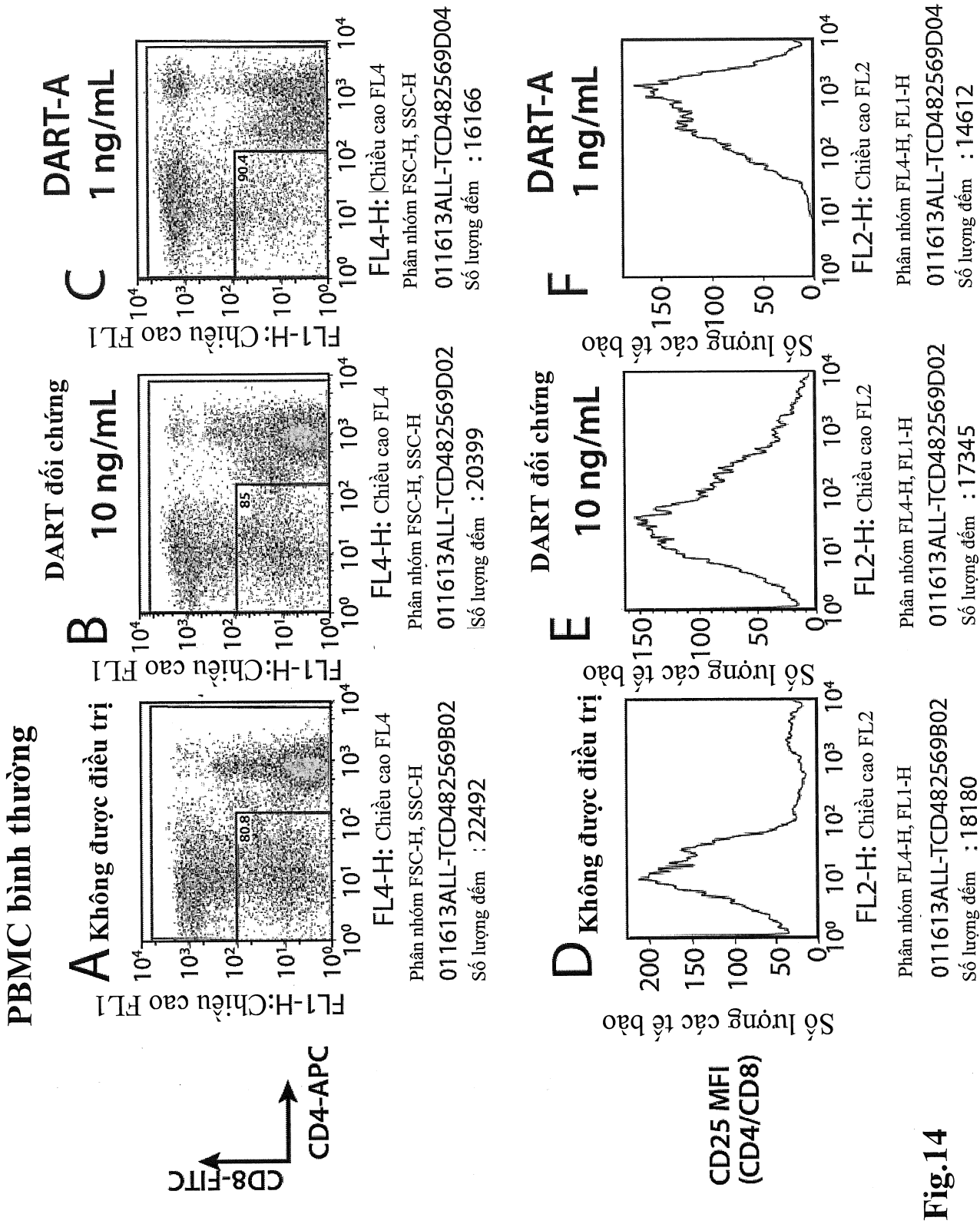
PBMC bình thường

Fig.13



PBMC ALL





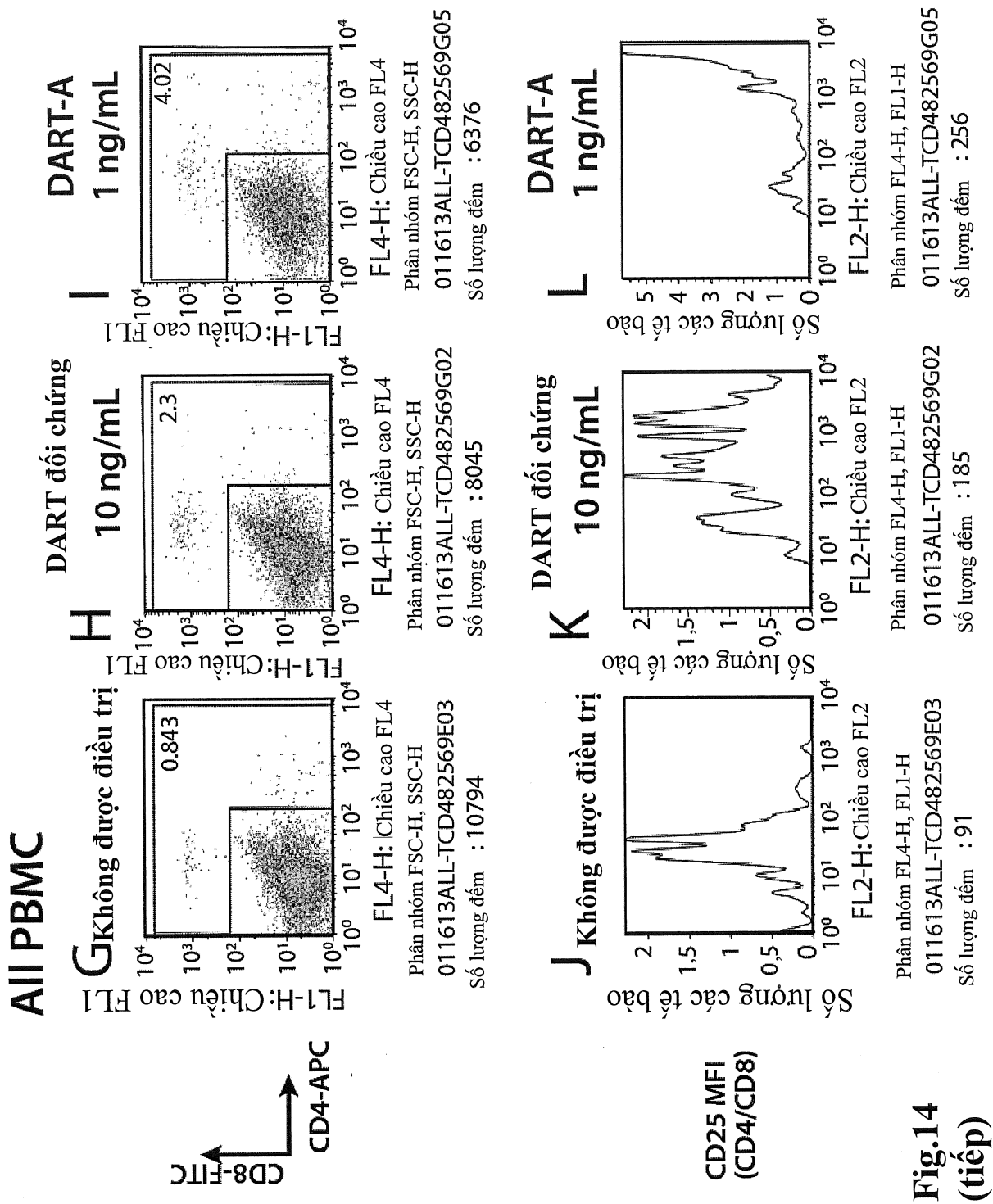


Fig.14
(tiếp)

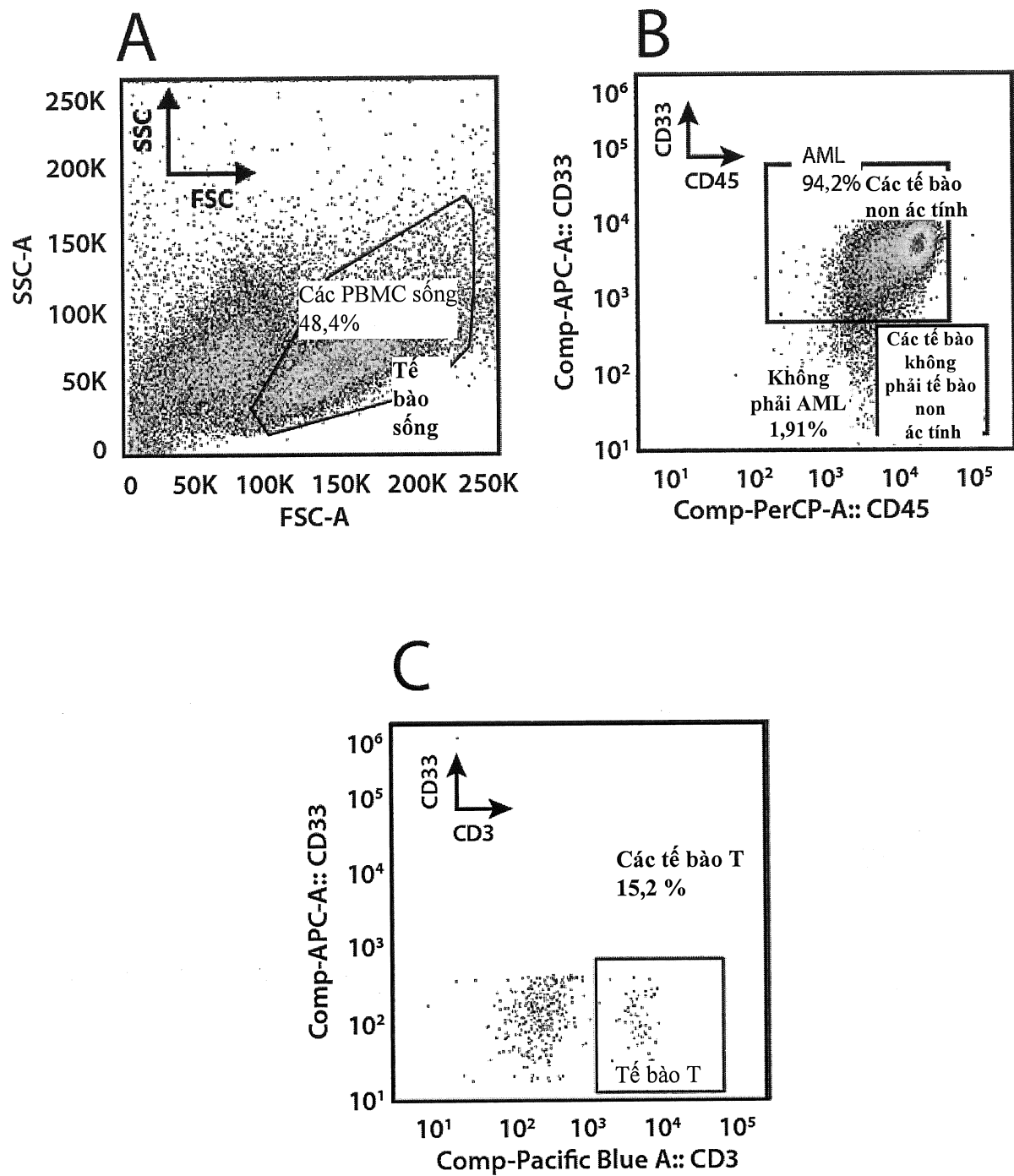


Fig.15

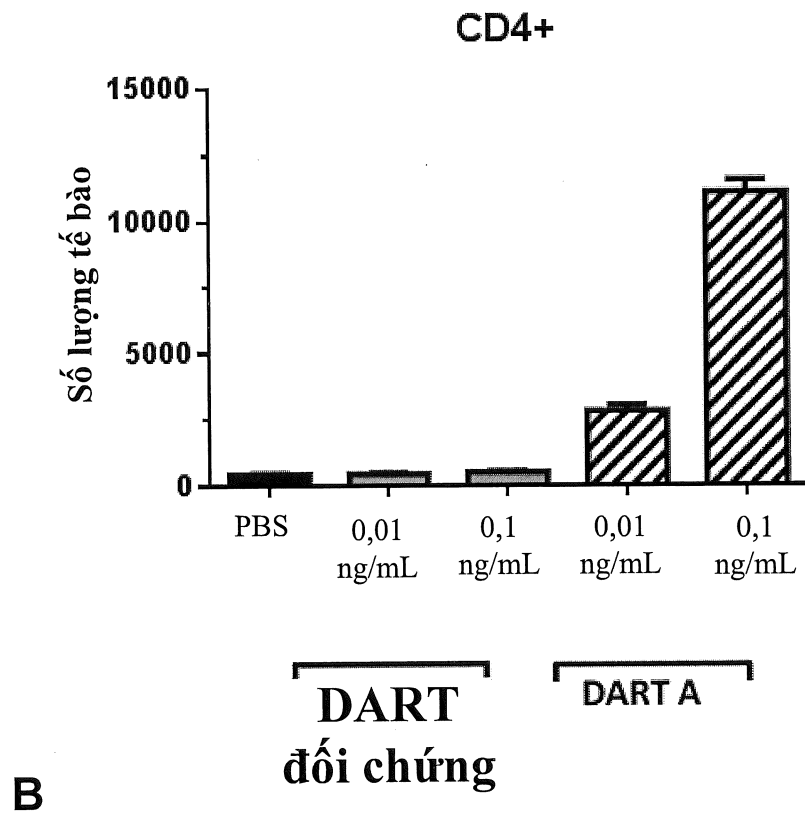
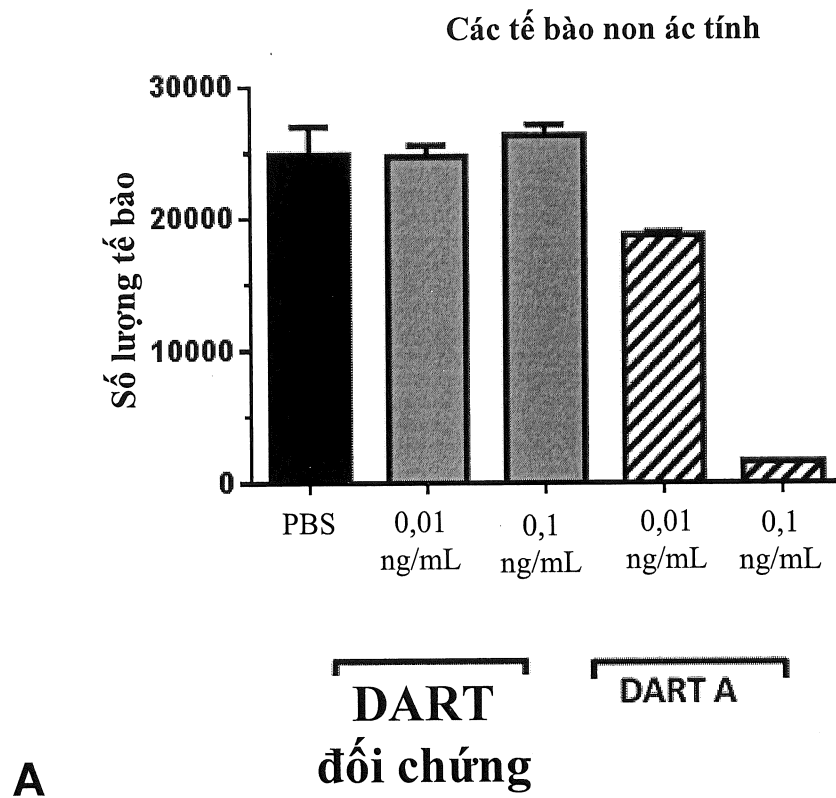
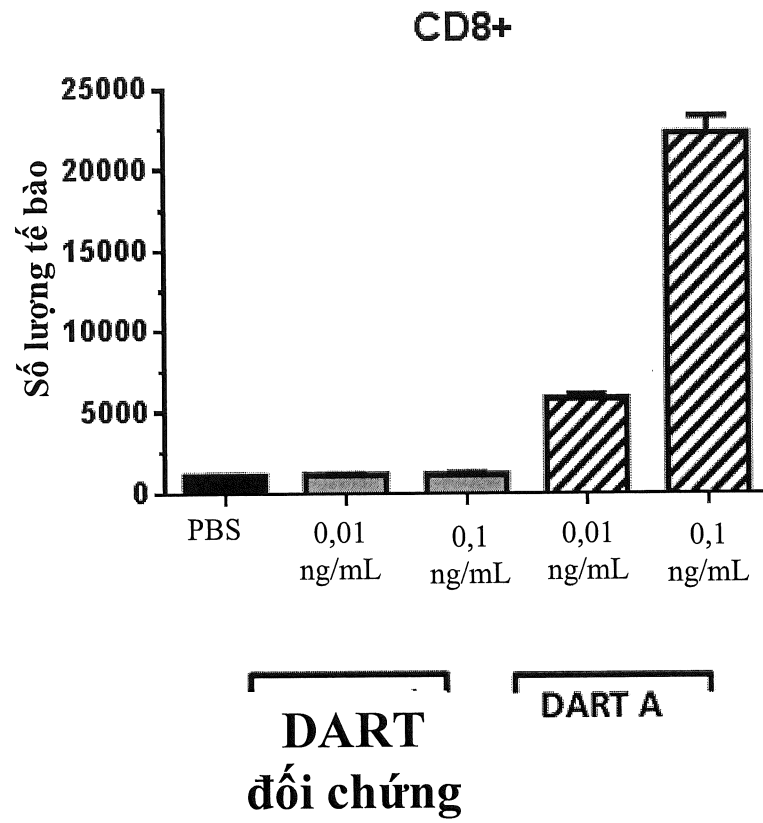
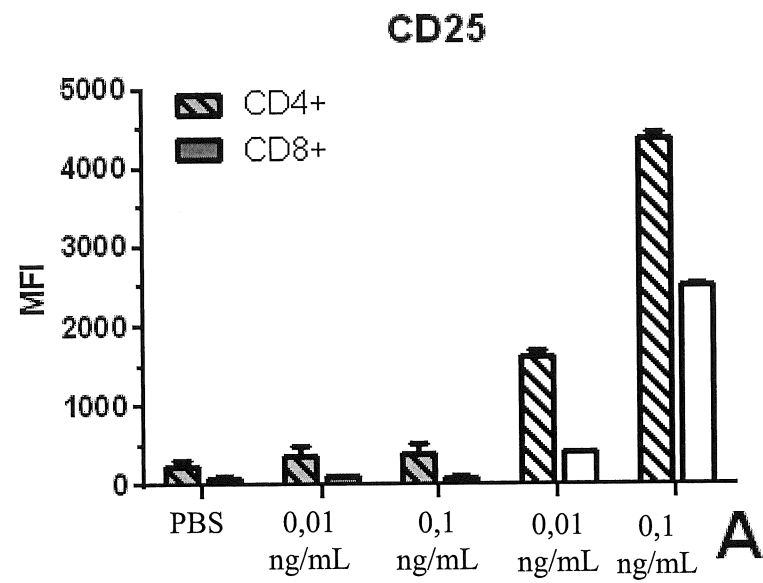


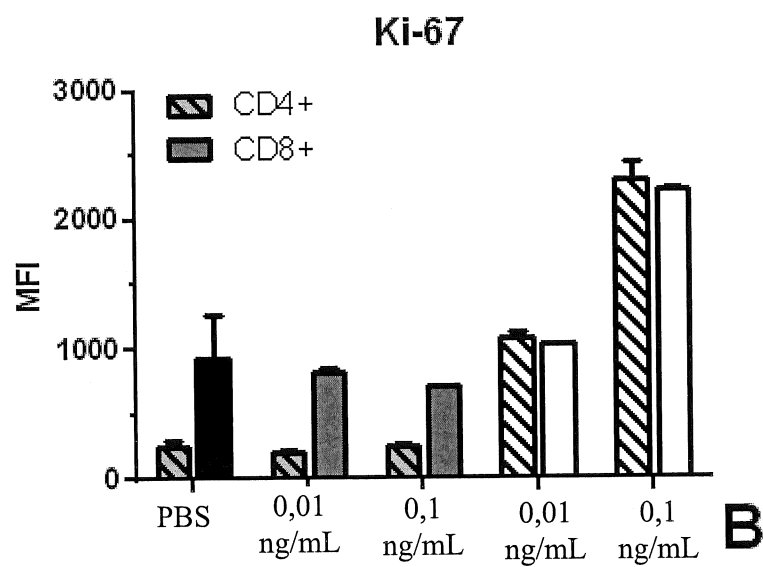
Fig.16

**C****Fig.16 (tiếp)**



DART
đối chứng

DART A



DART
đối chứng

DART A

Fig.17

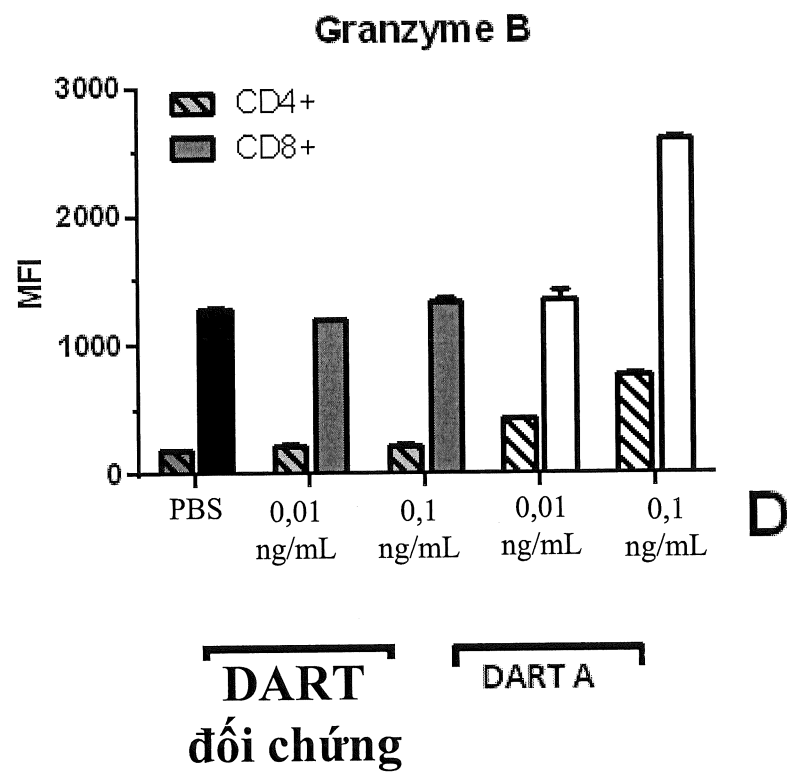
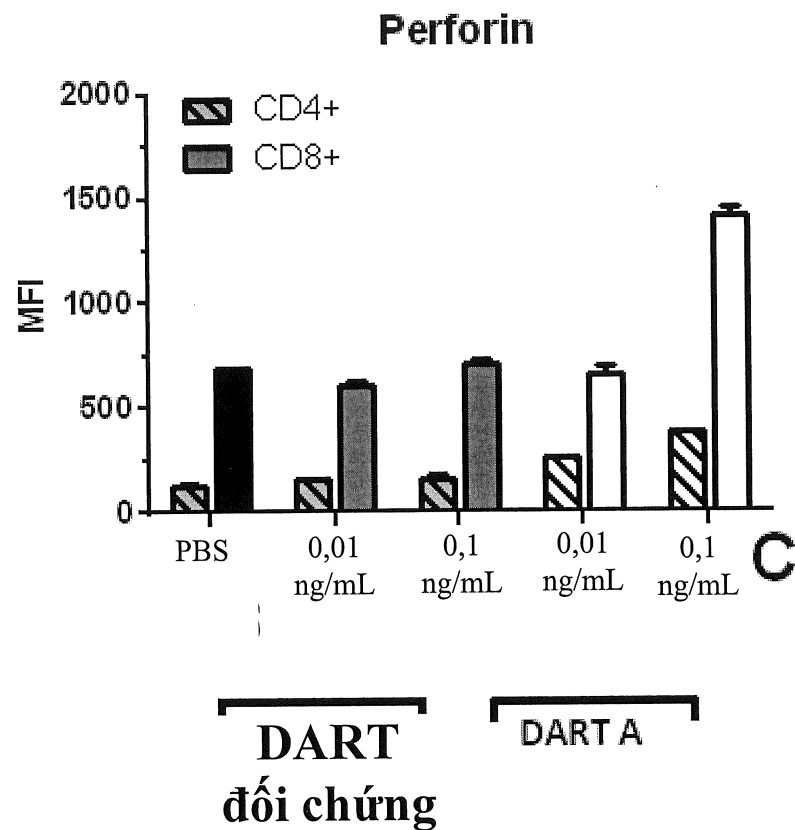


Fig.17 (tiếp)

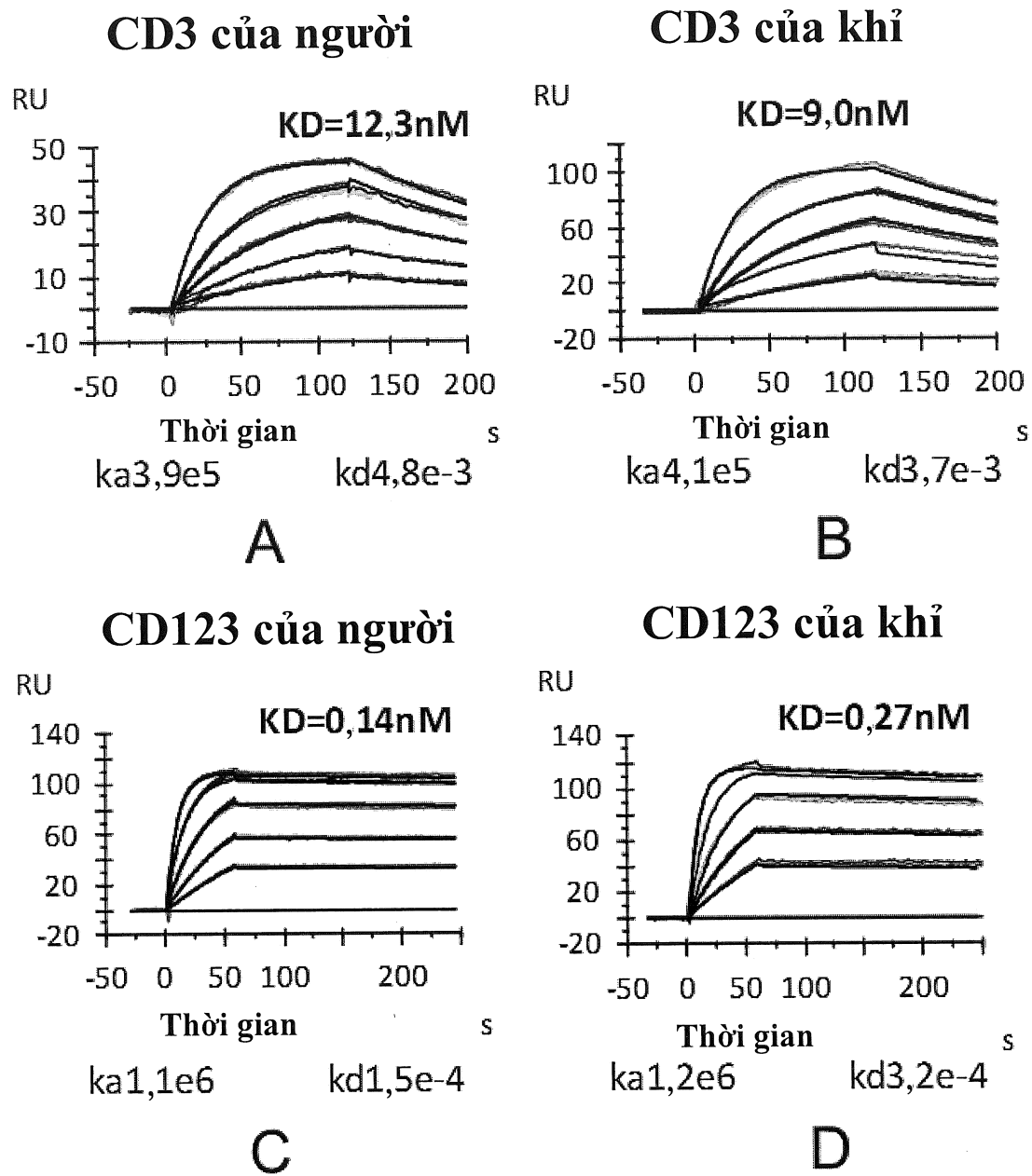
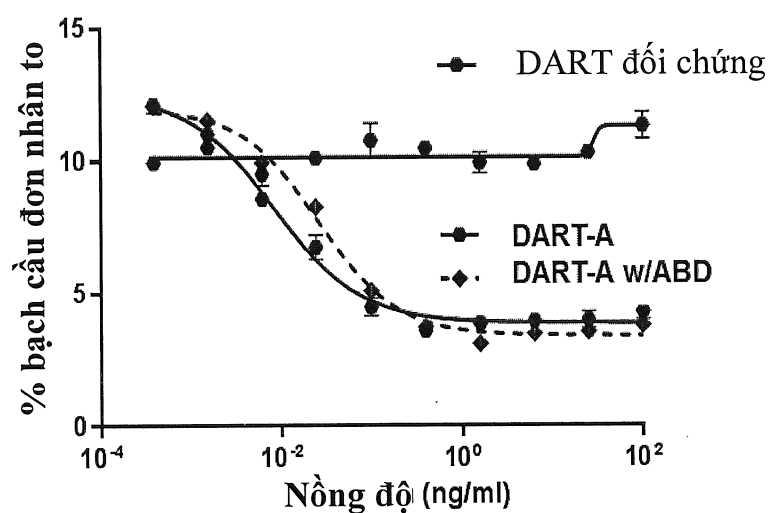


Fig.18

A.

Suy kiệt bạch cầu đơn nhân to
của PBHC của người



B.

Suy kiệt bạch cầu đơn nhân to tự thân của PBMC của khỉ đuôi
dài

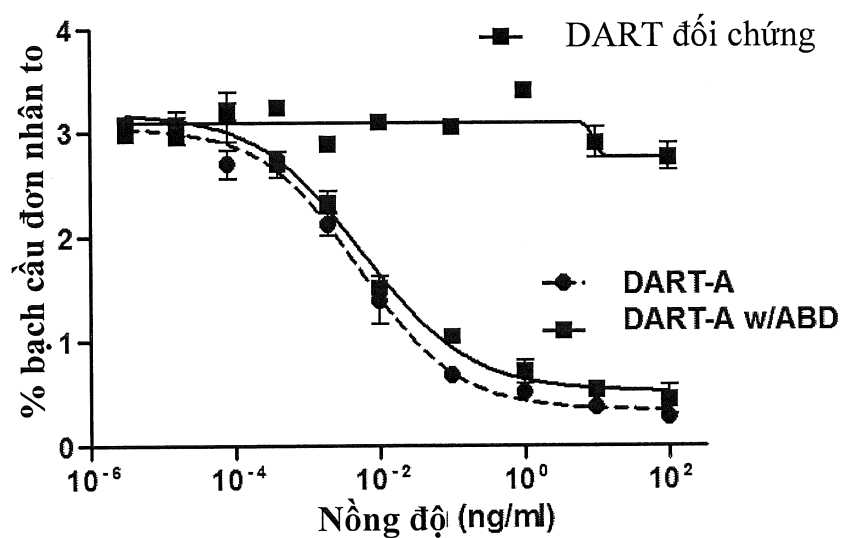


Fig.19

Chất dẫn thuốc + Chất mang

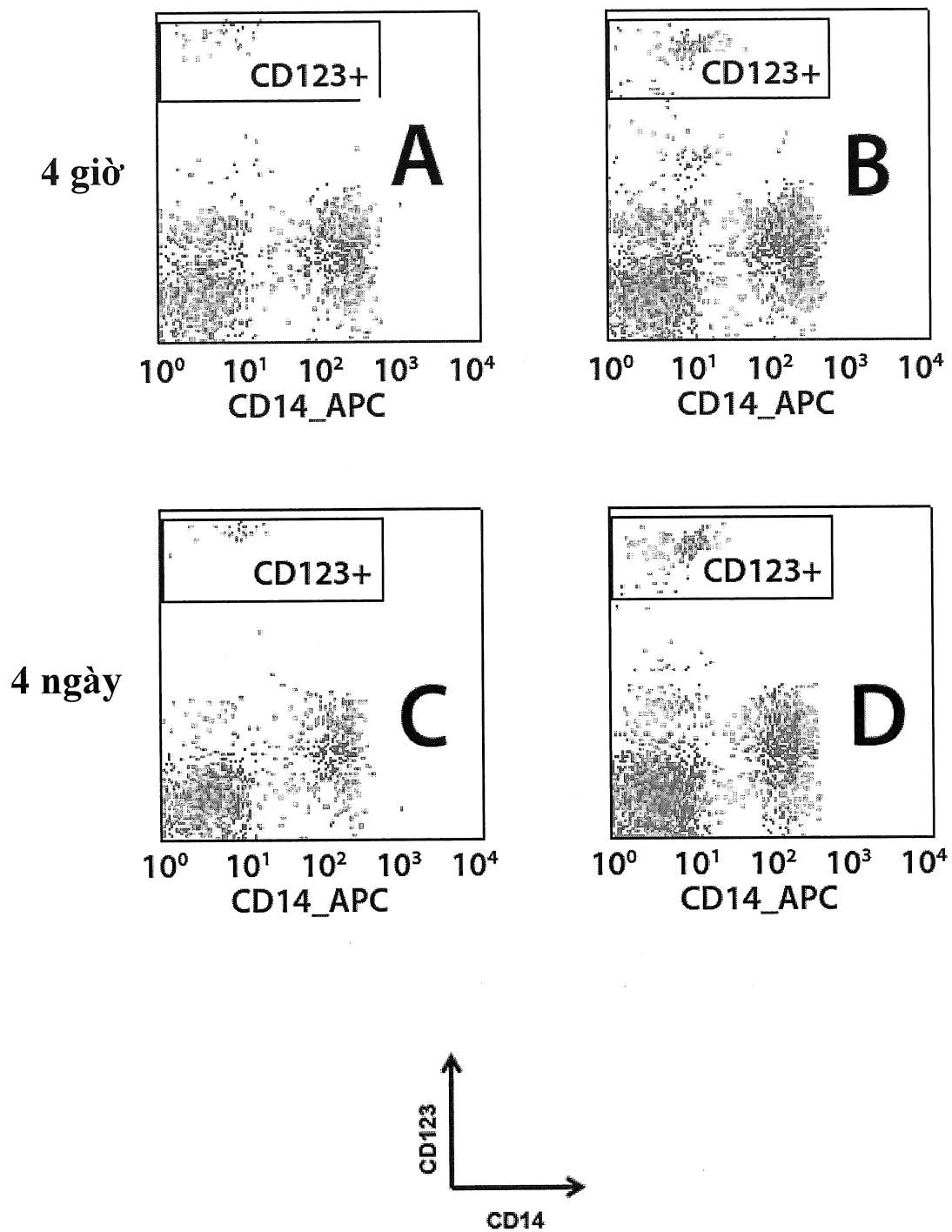


Fig.20

DART đối chứng
100µg/kg/ngày

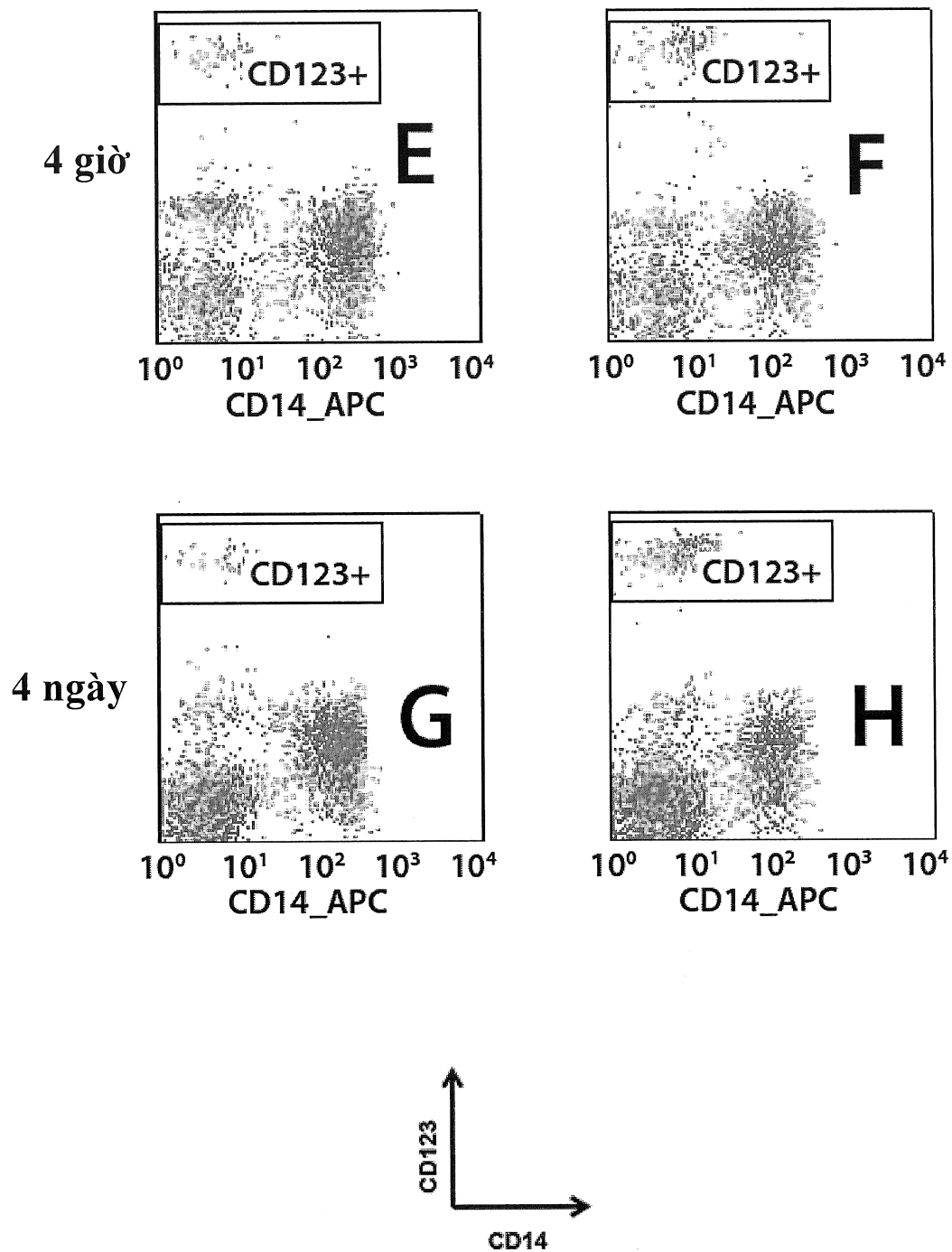


Fig.20 (tiếp)

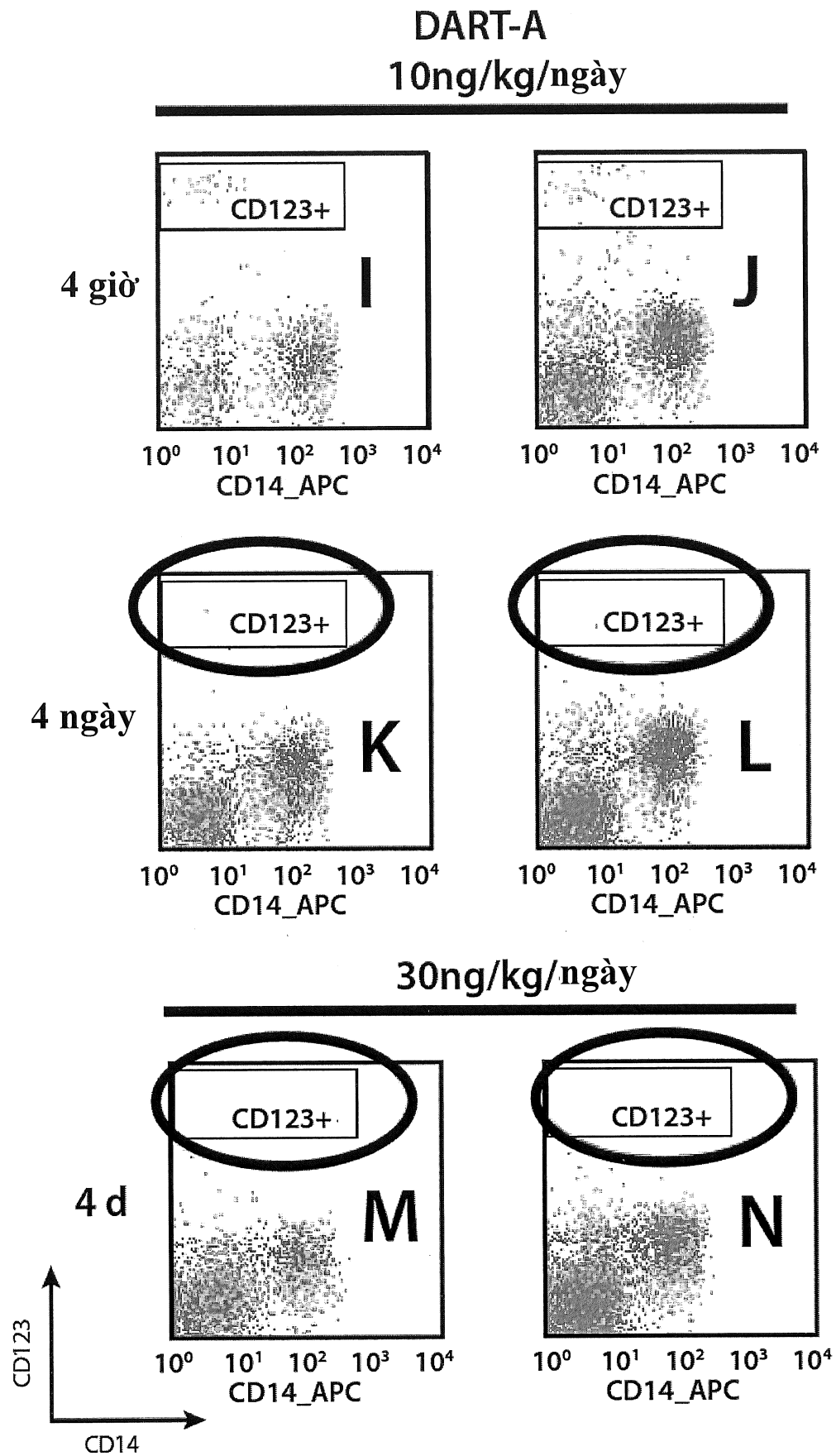


Fig.20 (tiếp)

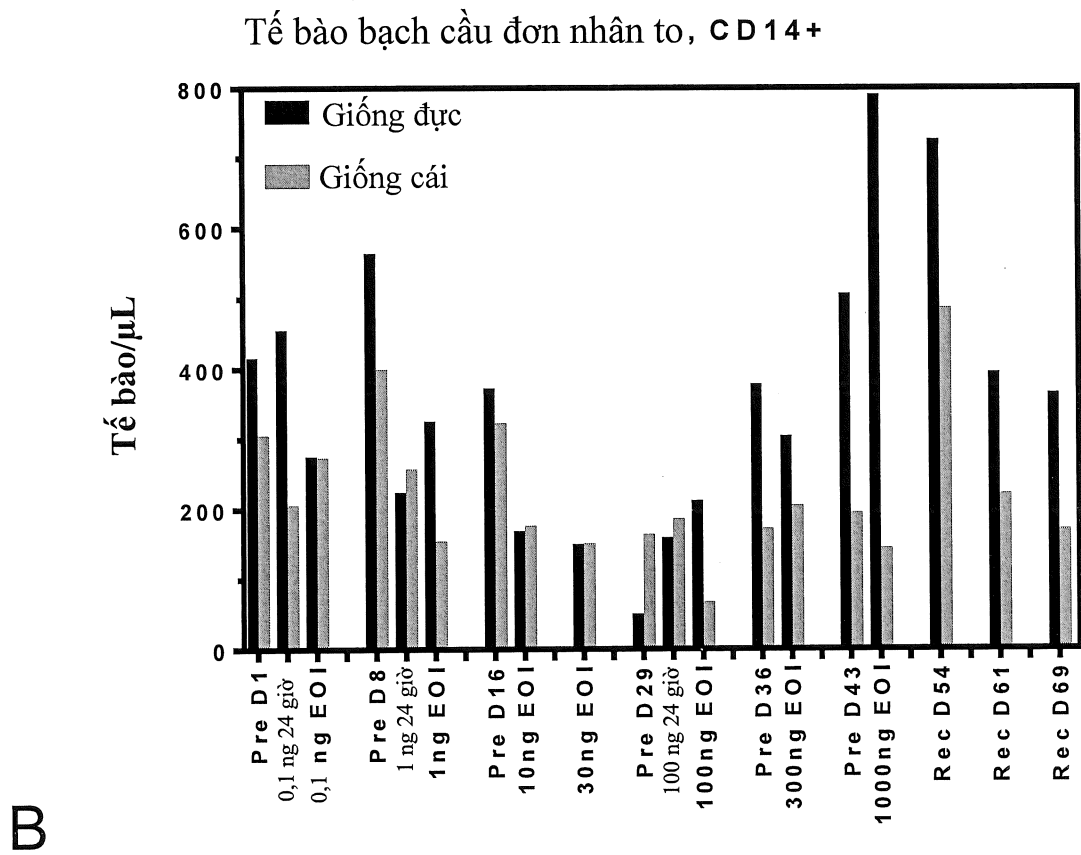
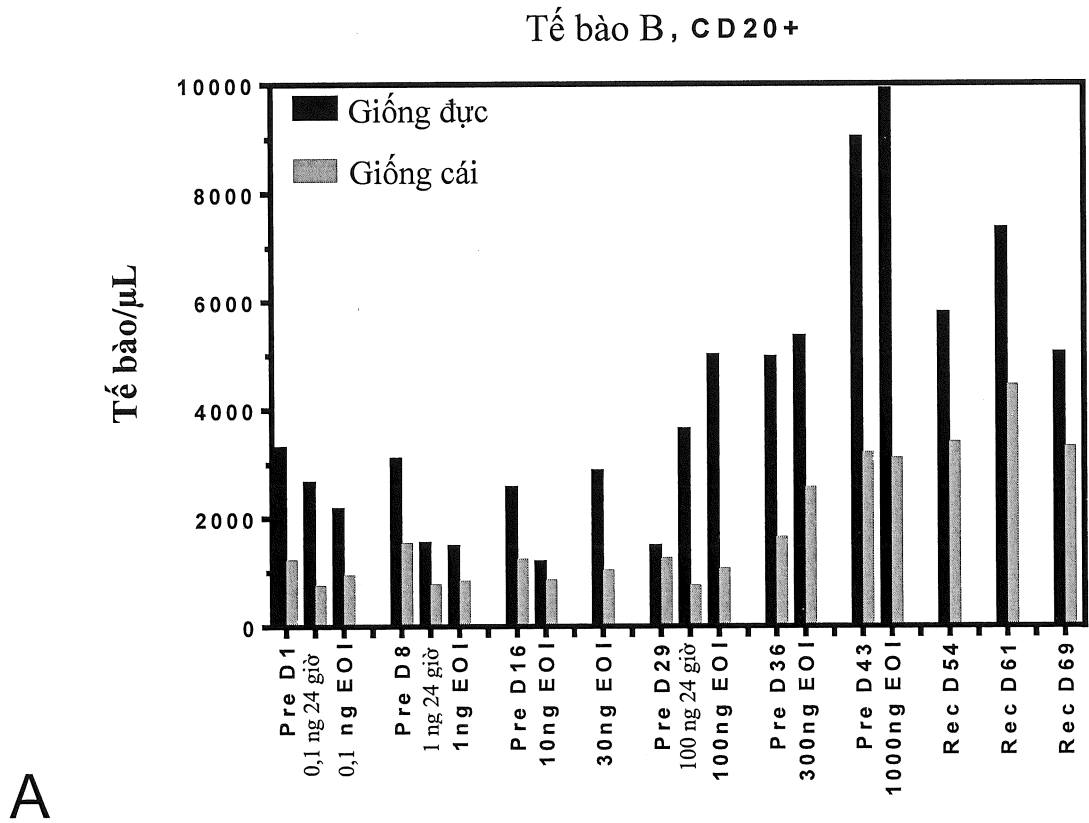
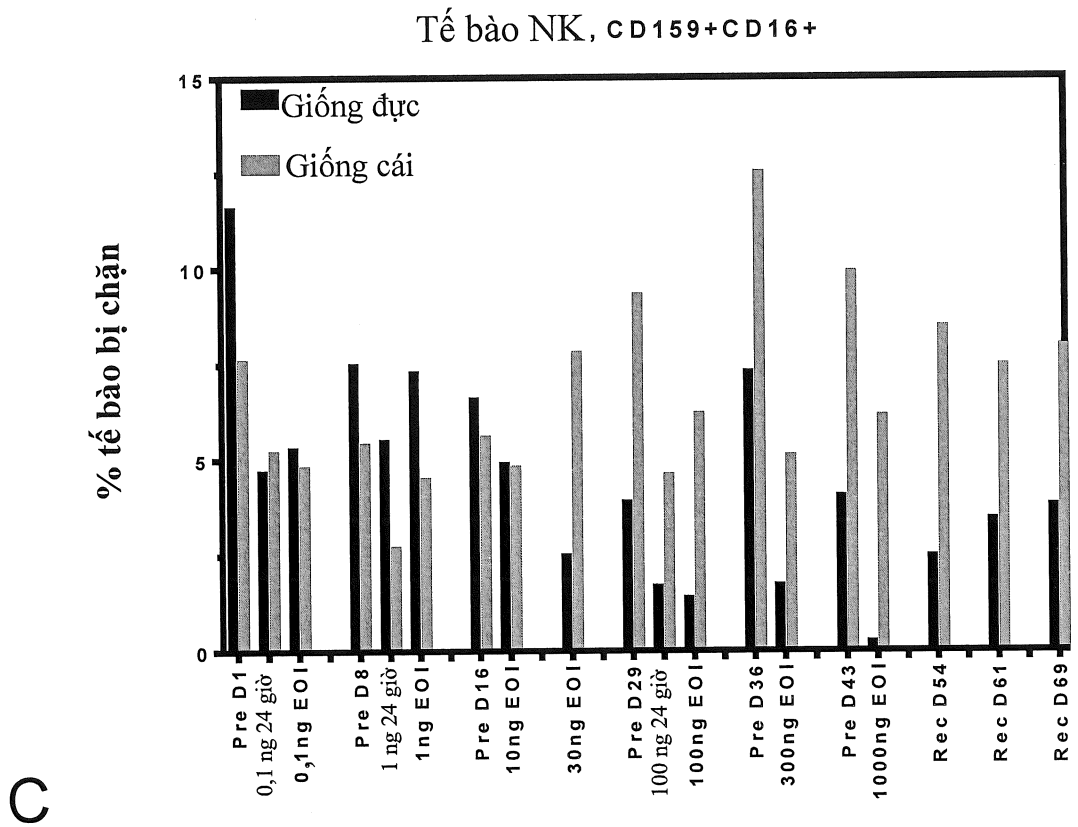
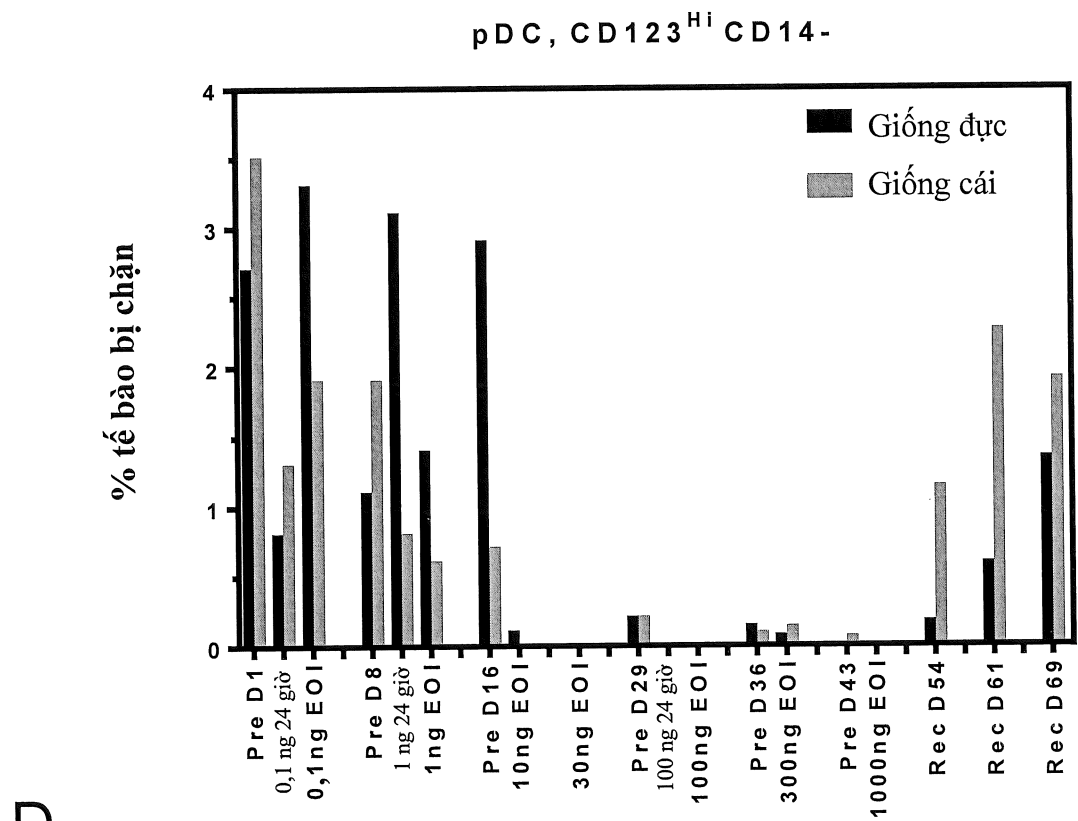


Fig.21 (Biểu đồ A-B)



C



D

Fig.21 (Biểu đồ C-D)

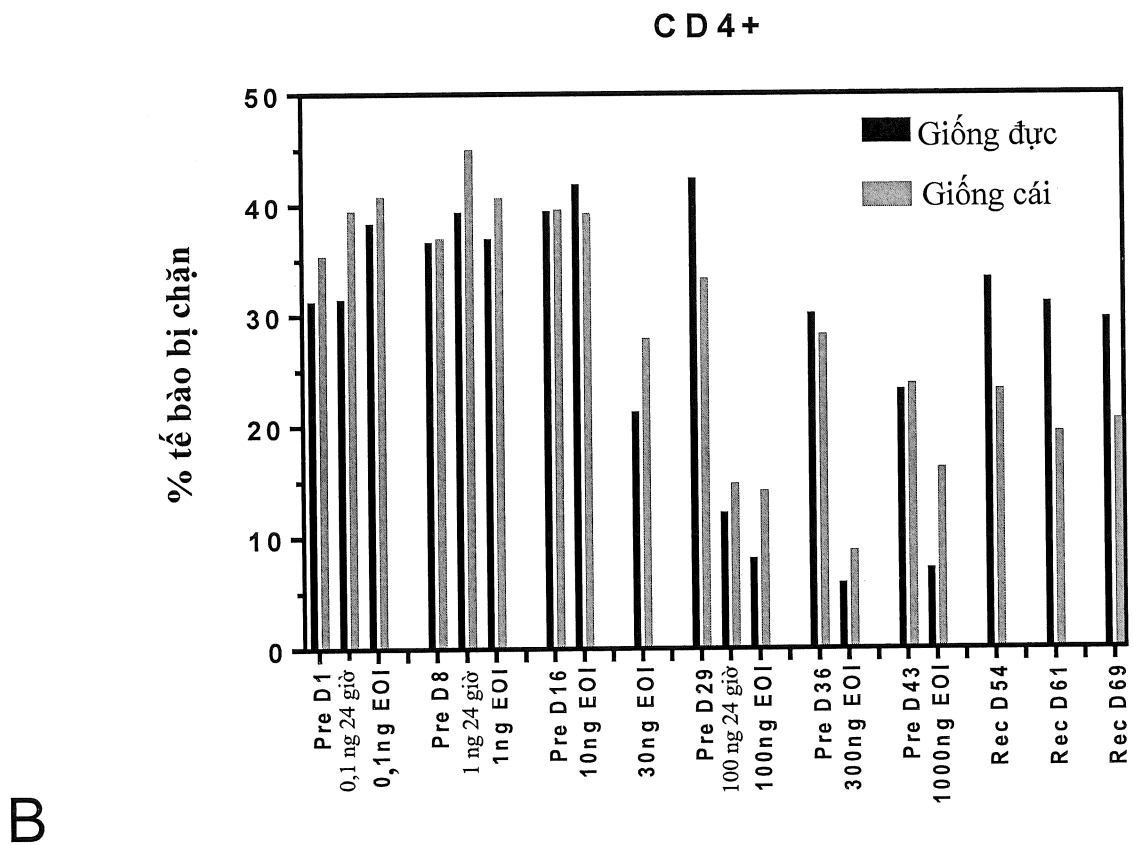
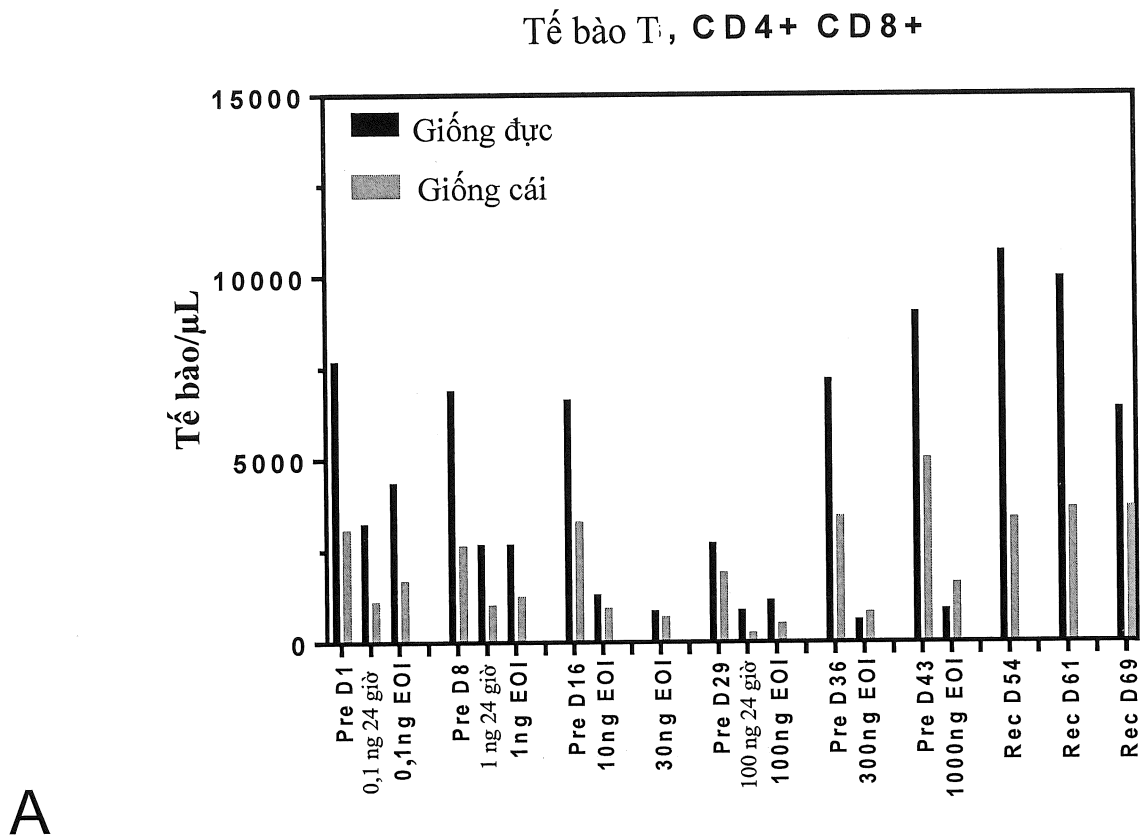
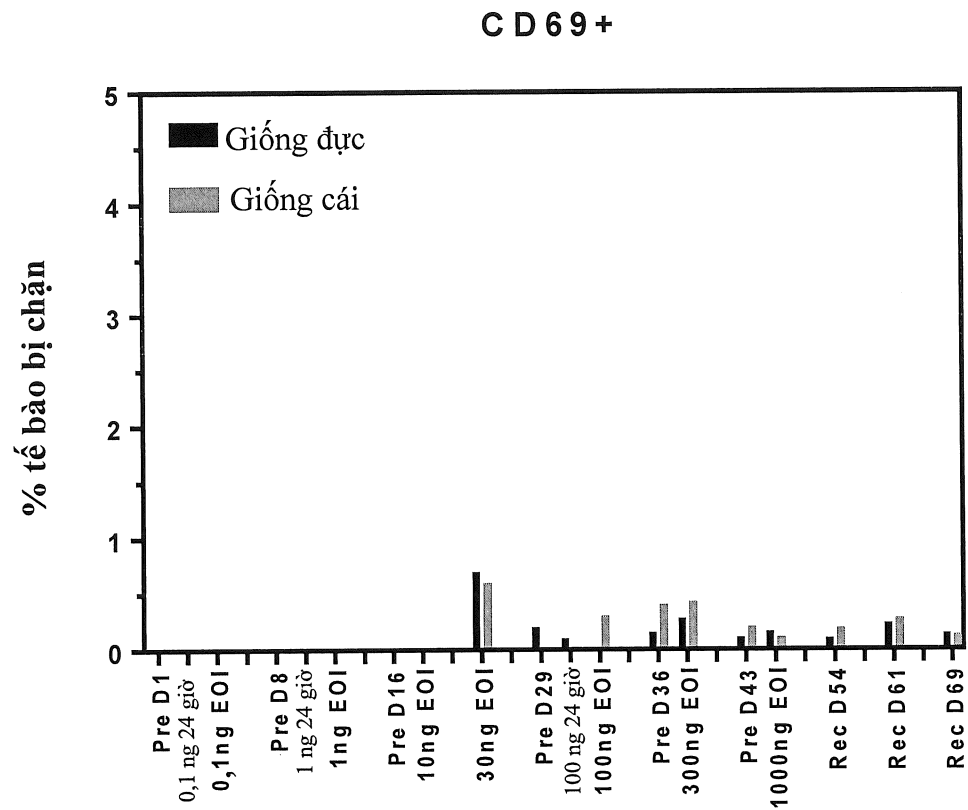


Fig.22 (Biểu đồ A-B)

C



D

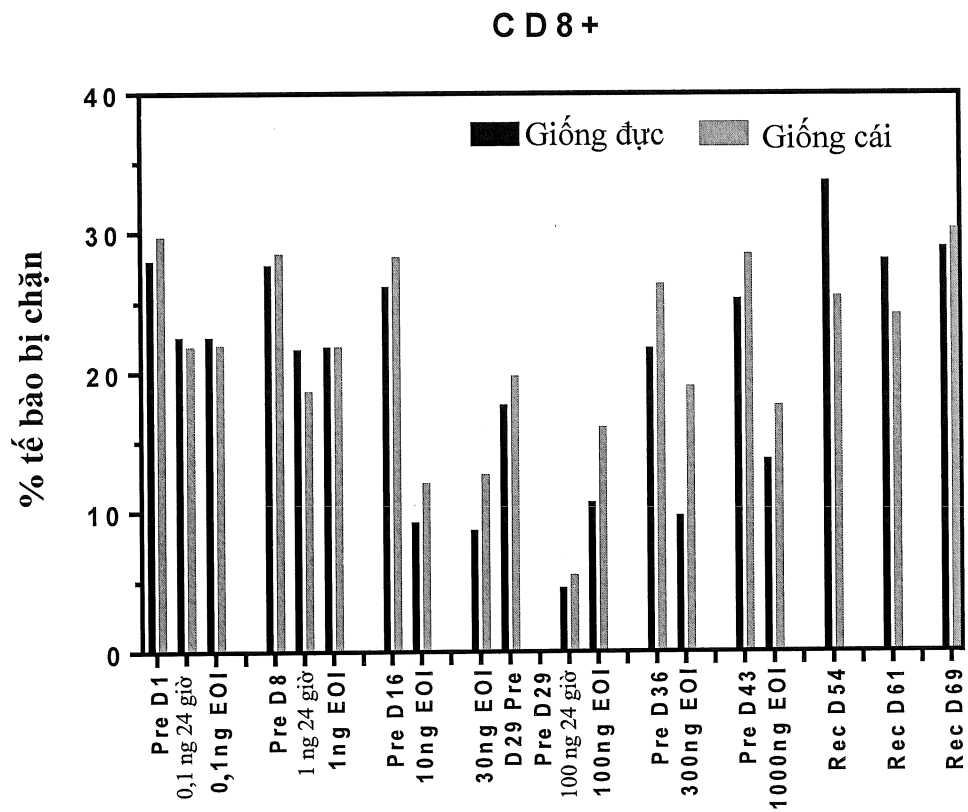
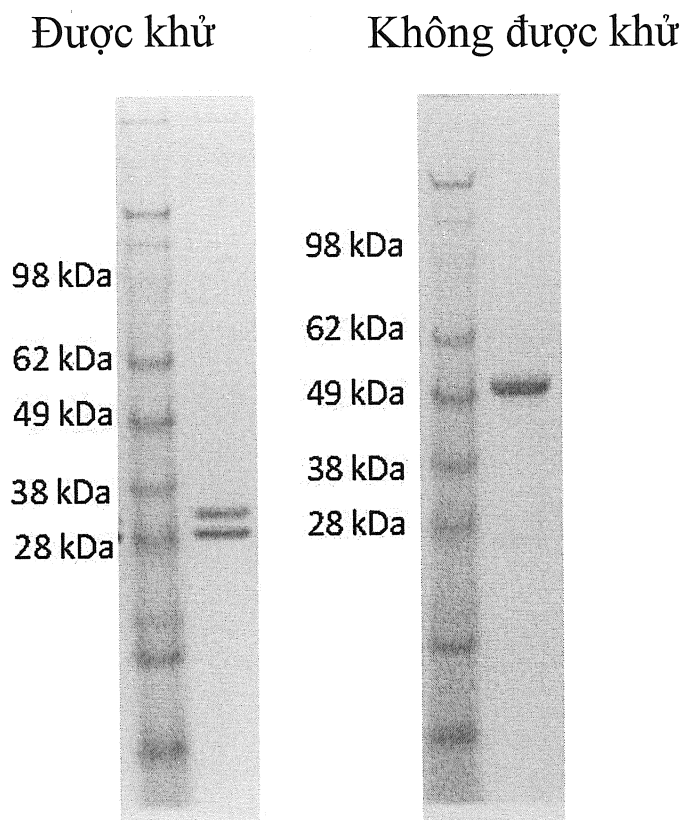


Fig.22 (Biểu đồ C-D)

**Fig.23**

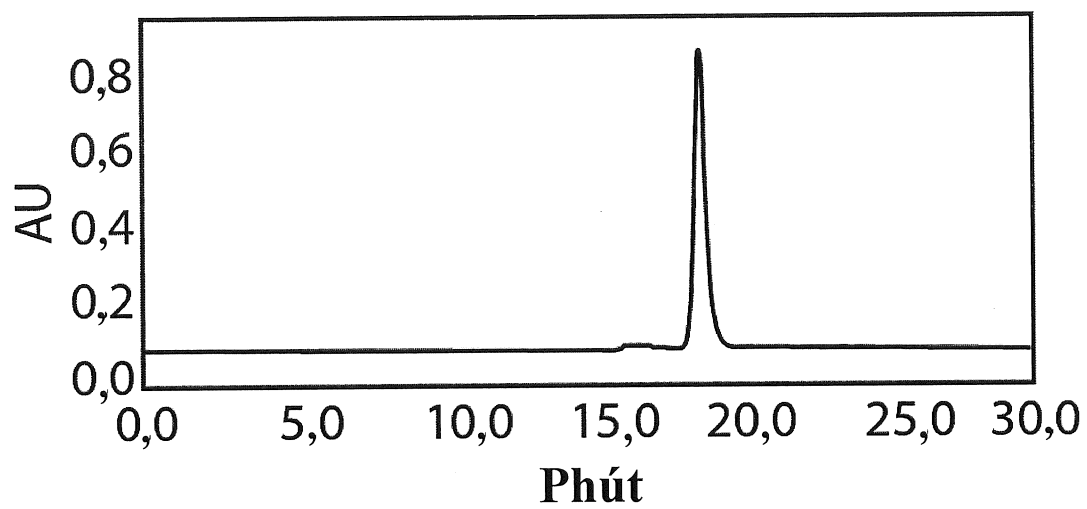


Fig.24A

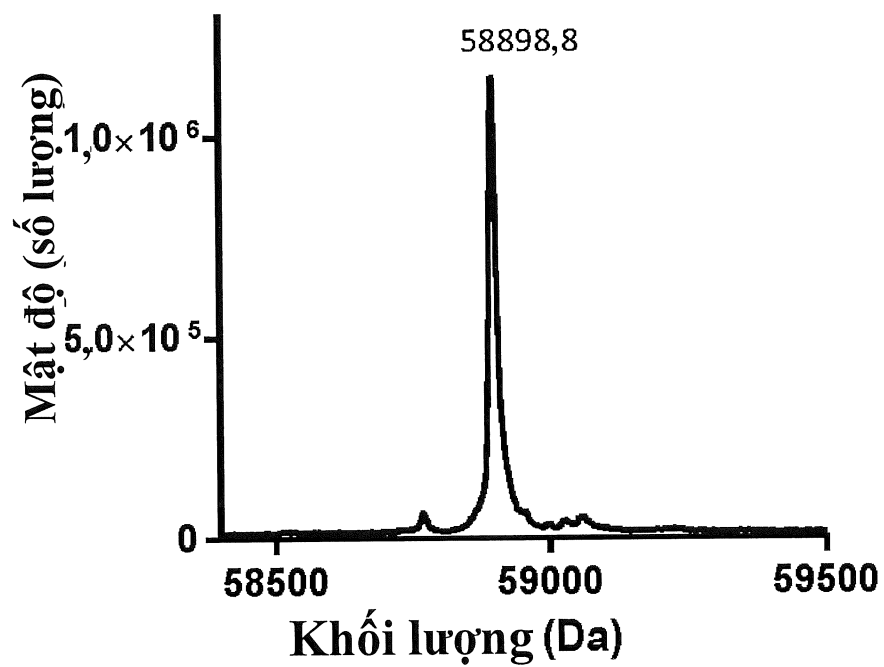
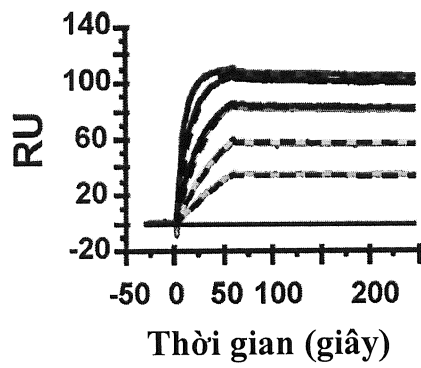
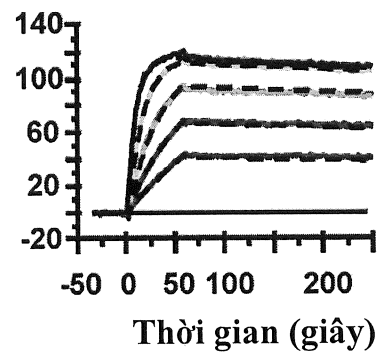
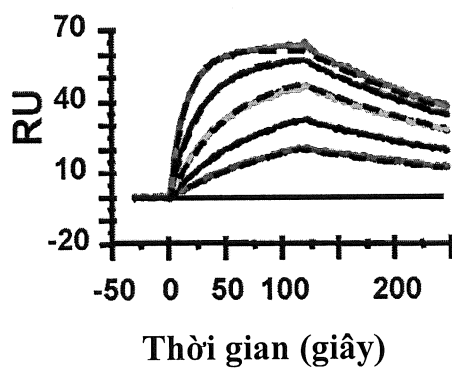
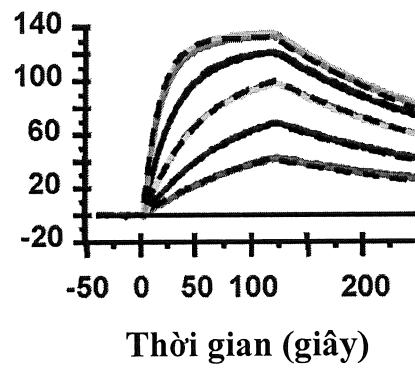


Fig.24B

CD123 của người**Fig.25A****CD123 của khỉ đuôi dài****Fig.25B****CD3 ϵ / δ của người****Fig.25C****CD3 ϵ / δ của khỉ đuôi dài****Fig.25D**

Bắt giữ: CD123 của người
Phát hiện: CD3 của người

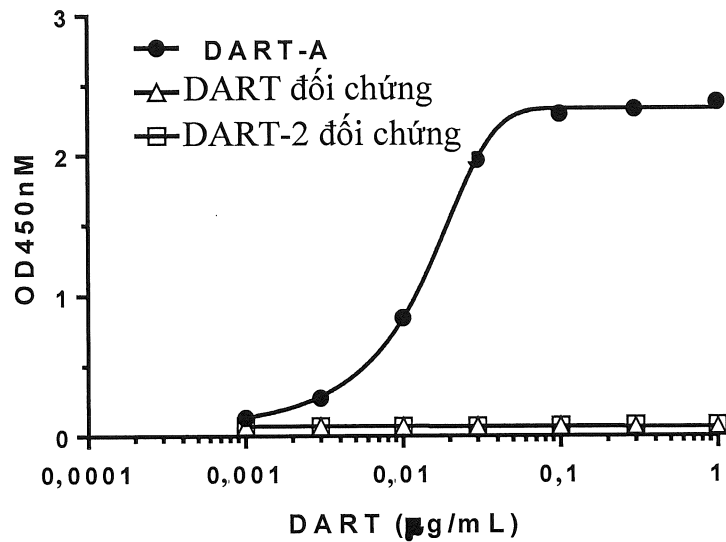


Fig.26A

Bắt giữ: CD123 của khí đuôi dài
Phát hiện: CD3 của người

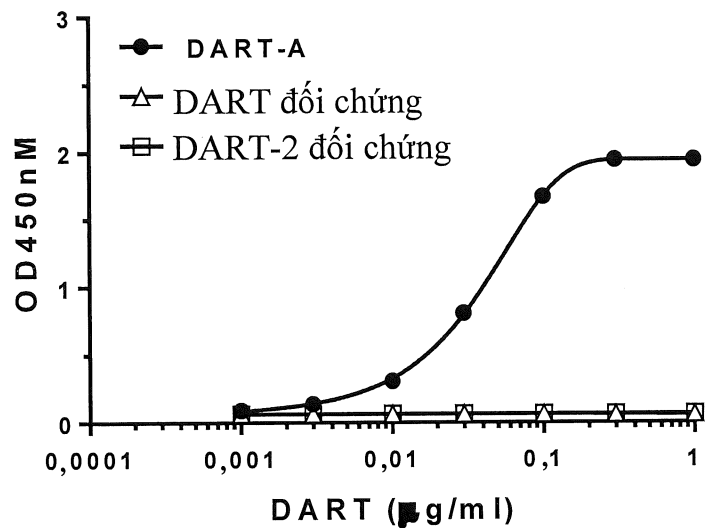
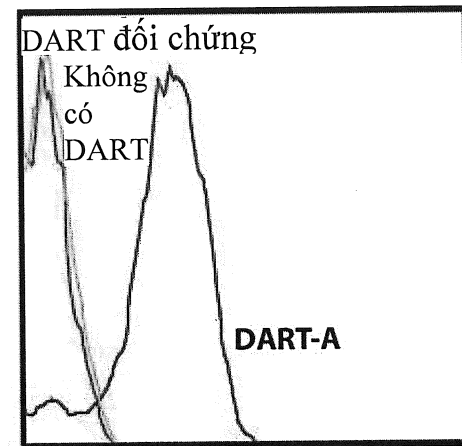
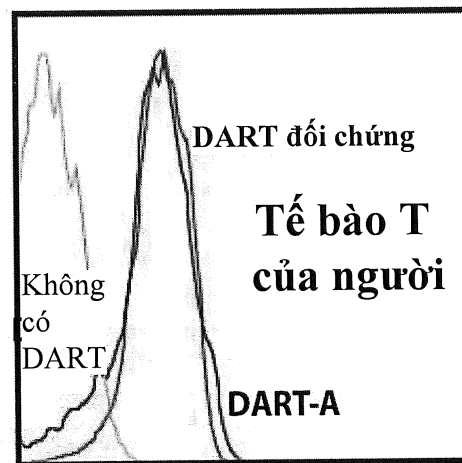


Fig.26B



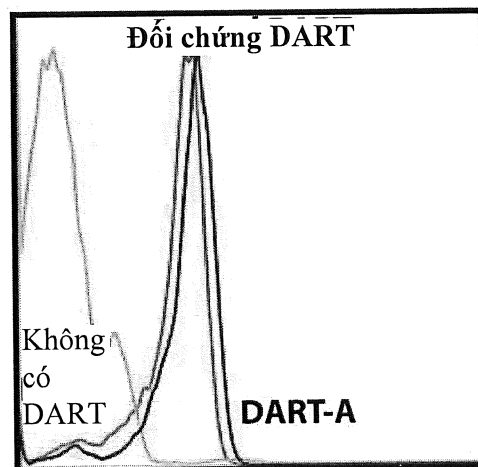
Molm-13

Fig.26C



Các tế bào T của người

Fig.26D



**Các tế bào T của khỉ
đuôi dài**

Fig.26E

α -EK

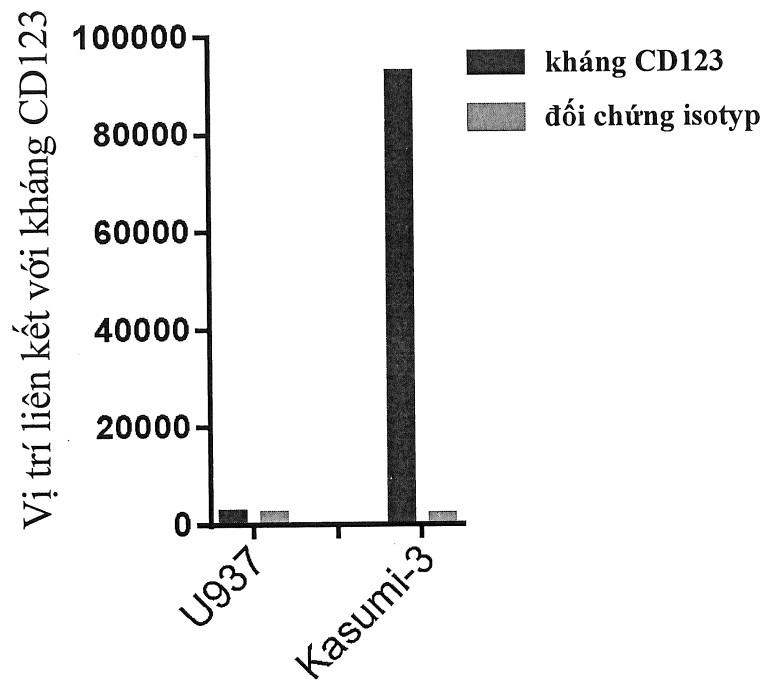


Fig.27A

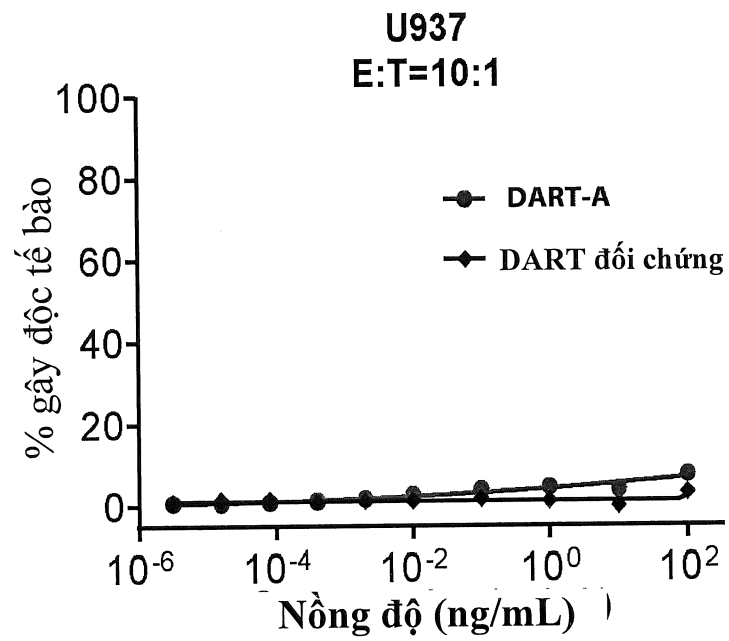


Fig.27B

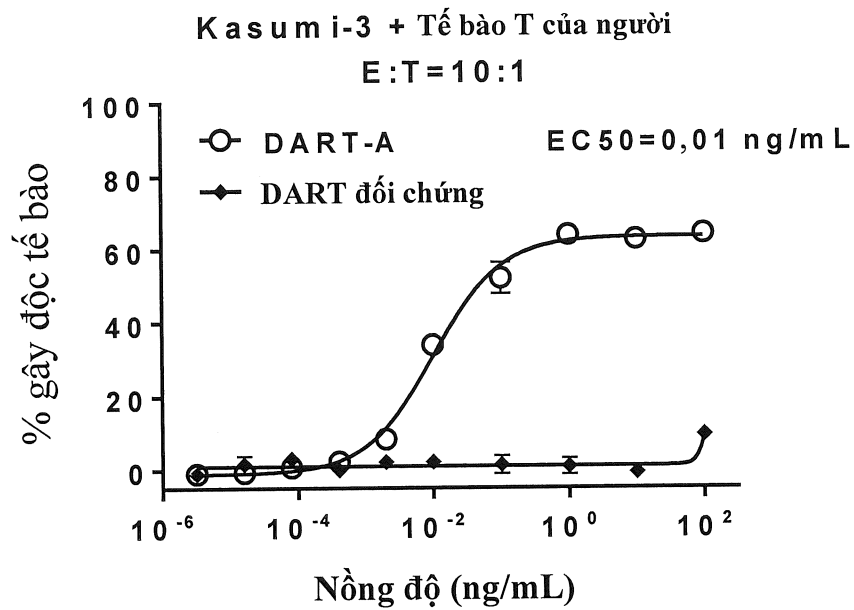


Fig.27C

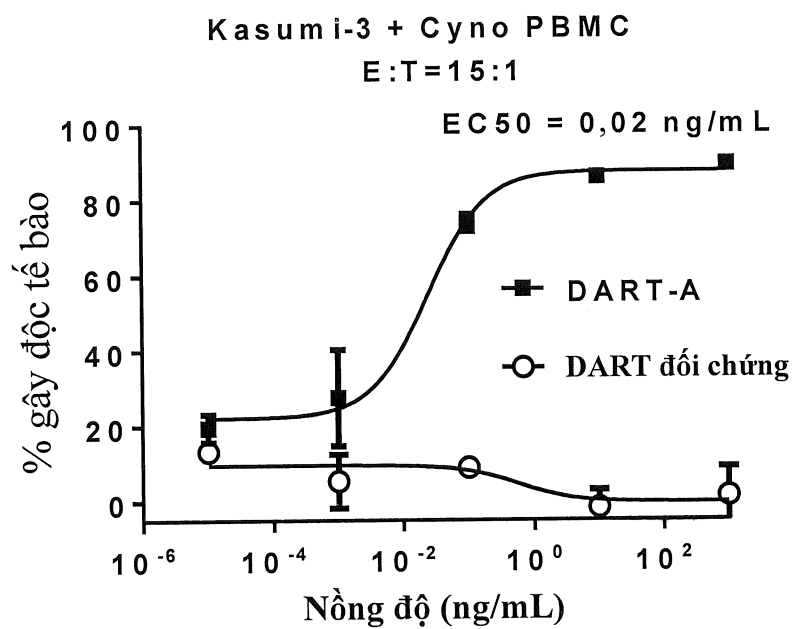


Fig.27D

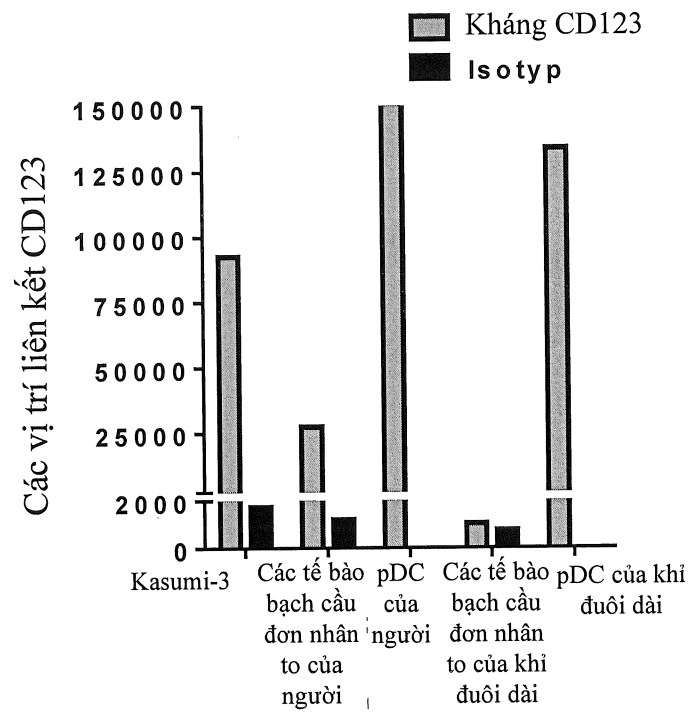


Fig.27E

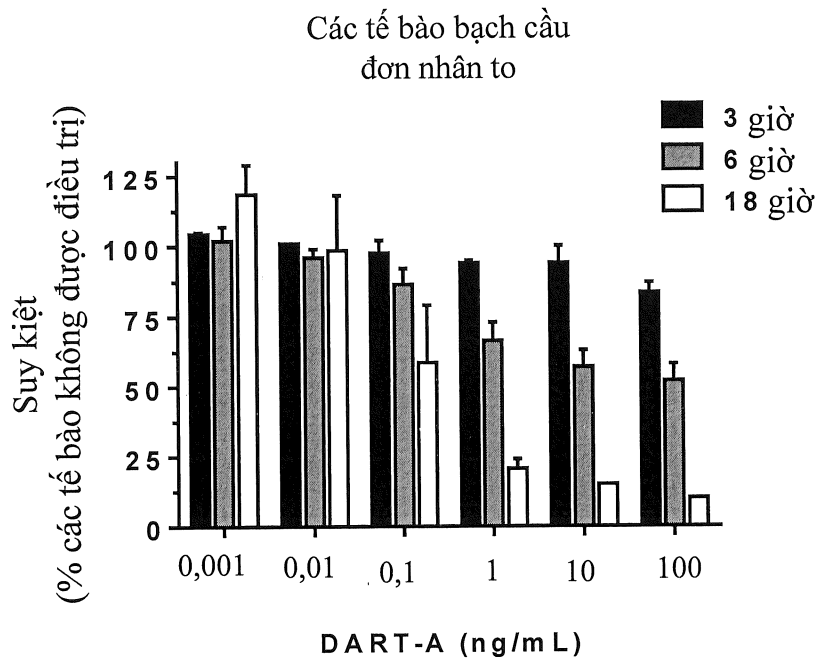


Fig.27F

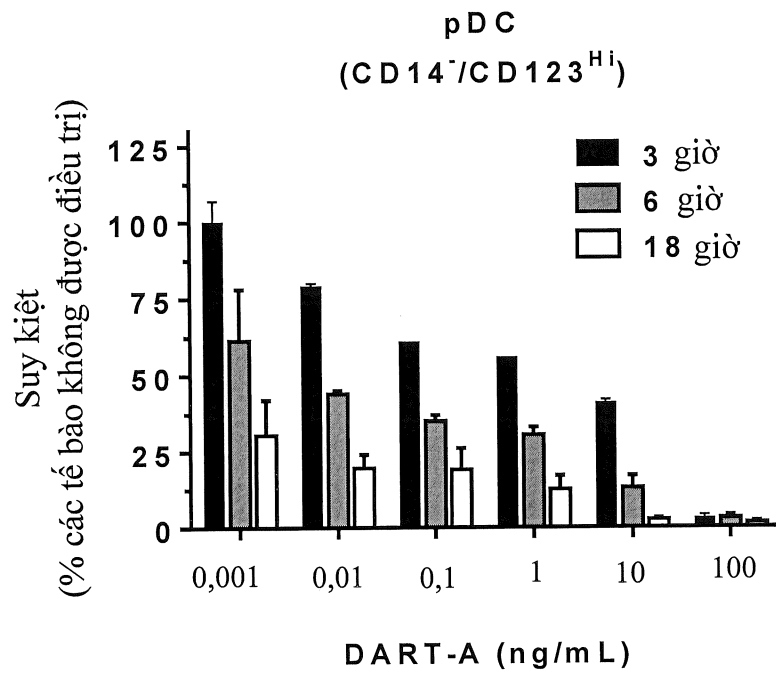


Fig.27G

PBMC của khỉ đuôi dài đơn độc
(FACS)

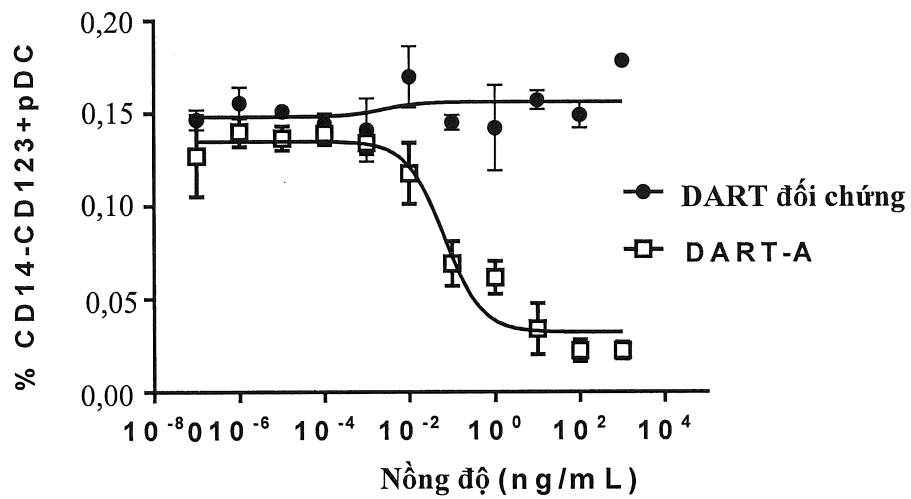


Fig.27H

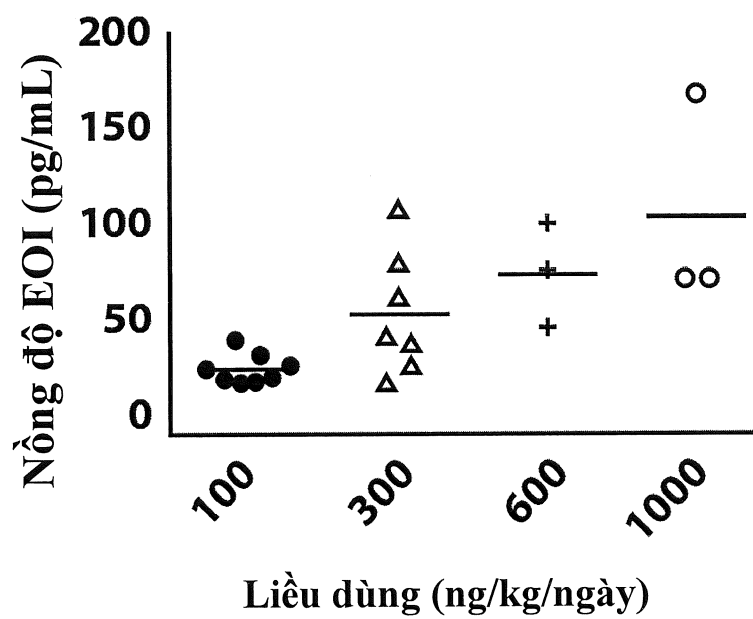
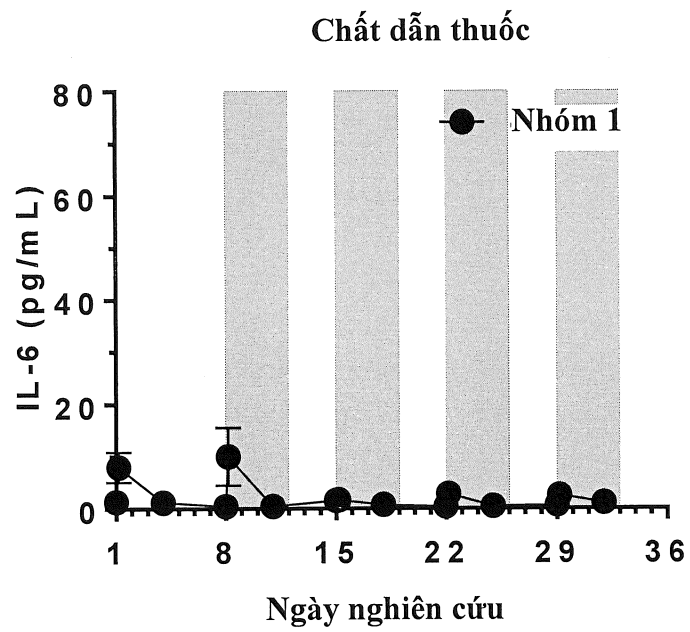
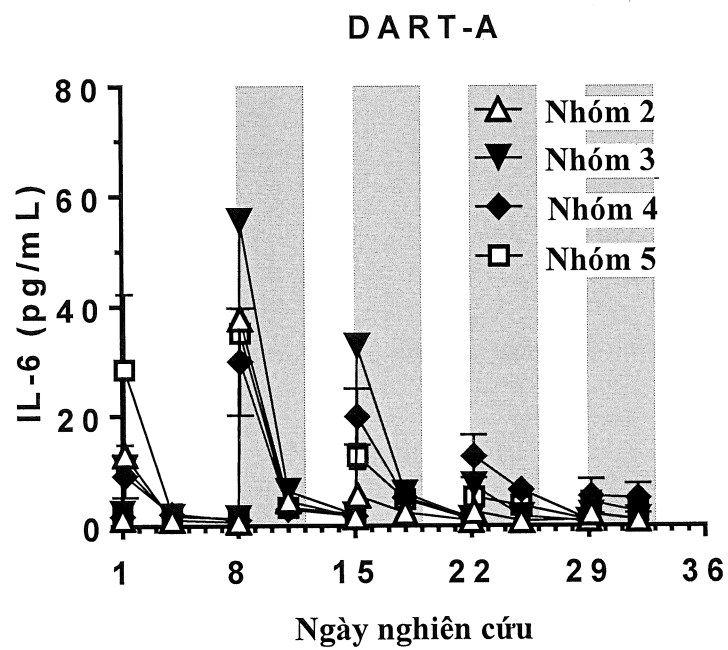
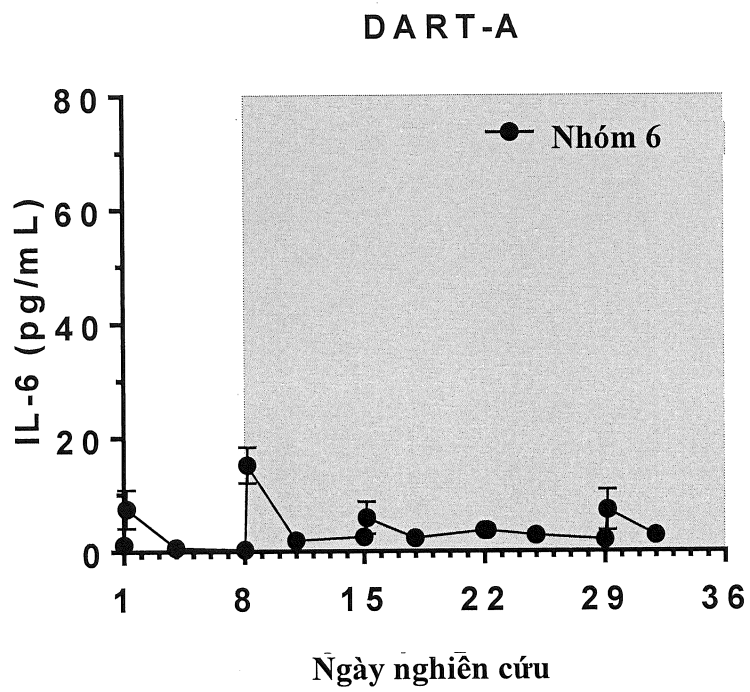


Fig.28

**Fig.29A****Fig.29B**

**Fig.29C**

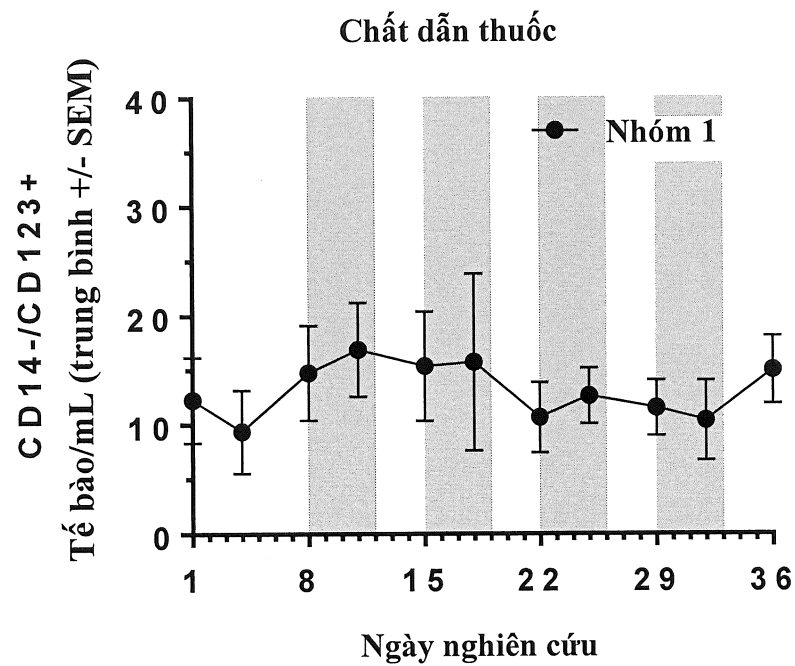


Fig.30A

A

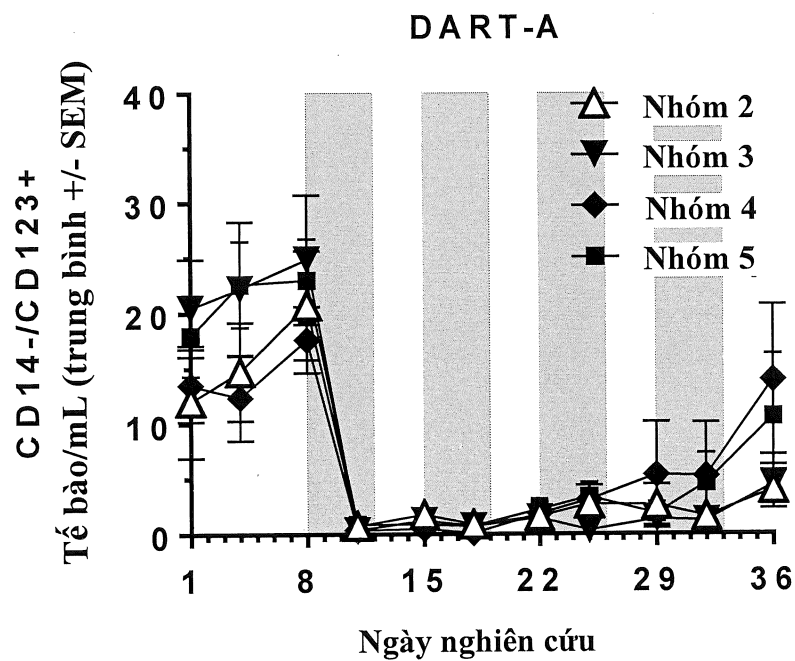
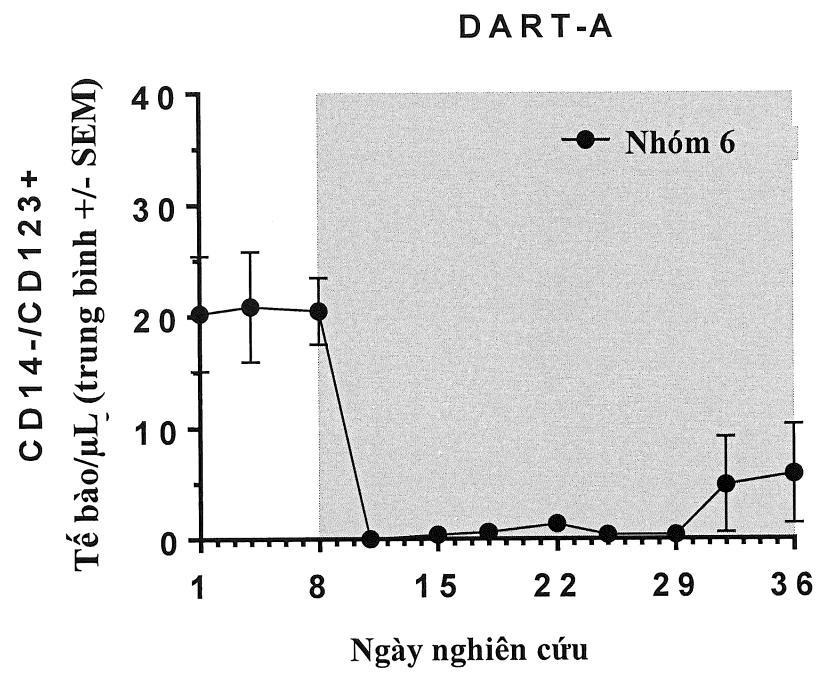


Fig.30B

**Fig.30C**

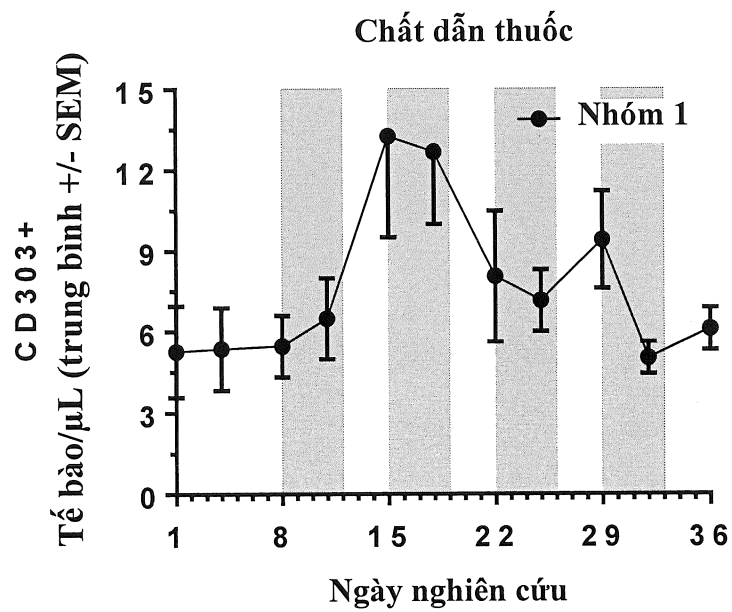


Fig.30D

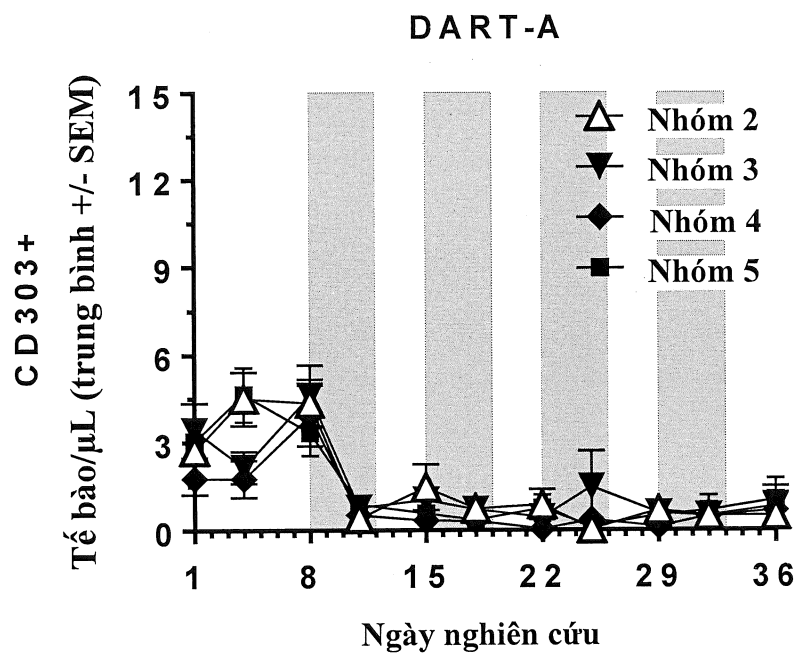
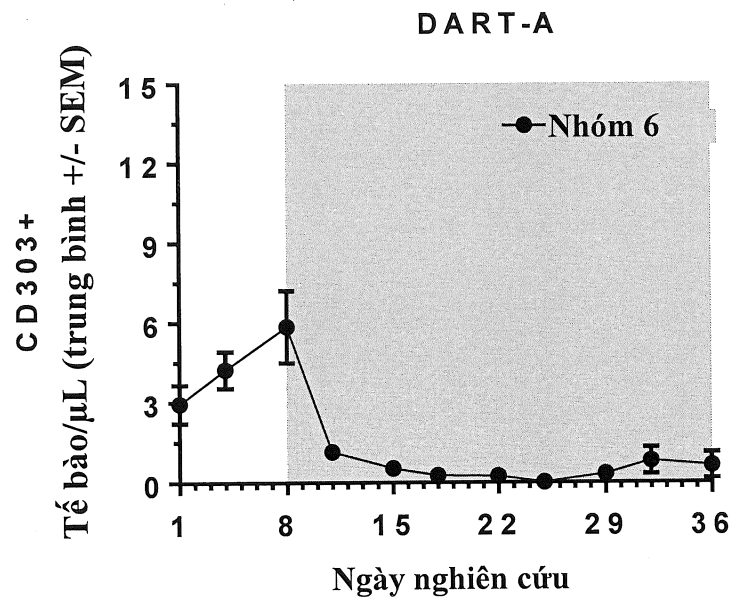


Fig.30E

**Fig.30F**

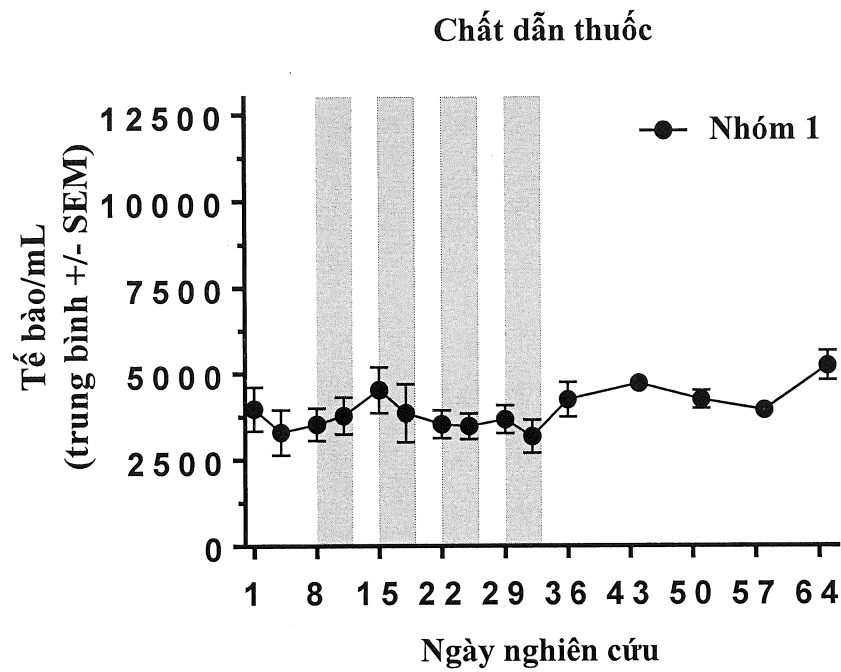


Fig.31A

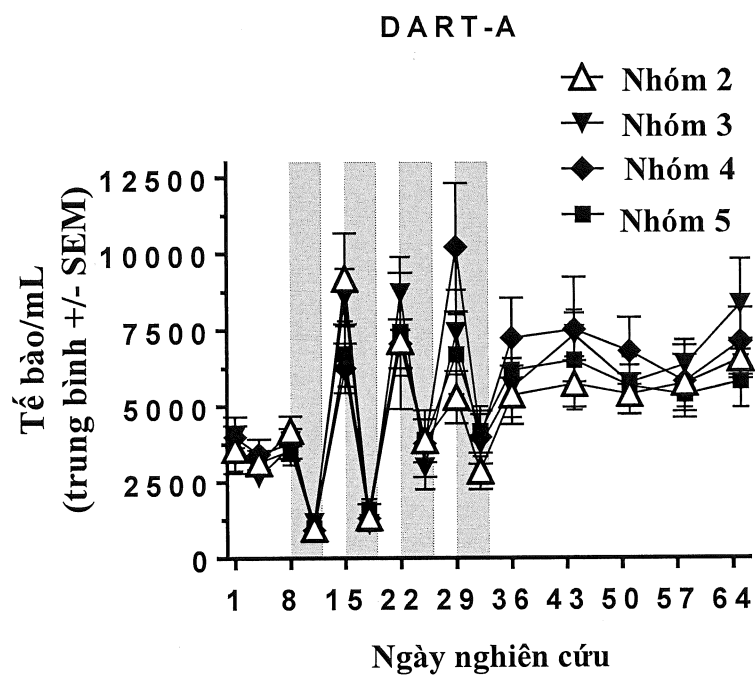


Fig.31B

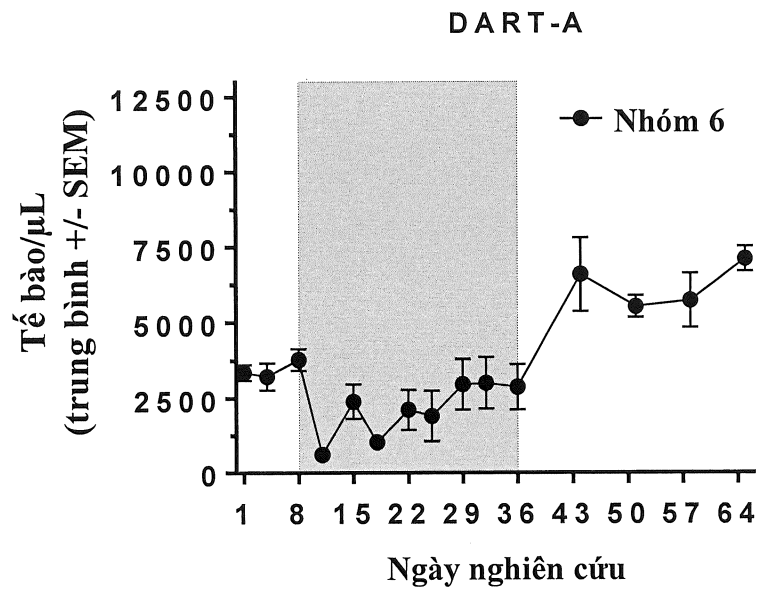


Fig.31C

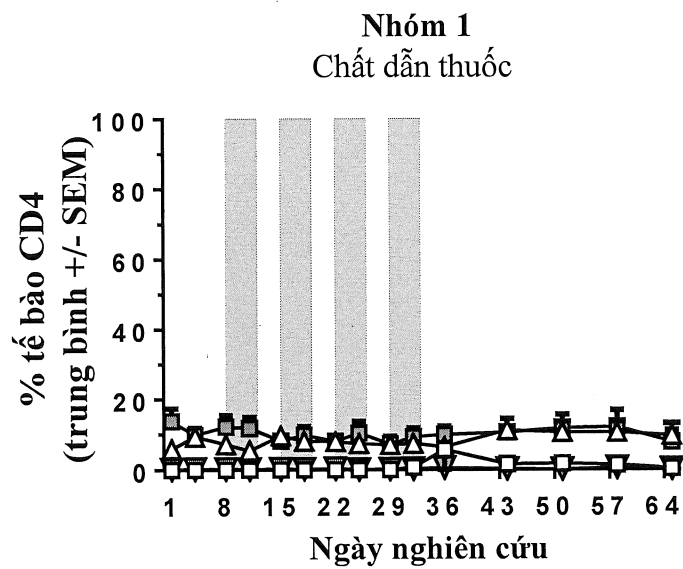
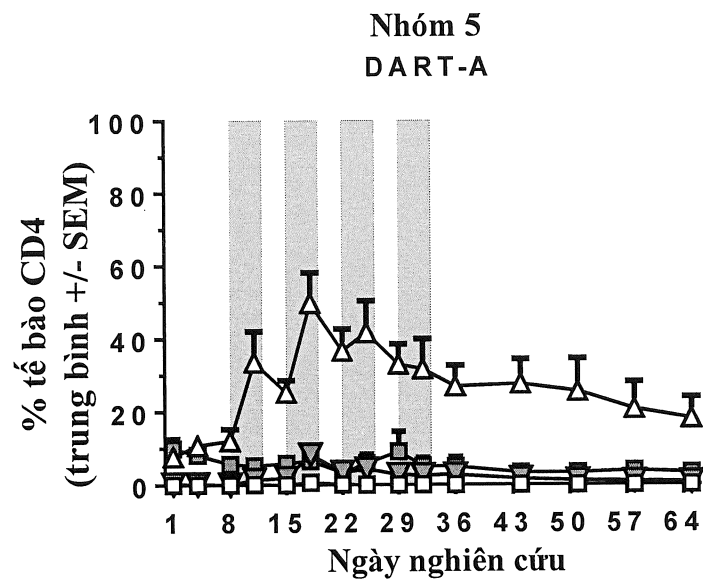
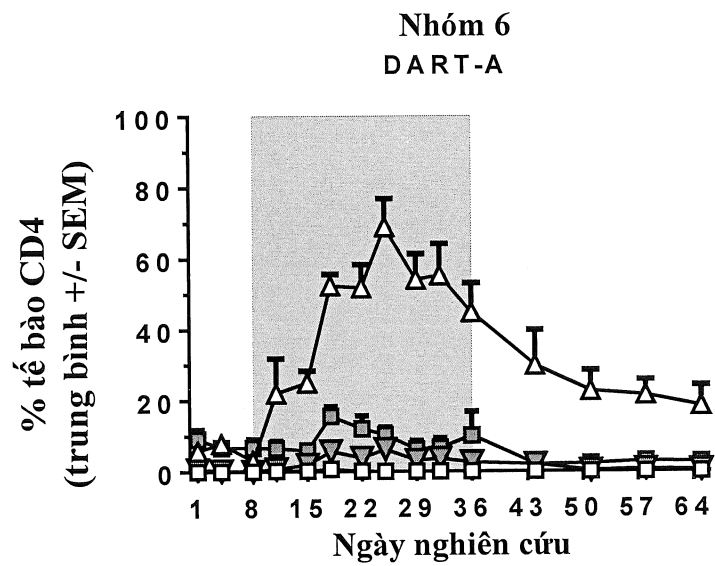


Fig.31D

**Fig.31E****Fig.31F**

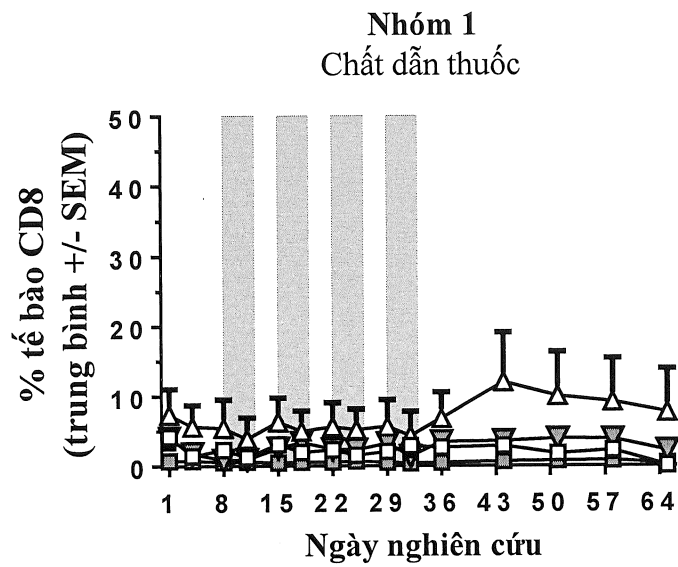


Fig.31G

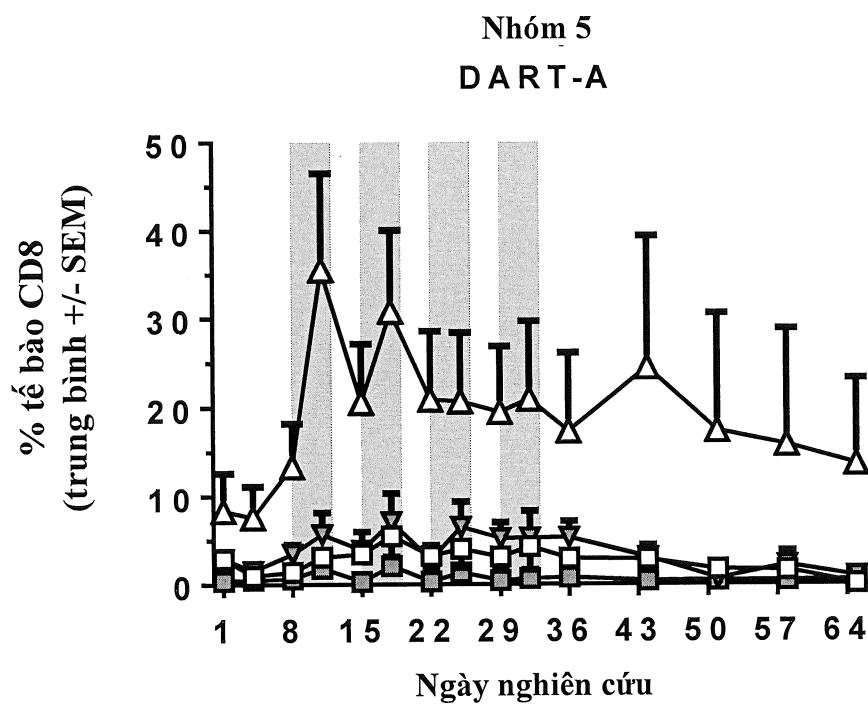
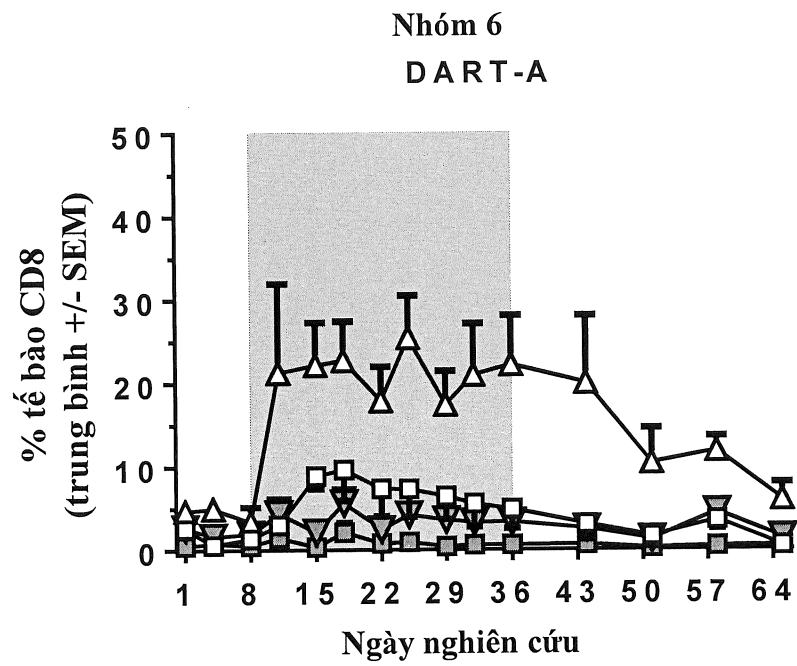


Fig.31H

**Fig.31I**

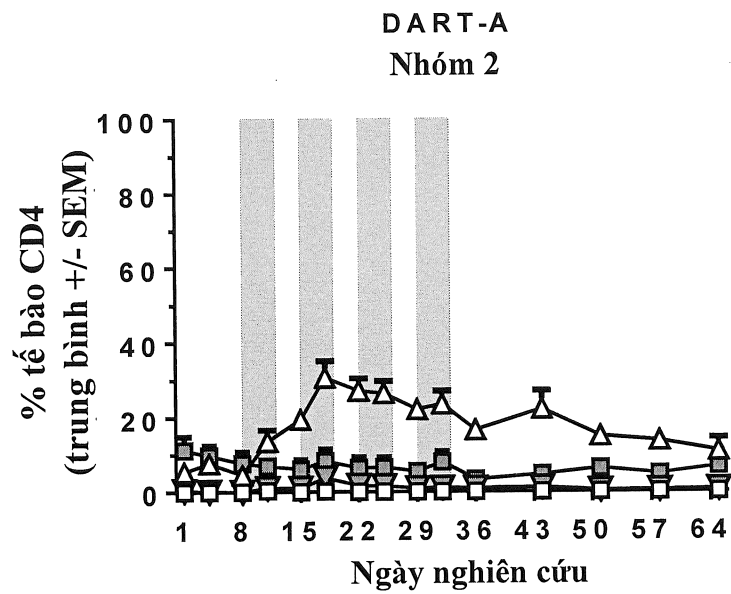


Fig.32A

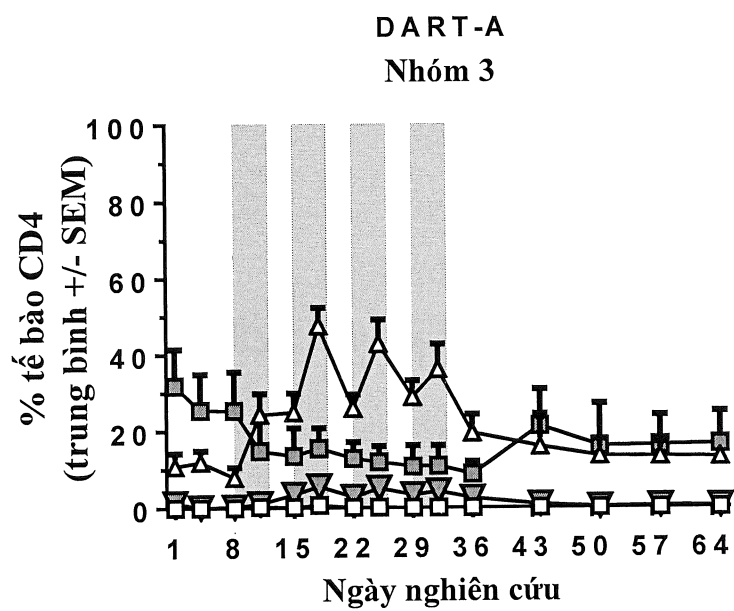
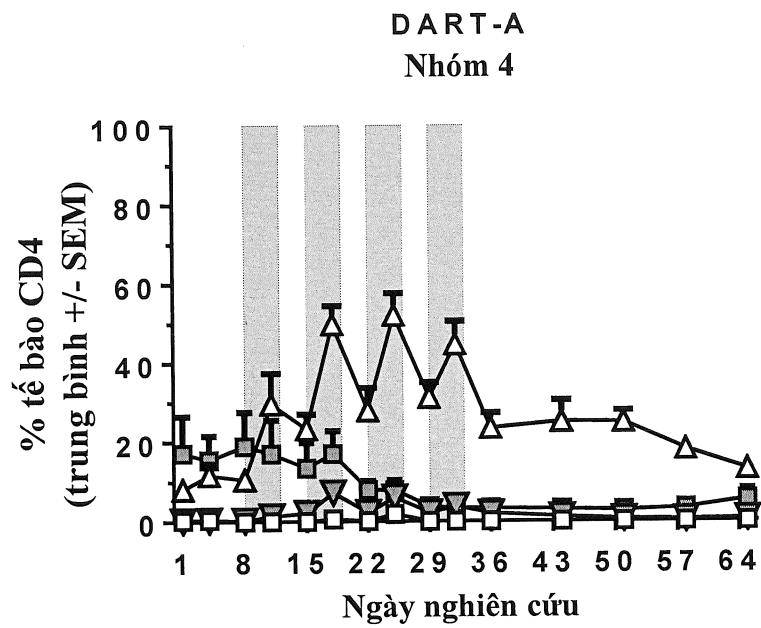
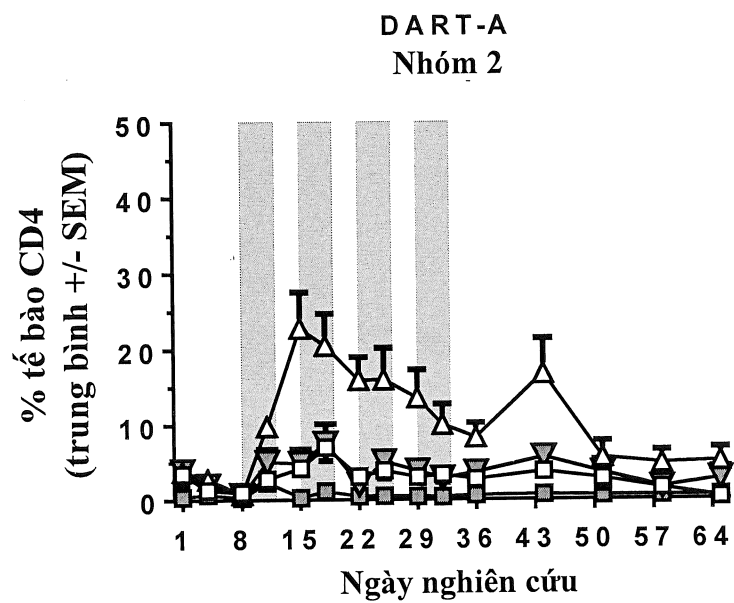
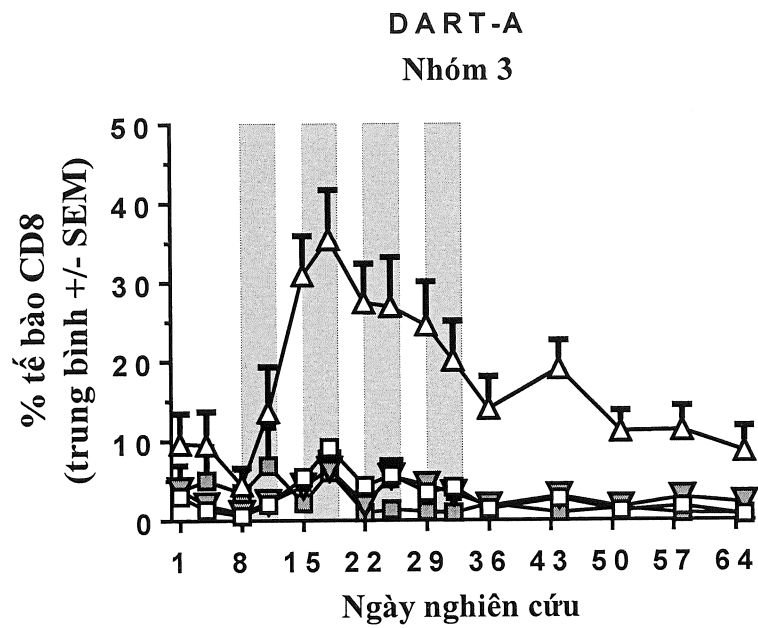
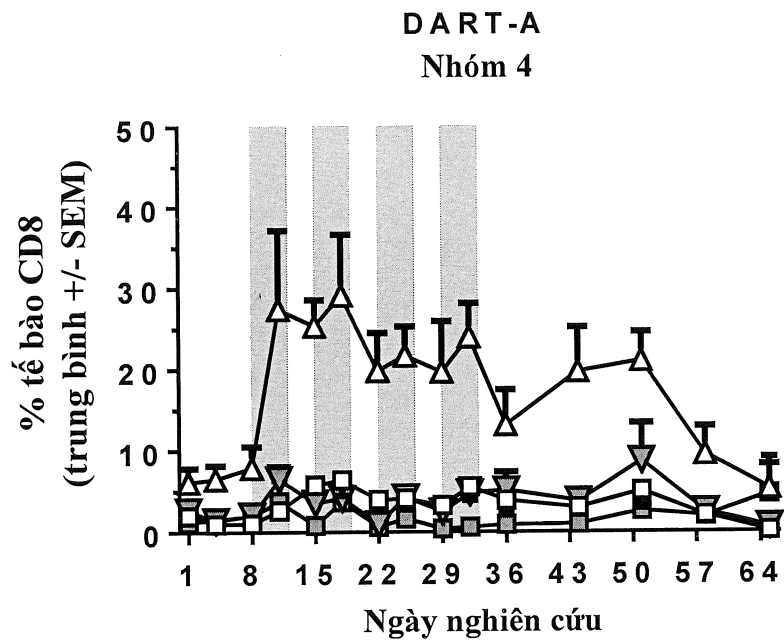
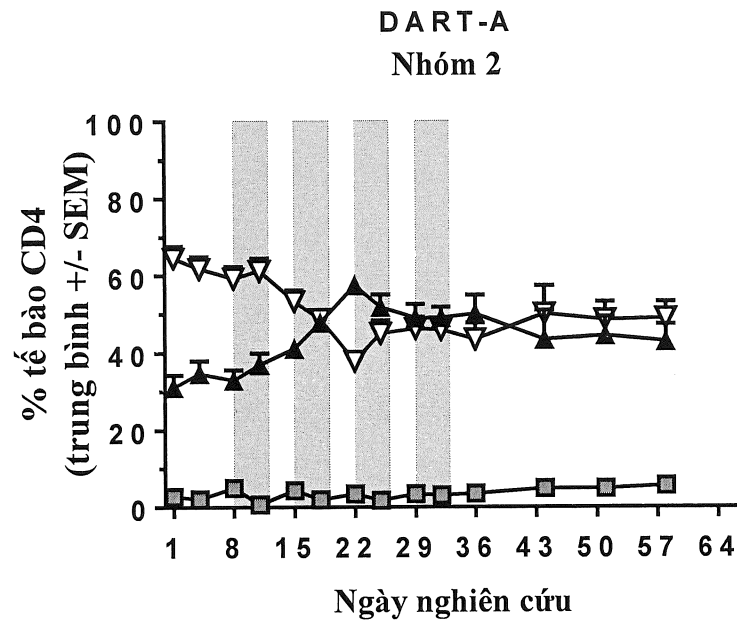
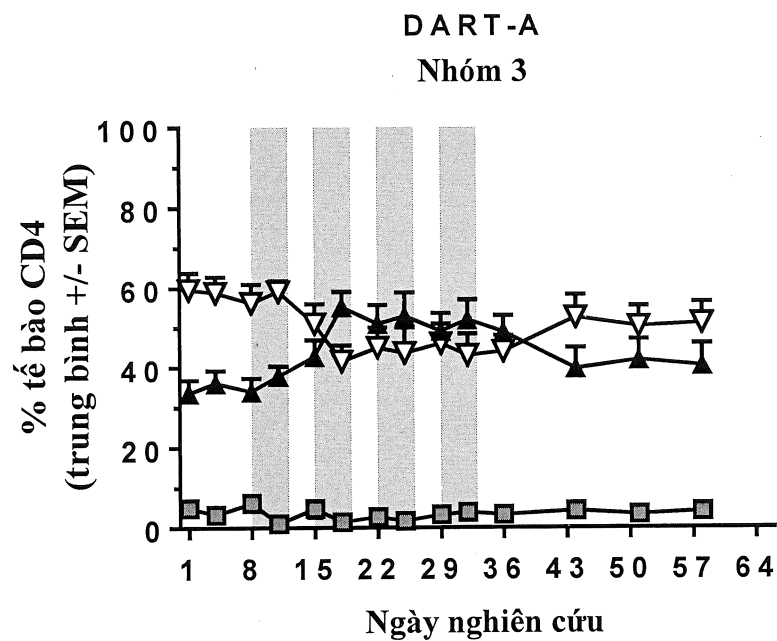


Fig.32B

**Fig.32C****Fig.32D**

**Fig.32E****Fig.32F**

**Fig.33A****Fig.33B**

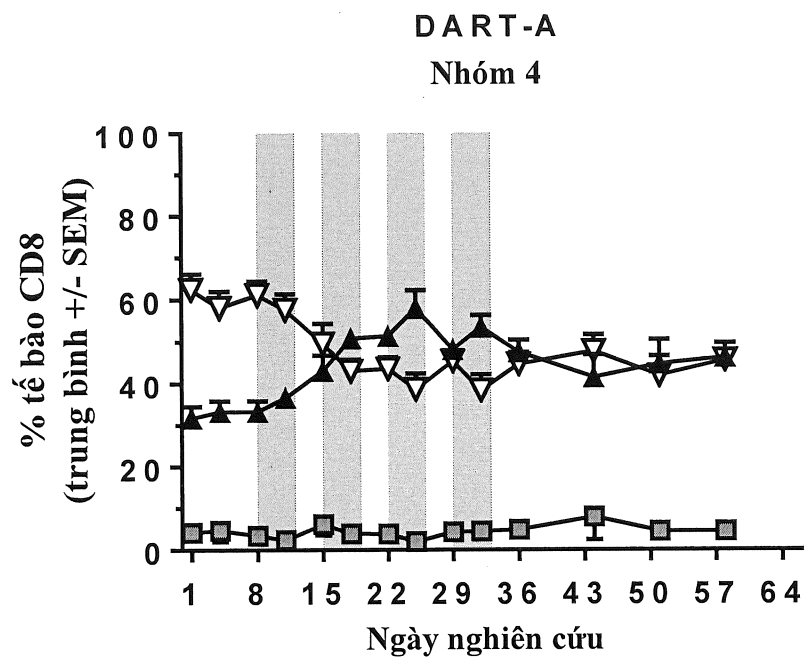


Fig.33C

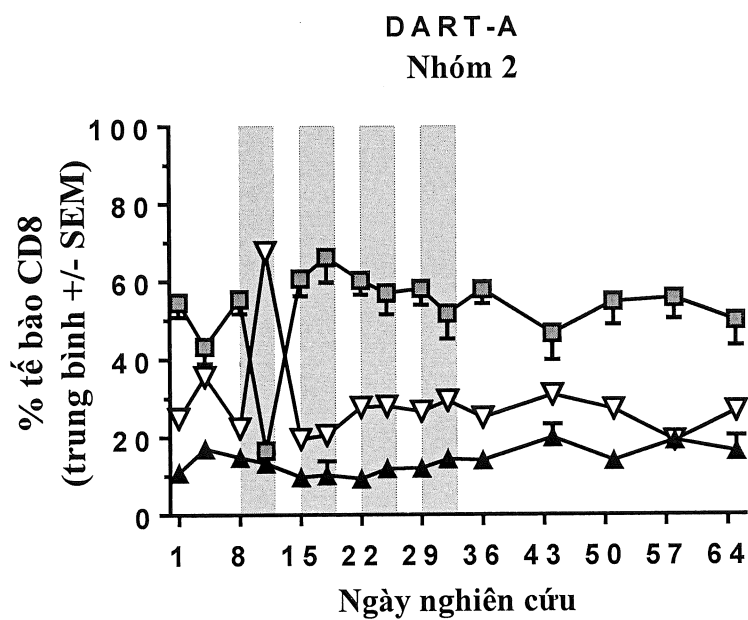
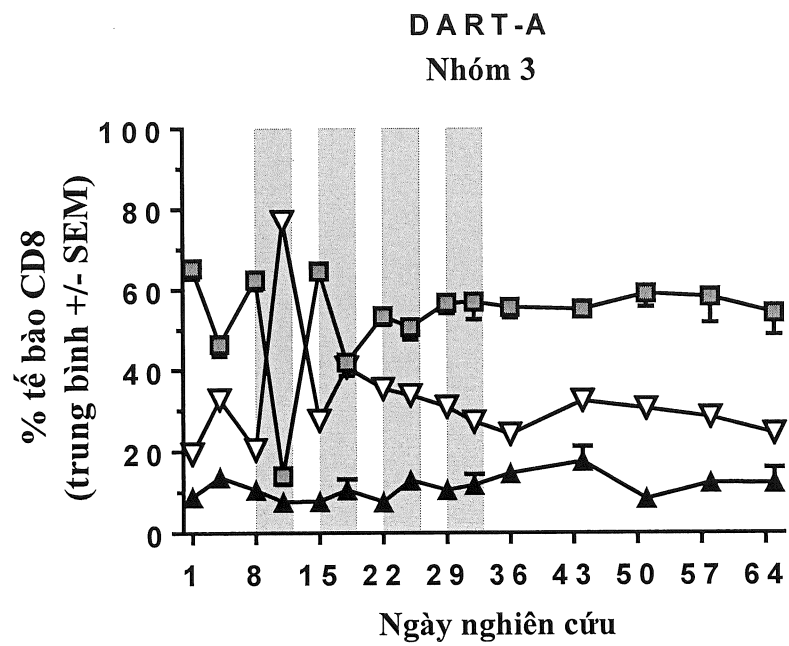
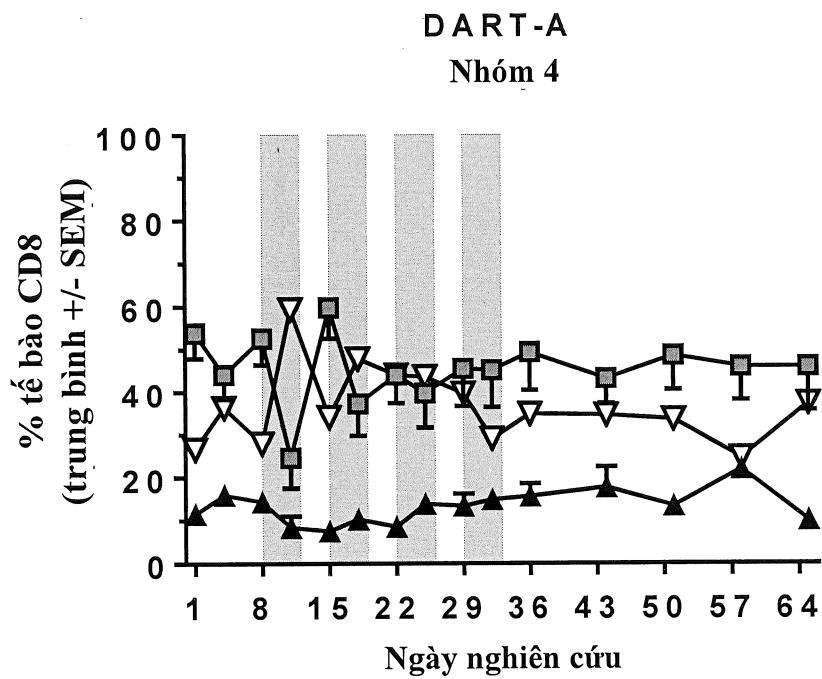


Fig.33D

**Fig.33E****Fig.33F**

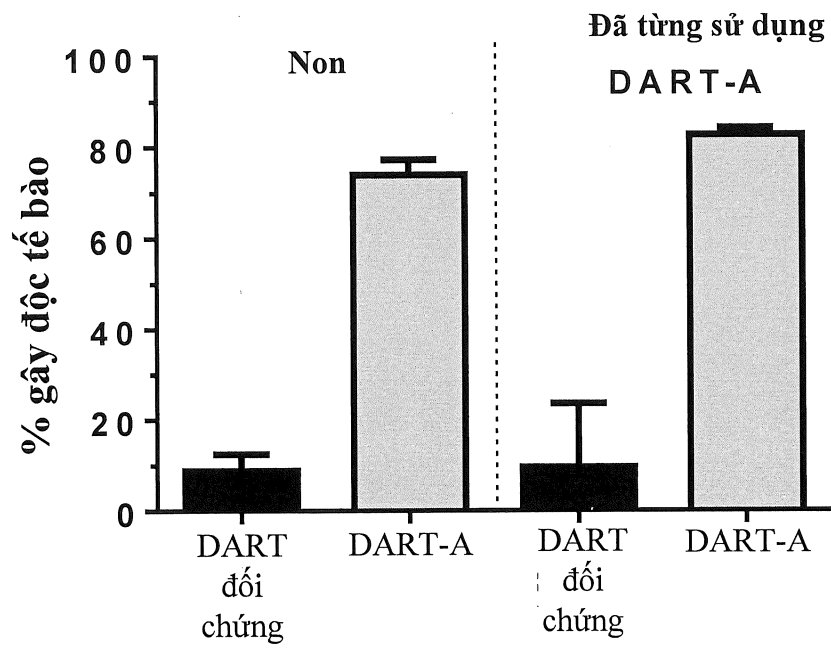


Fig.34

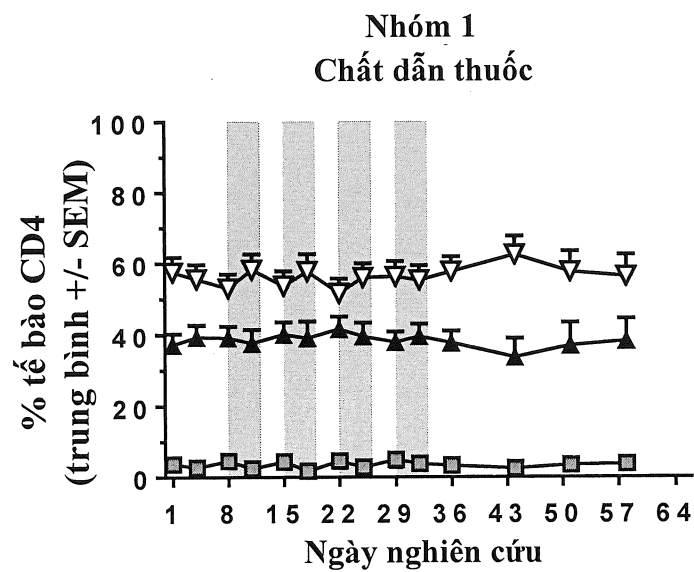


Fig.35A

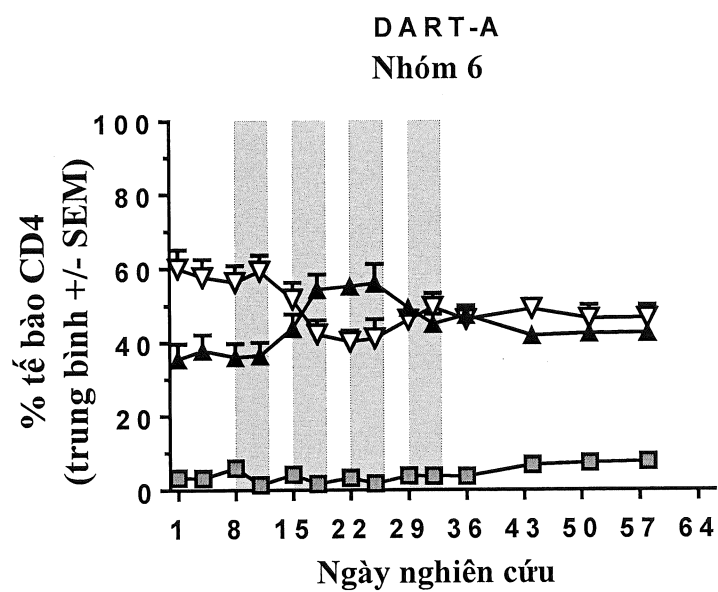


Fig.35B

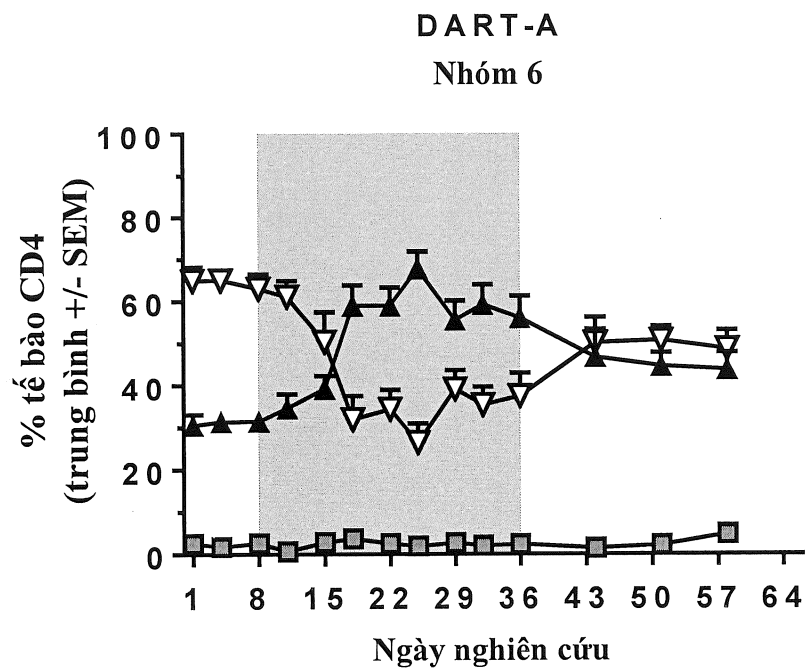


Fig.35C

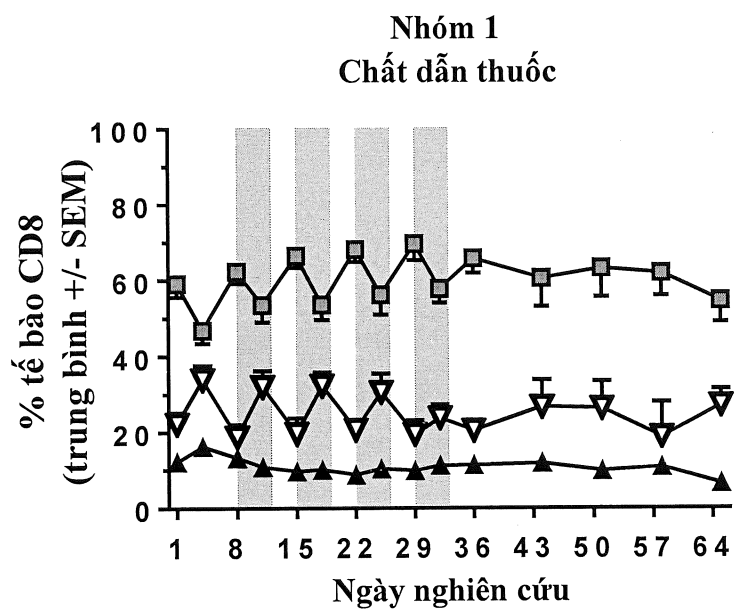


Fig.35D

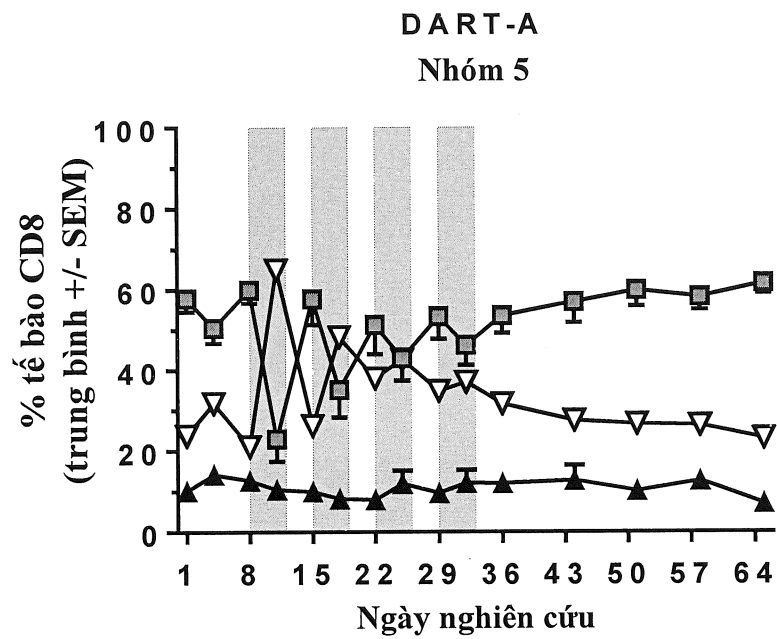


Fig.35E

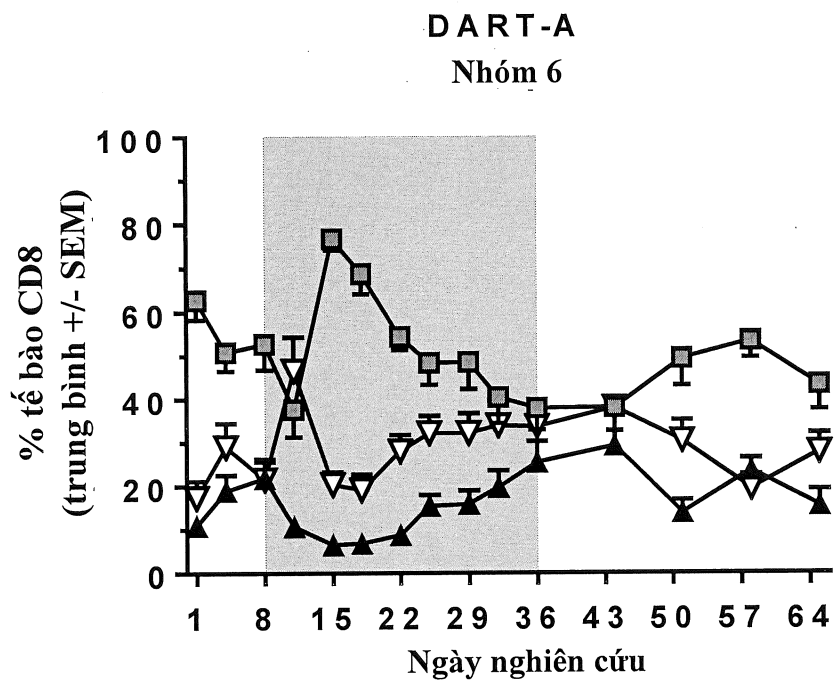


Fig.35F

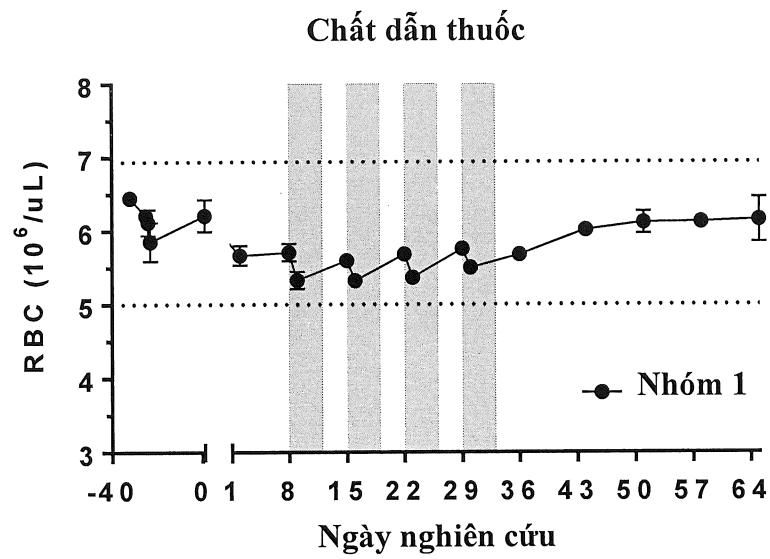


Fig.36A

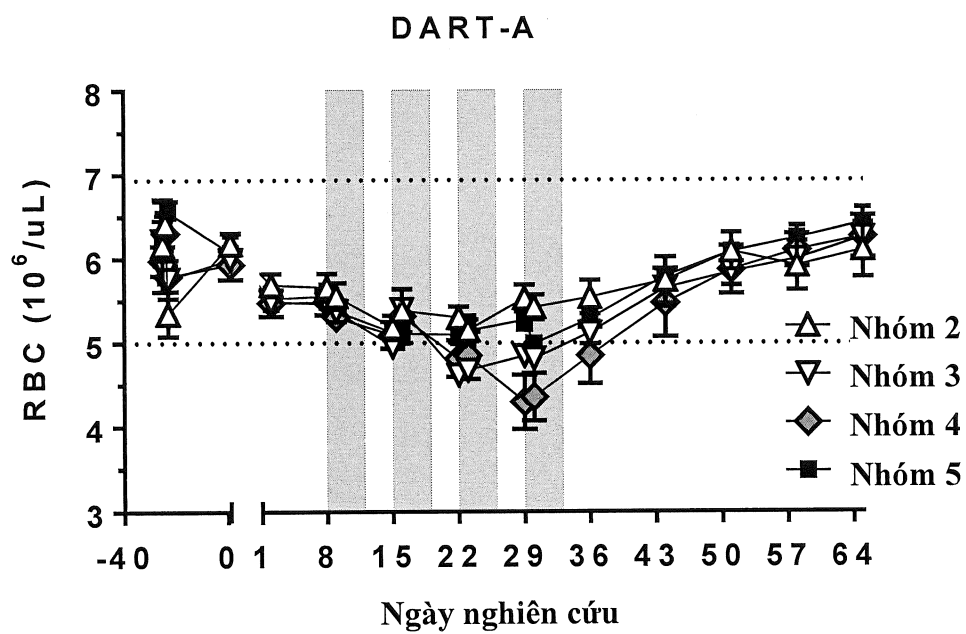


Fig.36B

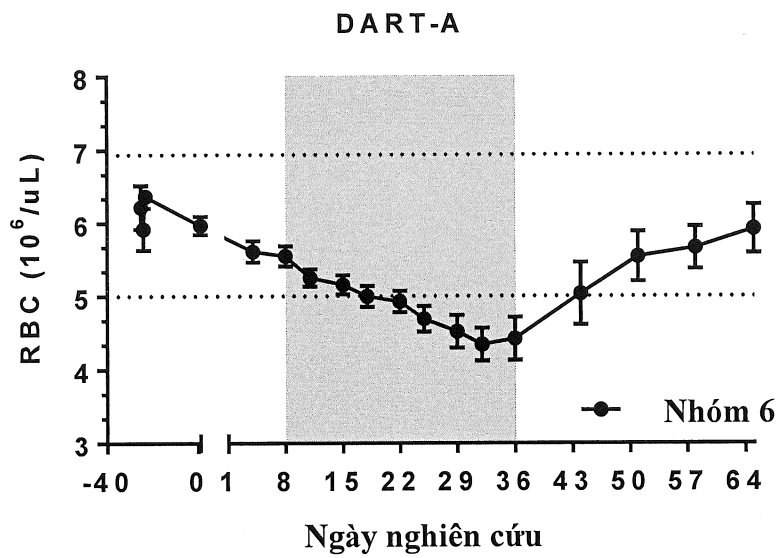


Fig.36C

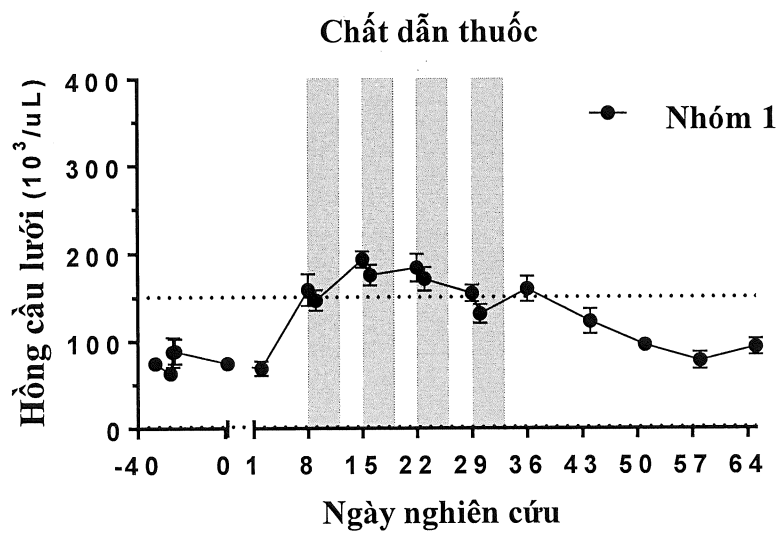


Fig.36D

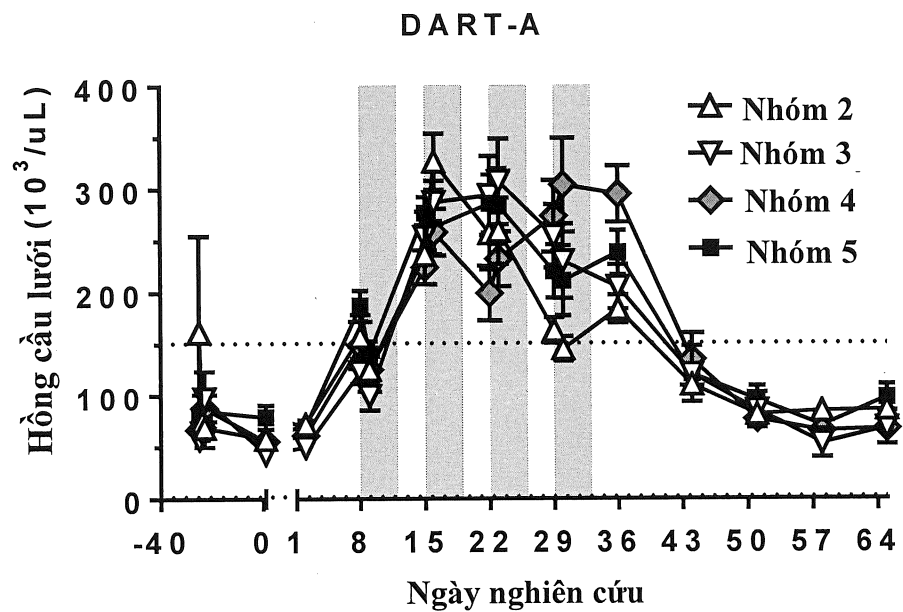


Fig.36E

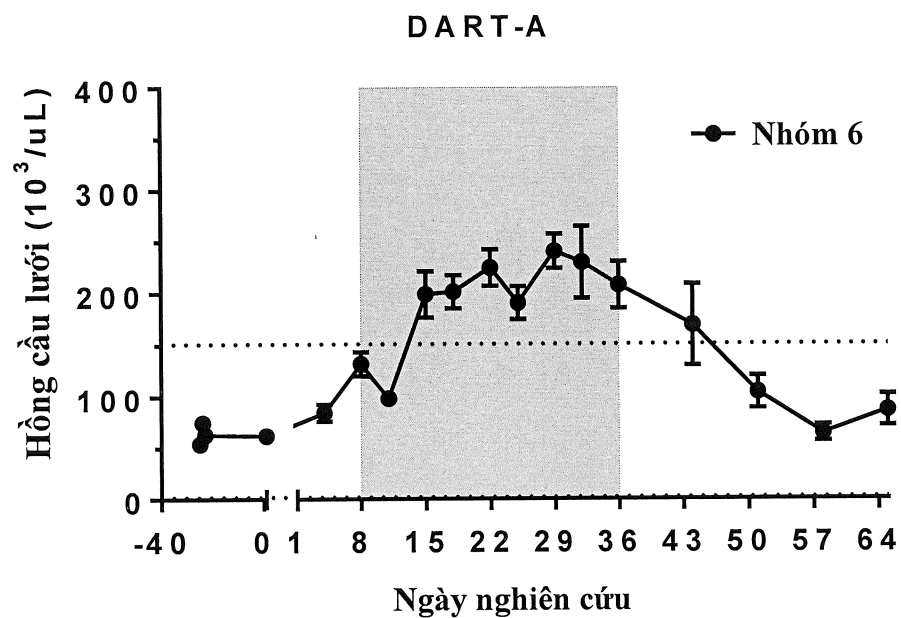


Fig.36F

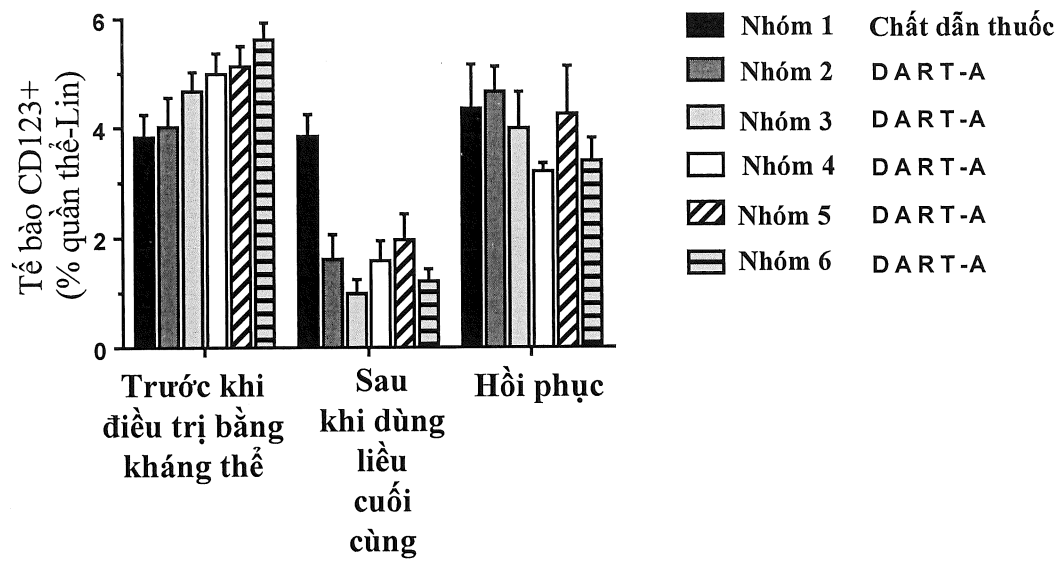


Fig.37A

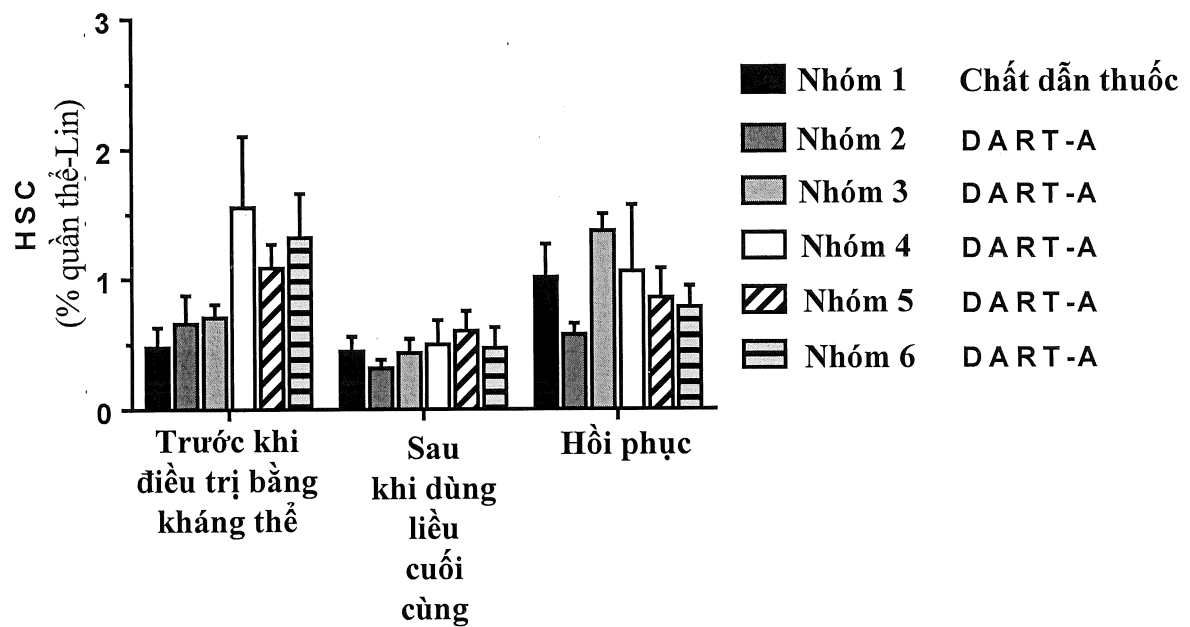


Fig.37B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> KHÁNG THỂ ĐÔI ĐƠN TRỊ ĐẶC HIỆU KÉP CÓ KHẢ NĂNG LIÊN KẾT VỚI CD123 VÀ
 CD3 VÀ ĐƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 1301.0109PCT

<150> US 61/869,510
 <151> 2013-08-23

<150> US 61/907,749
 <151> 2013-11-22

<150> EP 13198784
 <151> 2013-12-29

<150> US 61/990,475
 <151> 2014-05-08

<160> 59

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-A

<400> 1

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

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

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

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

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125
 Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr
 165 170 175
 Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp
 210 215 220
 Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 245 250 255
 Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270
 <210> 2
 <211> 816
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-A
 <400> 2
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgato ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180

```

cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat ccggcggcgg aggcgaggtg      360
cagctggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc      420
aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga      480
cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt ccttccaacg gggccacttt ctacaatcag      540
aagtttaaag gcagggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag      600
ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg      660
agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga      720
tgtggcggtg gagaagtggc cgcactggag aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc      780
gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg gagaaa      816

```

<210> 3

<211> 280

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của DART-A

<400> 3

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
275 280

<210> 4

<211> 840

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit thứ hai của DART-A

<400> 4

gacttcgtga tgacacagtc tctgatagtc ctggccgtga gtctggggga gcggtgact 60

atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa atcagaaaaa ctatctgacc 120

tggtaccagc agaagccagg ccagccccct aaactgctga tctattgggc ttccaccagg 180

gaatctggcg tgcccagacag attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca 240

atttctagtc tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat 300

```

ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc cggcggcgga      360
ggcgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtcc agcctggagg gtccctgaga      420
ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agcacatacg ctatgaattg ggtccgccag      480
gctccaggga aggggctgga gtgggttgga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca      540
acctactatg ccgactctgt gaaggataga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac      600
tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggccgtgta ttactgtgtg      660
agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tcttggtttg cttattgggg acaggggaca      720
ctggtgactg tgtcttcggg aggatgtggc ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa      780
gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag      840

```

<210> 5

<211> 268

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-B

<400> 5

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

130	135	140
Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu		
145	150	155 160
Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln		
	165	170 175
Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr		
	180	185 190
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	195	200 205
Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp		
	210	215 220
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly		
225	230	235 240
Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val		
	245	250 255
Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys		
	260	265

<210> 6
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-B

<400> 6

gacattcagc tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gagccagttc aagtgttaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc	120
acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaagtgg cttctggagt cccttatcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcatac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa	240
gatgctgcc aattattactg ccaacagtgg agtagtaacc cgctcacgtt cggtgctggg	300
accaagctgg agctgaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggtgca gctggtgcag	360
tccggggctg agctgaagaa acccggagct tccgtgaagg tgtcttgcaa agccagtggc	420
tacaccttca cagactacta tatgaagtgg gtcaggcagg ctccaggaca gggactggaa	480
tggatcggcg atatcattcc ttccaacggg gccactttct acaatcagaa gtttaaaggc	540

```

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

```

<210> 7

<211> 274

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của DART-B

<400> 7

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```


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

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

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

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

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

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

Lys Glu

<210> 8

<211> 822

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit thứ hai của DART-B

<400> 8

gacttcgtga tgacacagtc tcctgatagt ctggccgtga gtctggggga gcggtgact	60
atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa atcagaaaaa ctatctgacc	120
tggtaccagc agaagccagg ccagccccct aaactgctga tctattgggc ttccaccagg	180
gaatctggcg tgcccgcagc attcagcggc agcggcagcg gcacagatct taccctgaca	240
atttctagtc tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat	300
ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc cggcggcgga	360
ggcgatatca aactgcagca gtcaggggct gaactggcaa gacctggggc ctcagtgaag	420
atgtcctgca agacttctgg ctacaccttt actaggtaca cgatgcactg ggtaaacag	480
aggcctggac agggctctgga atggattgga tacattaatc ctagccgtgg ttataactaat	540
tacaatcaga agttcaagga caaggccaca ttgactacag acaaatcctc cagcacagcc	600
tacatgcaac tgagcagcct gacatctgag gactctgcag tctattactg tgcaagatat	660
tatgatgatc attactgcct tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctcc	720

ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag 780

aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag ag 822

<210> 9

<211> 322

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit của kháng thể đối CD123 x CD3 có vị trí liên kết albumin

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

195	200	205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp		
210	215	220
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly		
225	230	235 240
Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu		
	245	250 255
Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys		
	260	265 270
Gly Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu		
	275	280 285
Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala		
	290	295 300
Lys Ser Ala Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala		
305	310	315 320

Leu Pro

<210> 10
 <211> 966
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polynucleotit mã hóa chuỗi polypeptit của kháng thể đôi CD123 x CD3
 có vị trí liên kết albumin

<400> 10

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg	60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag	120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa aaaaagggc tccttgacc	180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca	240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc	300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggcgg aggcgaggtg	360
cagctgggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag ctccgtgaa ggtgtcttgc	420
aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga	480
cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt ccttccaacg gggccacttt ctacaatcag	540

```

aagtttaaag gcaggggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag      600
ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg      660
agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga      720
tgtggcggtg gagaagtggc cgcactggag aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc      780
gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg gagaaaggcg gcgggtctct ggccgaagca      840
aaagtgcctg ccaaccgcga actggataaa tatggcgtga gcgattatta taagaacctg      900
attgacaacg caaaatccgc ggaaggcgtg aaagcactga ttgatgaaat tctggccgcc      960
ctgcct

```

```

<210> 11
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>

```

```

<223> Miền CH2-CH3 của vùng Fc của kháng thể người đã cải biến

```

```

<400> 11

```

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 12

<211> 681

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử axit nucleic mã hóa peptit 1 và miền CH2 và CH3
của vùng Fc IgG

<400> 12

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc	60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggcca agttcaactg gtacgtggac	180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	420
aaccagggtca gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc	540
gacggctcct tcttctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc	660
ctctccctgt ctccgggtaa a	681

<210> 13

<211> 510

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1

<400> 13

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala

```

	245		250		255
Leu Glu Lys	Glu Val Ala Ala	Leu Glu Lys	Glu Val Ala	Ala Leu Glu	
	260		265		270
Lys Glu Val	Ala Ala Leu Glu	Lys Gly Gly Gly	Asp Lys Thr His	Thr	
	275		280		285
Cys Pro Pro	Cys Pro Ala	Pro Glu Ala Ala	Gly Gly	Pro Ser Val Phe	
	290		295		300
Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg Thr	Pro	
305		310		315	320
Glu Val Thr	Cys Val Val Val	Asp Val Ser His	Glu Asp Pro	Glu Val	
	325		330		335
Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys	Thr	
	340		345		350
Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val Ser	Val	
	355		360		365
Leu Thr Val	Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys	Cys	
	370		375		380
Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile	Glu Lys Thr Ile	Ser	
385		390		395	400
Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro	Pro	
	405		410		415
Ser Arg Glu	Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser	Leu Trp Cys Leu	Val	
	420		425		430
Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Asn	Gly	
	435		440		445
Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser	Asp	
	450		455		460
Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg	Trp	
465		470		475	480
Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met	His Glu Ala Leu	His	
	485		490		495
Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser	Pro Gly Lys		
	500		505		510

<210> 14
 <211> 1530
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1

<400> 14

gacttcgtga tgacacagtc toctgatagt ctggccgtga gtctggggga gcgggtgact	60
atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa atcagaaaaa ctatctgacc	120
tggtaccagc agaagccagg ccagccccct aaactgctga tctattgggc ttccaccagg	180
gaatctggcg tgcccgacag attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca	240
atttctagtc tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat	300
ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc cggcggcgga	360
ggcgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttgggtcc agcctggagg gtccctgaga	420
ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agcacatacg ctatgaattg ggtccgccag	480
gctccaggga aggggctgga gtgggttggga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca	540
acctactatg ccgactctgt gaaggataga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac	600
tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggccgtgta ttactgtgtg	660
agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tottggtttg cttattgggg acaggggaca	720
ctggtgactg tgtcttccgg aggatgtggc ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag	780
gttgctgctt tggagaagga ggtcgtgca cttgaaaagg aggtcgcagc cctggagaaa	840
ggcggcgggg aaaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaagc cgcgggggga	900
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct	960
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	1020
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	1080
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1140
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1200
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag	1260
atgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1320
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	1380

ctggactcgc acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1440
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1500
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1530

<210> 15

<211> 272

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp
 210 215 220
 Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 245 250 255
 Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

 <210> 16
 <211> 816
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit thứ hai của cấu trúc
 DART-A w/Fc phiên bản 1

 <400> 16
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggggtacaa aaaaaagggc tccctggacc 180
 cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360
 cagctggtgc agtccggggc tgagctgaag aaaccggag cttccgtgaa ggtgtcttgc 420
 aaagccagtg gctacacctt cacagactac tatatgaagt gggtcaggca ggtccagga 480
 cagggactgg aatggatcgg cgatatcatt ccttccaacg gggccacttt ctacaatcag 540
 aagtttaaag gcaggggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag 600
 ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc acacctgctg 660
 agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtgtc ttccggagga 720
 tgtggcgggtg gaaaagtggc cgcactgaag gagaaagttg ctgctttgaa agagaaggtc 780
 gccgcactta aggaaaaggt cgcagccctg aaagag 816

 <210> 17

<211> 515
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 2

 <400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Asp Phe Val Met Thr
 225 230 235 240

Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met
 245 250 255
 Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 275 280 285
 Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 290 295 300
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 305 310 315 320
 Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro
 325 330 335
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
 340 345 350
 Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 355 360 365
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 370 375 380
 Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 385 390 395 400
 Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 405 410 415
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 420 425 430
 Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
 435 440 445
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 450 455 460
 Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 465 470 475 480
 Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 485 490 495
 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
 500 505 510
 Leu Lys Glu

515

<210> 18

<211> 1545

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit thứ nhất của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 2

<400> 18

gacaaaactc acacatgccc accgtgccc	gcacctgaag ccgcggggg accgtcagtc	60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac	cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	180
ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc	cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	420
aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc	540
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc	accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660
ctctccctgt ctccgggtaa agccccttcc	agctccccta tggaagactt cgtgatgaca	720
cagtctcctg atagtctggc cgtgagtctg	ggggagcggg tgactatgtc ttgcaagagc	780
tcccagtcac tgctgaacag cggaatcag	aaaaactatc tgacctggta ccagcagaag	840
ccaggccagc cccctaaact gctgatctat	tgggcttcca ccagggaatc tggcgtgccc	900
gacagattca gcggcagcgg cagcggcaca	gattttaccc tgacaatttc tagtctgcag	960
gccgaggacg tggctgtgta ctattgtcag	aatgattaca gctatcccta cactttcggc	1020
caggggacca agctggaaat taaaggaggc	ggatccggcg gcggaggcga ggtgcagctg	1080
gtggagtctg ggggaggctt ggtccagcct	ggaggggtccc tgagactctc ctgtgcagcc	1140
tctggattca ccttcagcac atacgctatg	aattgggtcc gccaggctcc agggaagggg	1200
ctggagtggg ttggaaggat caggccaag	tacaacaatt atgcaaccta ctatgccgac	1260

tctgtgaagg atagattcac catctcaaga gatgattcaa agaactcact gtatctgcaa 1320
 atgaacagcc tgaaaaccga ggacacggcc gtgtattact gtgtgagaca cggtaacttc 1380
 ggcaattctt acgtgtcttg gtttgcttat tggggacagg ggacactggg gactgtgtct 1440
 tccggaggat gtggcgggtg aaaagtggcc gcactgaagg agaaagttgc tgctttgaaa 1500
 gagaaggtcg ccgcacttaa ggaaaaggtc gcagccctga aagag 1545

<210> 19

<211> 279

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART đối chứng

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
275

<210> 20
<211> 270
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của DART đối chứng

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly
 115 120 125
 Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 130 135 140
 Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu
 145 150 155 160
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr
 165 170 175
 Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 180 185 190
 Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val
 195 200 205
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp
 210 215 220
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270
 <210> 21
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Miền liên kết CD3 chuỗi nhẹ của DART-A
 <400> 21
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

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

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

<210> 22
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền liên kết CD3 chuỗi nặng của DART-A

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền liên kết CD3 chuỗi nhẹ của DART-B

<400> 23

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền liên kết CD3 chuỗi nặng của DART-B

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền liên kết CD123 chuỗi nhẹ của DART-A

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền liên kết CD123 chuỗi nặng của DART-A

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền liên kết CD123 chuỗi nhẹ của DART-B

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền liên kết CD123 chuỗi nặng của DART-B

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tác nhân liên kết 1 Polypeptit

<400> 29

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tác nhân liên kết 2 Polypeptit

<400> 30

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết 3 Polypeptit

<400> 31

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 32

<400> 32
000

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết 4 Polypeptit

<400> 33

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 34
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền vòng xoắn E

<400> 34

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

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

<210> 35
<211> 28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền vòng xoắn K

<400> 35

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

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

<210> 36

<211> 46

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền liên kết albumin ưu tiên

<400> 36

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

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

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

<210> 37

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> Miền CH2-CH3 của vùng Fc người

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> CDR1 của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD3

<400> 38

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

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR2 của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD3

<400> 39

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3 của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD3

<400> 40

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 1 5

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> CDR1 của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD3

<400> 41

Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> CDR2 của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD3

<400> 42

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

Val Lys Asp

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> CDR3 của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD3

<400> 43

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

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> CDR1 của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD123

<400> 44

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

Thr

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR2 của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD123

<400> 45

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3 của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD123

<400> 46

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> CDR1 của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD123

<400> 47

Asp Tyr Tyr Met Lys
 1 5

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> CDR2 của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD123

<400> 48

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

Gly

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR3 của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD123

<400> 49

Ser His Leu Leu Arg Ala Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền heterodime hóa

<400> 50

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền heterodime hóa

<400> 51

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền heterodime hóa

<400> 52

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền heterodime hóa

<400> 53

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 54

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi polypeptit thứ ba của cấu trúc DART-A w/Fc phiên bản 1

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit 1

<400> 55

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

<210> 56
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền CD2 và CH3 ưu tiên của vùng Fc

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tác nhân liên kết 4 Polypeptit

<400> 57

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 58

<211> 273

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của "DART-2 đối chứng"

<400> 58

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

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

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr
 115 120 125
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val
 130 135 140
 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln
 145 150 155 160
 Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro
 165 170 175
 Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 180 185 190
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn
 195 200 205
 Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr
 210 215 220
 Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
 245 250 255
 Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 260 265 270

Lys

<210> 59
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai của "DART-2 đối chứng"

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu