(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293387 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.02

(22) Дата подачи заявки
2021.06.09

(51) Int. Cl. *C12N 15/09* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ БИСПЕЦИФИЧНЫХ ДИАТЕЛ К CD123 X CD3 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

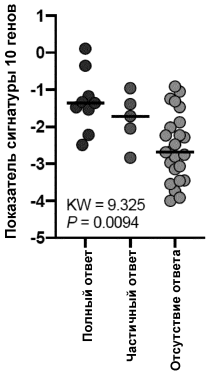
(31) **63/041,051**
(32) **2020.06.18**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/036520**
(87) **WO 2021/257334 2021.12.23**

(71) Заявитель:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US); НОТТИНГЕМ ТРЕНТ ЮНИВЕРСИТИ (GB)

(72) Изобретатель:
Дэвидсон Ян Кеннет (US), Рутелла Серджио (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к способу лечения гематологического злокачественного новообразования, такого как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС), включая гематологические злокачественные новообразования, которые являются рефрактерными к химиотерапевтическим и/или гипометилирующим агентам. Указанный способ относится к введению биспецифичной к CD123 x CD3 связывающей молекулы пациенту в количестве, эффективном для стимуляции гибели клеток указанного гематологического злокачественного новообразования у указанного пациента. Настоящее изобретение, в частности, относится к варианту реализации такого способа, в котором клеточный образец от пациента до такого введения свидетельствует об экспрессии одного или более генов-мишеней, которая повышена относительно исходного уровня экспрессии таких генов, например исходного уровня экспрессии таких генов в референсной популяции индивидуумов, страдающих указанным гематологическим злокачественным новообразованием, или относительно уровня экспрессии референсного гена.



202293387 A1

202293387 A1

ПРИМЕНЕНИЕ БИСПЕЦИФИЧНЫХ ДИАТЕЛ К CD123 X CD3 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Настоящая заявка содержит один или более перечней последовательностей, соответствующих положениям 37 C.F.R. 1.821 и далее, представленных на машиночитаемых носителях (название файла: 1301_0167P1_ST25.txt, файл создан 17 июня 2020 года и имеет размер 31 062 байта), содержание указанного файла полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к способу лечения гематологического злокачественного новообразования, такого как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС), включая гематологические злокачественные новообразования, которые являются рефрактерными к химиотерапевтическим и/или гипометилирующим агентам. Указанный способ относится к введению биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы пациенту в количестве, эффективном для стимуляции гибели клеток указанного гематологического злокачественного новообразования у указанного пациента. Настоящее изобретение, в частности, относится к варианту реализации такого способа, в котором клеточный образец от указанного пациента до такого введения свидетельствует об экспрессии одного или более генов-мишеней, которая повышена относительно исходного уровня экспрессии таких генов, например, исходного уровня экспрессии таких генов в референсной популяции индивидуумов, страдающих указанным гематологическим злокачественным новообразованием, или относительно уровня экспрессии референсного гена.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

I. CD123

[0003] CD123 (рецептор интерлейкина 3, субъединица альфа, IL-3Ra) представляет собой молекулу с молекулярной массой 40 кДа и является частью рецепторного комплекса интерлейкина 3 (Stomski, F.C. *et al.* (1996) "*Human Interleukin-3 (IL-3) Induces Disulfide-Linked IL-3 Receptor Alpha- And Beta-Chain Heterodimerization, Which Is Required For Receptor Activation But Not High-Affinity Binding*," Mol. Cell. Biol. 16(6):3035-3046). Интерлейкин 3 (IL-3) стимулирует раннюю дифференцировку мультипотентных стволовых клеток в клетки эритроидных, миелоидных и лимфоидных предшественников. CD123 экспрессируется на CD34+ коммитированных предшественниках (Taussig, D.C. *et al.* (2005) "*Hematopoietic Stem Cells Express Multiple Myeloid Markers: Implications For The Origin And Targeted Therapy Of Acute Myeloid Leukemia*," Blood 106:4086-4092), но не экспрессируется CD34+/CD38- нормальными гематопоэтическими стволовыми клетками. CD123 экспрессируется базофилами, тучными клетками, плазмацитоидными дендритными клетками, в некоторой степени экспрессируется моноцитами, макрофагами и эозинофилами, и в малой степени экспрессируется или не экспрессируется нейтрофилами и мегакариоцитами. Некоторые негематопоэтические ткани (плацента, клетки Лейдига яичка, некоторые клеточные элементы головного мозга и некоторые эндотелиальные клетки) экспрессируют CD123; однако экспрессия в основном является цитоплазматической.

[0004] Сообщается, что CD123 экспрессируется лейкозными бластами и лейкозными стволовыми клетками (**ЛСК**) (Jordan, C.T. *et al.* (2000) "*The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells*," Leukemia 14:1777-1784; Jin, W. *et al.* (2009) "*Regulation Of Th17 Cell Differentiation And EAE Induction By MAP3K NIK*," Blood 113:6603-6610). В популяциях нормальных клеток-предшественников человека CD123 экспрессируется субпопуляцией гематопоэтических клеток-предшественников (**ГКП**), но не нормальными гематопоэтическими стволовыми

клетками (**ГСК**). CD123 также экспрессируется плазмоцитоидными дендритными клетками (**пДК**) и базофилами, и, в меньшей степени, моноцитами и эозинофилами (Lopez, A.F. *et al*. (1989) "*Reciprocal Inhibition Of Binding Between Interleukin 3 And Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor To Human Eosinophils*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:7022-7026; Sun, Q. *et al*. (1996) "*Monoclonal Antibody 7G3 Recognizes The N-Terminal Domain Of The Human Interleukin-3 (IL-3) Receptor Alpha Chain* And *Functions As A Specific IL-3 Receptor Antagonist*," Blood 87:83-92; Muñoz, L. *et al*. (2001) "*Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies*," Haematologica 86(12):1261-1269; Masten, B.J. *et al*. (2006) "*Characterization Of Myeloid And Plasmacytoid Dendritic Cells In Human Lung*," J.Immunol. 177:7784-7793; Korpelainen, E.I. *et al*. (1995) "*Interferon-Gamma Upregulates Interleukin-3 (IL-3) Receptor Expression In Human Endothelial Cells And Synergizes With IL-3 In Stimulating Major Histocompatibility Complex Class II Expression And Cytokine Production*," Blood 86:176-182).

[0005] Сообщалось о сверхэкспрессии CD123 на злокачественных клетках при широком спектре гематологических злокачественных новообразований, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС) (Muñoz, L. *et al*. (2001) "*Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies*," Haematologica 86(12):1261-1269). Сверхэкспрессия CD123 связана с худшим прогнозом при ОМЛ (Tettamanti, M.S. *et al*. (2013) "*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor*," Br. J.Haematol. 161:389-401).

II. CD3

[0006] CD3 представляет собой корецептор Т-клеток, состоящий из четырех отдельных цепей (Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "*Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling*," Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; стр. 1-14). У

млекопитающих указанный комплекс содержит цепь CD3γ, цепь CD3δ и две цепи CD3ε. Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (**TCR**), для индукции сигнала активации в Т-лимфоцитах. В отсутствие CD3 TCR не собираются должным образом и подвергаются деградации (Thomas, S. et al. (2010) "*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer*," Immunology 129(2):170–177). CD3 обнаруживается в связанном с мембранами виде на всех зрелых Т-клетках и не обнаруживается практически ни на каком другом типе клеток (см. Janeway, C.A. *et al.* (2005) In: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE," 6th Ed., Garland Science Publishing, NY, pp.214- 216; Sun, Z. J. *et al.* (2001) "*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3ε:γ Heterodimer*," Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. *et al.* (2006) "*Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex*," Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139).

III. ОМЛ и МДС

[0007] Полагают, что острый миелоидный лейкоз (**ОМЛ**) и миелодиспластический синдром (**МДС**) возникают и поддерживаются посредством небольшой популяции лейкозных стволовых клеток (**ЛСК**), которые, как правило, находятся в состоянии покоя (то есть не являются быстро делящимися клетками) и, следовательно, обладают устойчивостью к гибели клеток (апоптозу) и обычным химиотерапевтическим агентам. ЛСК характеризуются высокими уровнями экспрессии CD123, которая отсутствует в соответствующей популяции нормальных гематопоэтических стволовых клеток в нормальном костном мозге человека (Jin, W. *et al.* (2009) "*Regulation Of Th17 Cell Differentiation And EAE Induction By MAP3K NIK*," Blood 113:6603-6610; Jordan, C.T. *et al.* (2000) "*The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells*," Leukemia 14:1777-1784). CD123 экспрессируется в 45%-95% случаев ОМЛ, 85% случаев волосатоклеточного лейкоза (**ВКЛ**) и 40% случаев острого В-лимфобластного лейкоза (**В-ОЛЛ**). Экспрессия CD123 также связана с множеством других

злокачественных новообразований/предзлокачественных новообразований: клетки-предшественники хронического миелоидного лейкоза (**ХМЛ**) (включая **ХМЛ** в стадии бластного криза); клетки Рида-Штернберга (**РШ**) при лимфоме Ходжкина; трансформированная неходжкинская лимфома (**НХЛ**); некоторые хронические лимфоцитарные лейкозы (**ХЛЛ**) (CD11c+); субпопуляция клеток острого Т-лимфобластного лейкоза (**Т-ОЛЛ**) (16% наиболее незрелых, в основном взрослых), злокачественные новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток (**пДК**) **ДК2** и злокачественные новообразования костного мозга, относящиеся к CD34+/CD38- миелодиспластическому синдрому (**МДС**).

[0008] ОМЛ представляет собой клональное заболевание, характеризующееся пролиферацией и накоплением трансформированных миелоидных клеток-предшественников в костном мозге, что в конечном счете приводит к недостаточности гемопоэза. Частота возникновения ОМЛ увеличивается с возрастом, и пожилые пациенты, как правило, имеют худшие результаты лечения, чем более молодые пациенты (Robak, T. *et al*. (2009) "*Current And Emerging Therapies For Acute Myeloid Leukemia*," Clin. Ther. 2:2349-2370). К сожалению, в настоящее время у большинства взрослых с ОМЛ имеющееся заболевание приводит к смерти.

[0009] Лечение ОМЛ изначально направлено на индукцию ремиссии (индукционная терапия). После достижения ремиссии лечение перенаправляют на сохранение такой ремиссии (постремиссионная или консолидирующая терапия) и, в некоторых случаях, поддерживающую терапию. Стандартным подходом к индукции ремиссии ОМЛ является химиотерапия комбинацией антрациклин/цитарабин с последующей либо консолидационной химиотерапией (обычно с применением более высоких доз тех же препаратов, которые применяли в период индукции), либо трансплантацией стволовых клеток человека, в зависимости от способности пациента переносить интенсивное лечение и вероятности излечения при применении только химиотерапии (см., например, Roboz, G.J.(2012) "*Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia*," Curr. Opin. Oncol. 24:711-719).

[0010] Агенты, часто применяемые в индукционной терапии, включают цитарабин и антрациклины. Цитарабин (также известный как **AraC**) убивает раковые клетки (и другие быстро делящиеся нормальные клетки), препятствуя синтезу ДНК. Побочные эффекты, связанные с лечением AraC, включают снижение сопротивляемости инфекции в результате снижения выработки лейкоцитов; кровотечение в результате снижения выработки тромбоцитов и анемию из-за потенциального снижения количества эритроцитов. Другие побочные эффекты включают тошноту и рвоту. Антрациклины (например, даунорубицин, доксорубицин и идарубицин) обладают несколькими механизмами действия, включая ингибирование синтеза ДНК и РНК, разрушение структур ДНК более высокого порядка и продукцию повреждающих клетки свободных радикалов кислорода. Наиболее значимым побочным эффектом антрациклинов является кардиотоксичность, которая значительно ограничивает вводимую в течение жизни дозу и в некоторой степени их применимость.

[0011] Трансплантация стволовых клеток была признана наиболее эффективной формой противолейкозной терапии у пациентов с ОМЛ при первой или последующей ремиссии (Roboz, G.J.(2012) "*Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia*," Curr. Opin. Oncol. 24:711-719). Однако, к сожалению, несмотря на значительный прогресс в лечении впервые диагностированного ОМЛ, 20-40% пациентов не достигают ремиссии при стандартной индукционной химиотерапии, и ожидается, что 50-70% пациентов, вступающих в первую полную ремиссию, будут иметь рецидив в течение 3 лет. Оптимальная стратегия в момент рецидива или для применения у пациентов с резистентным заболеванием остается неопределенной (см. Tasian, S.K.(2018 "*Acute Myeloid Leukemia Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy: How Far Up The Road Have We Traveled?*," Ther. Adv. Hematol. 9(6):135-148; Przespolewski, A. *et al*. (2018) "*Advances In Immunotherapy For Acute Myeloid Leukemia*" Future Oncol. 14(10):963-978; Shimabukuro-Vornhagen, A. *et al*. (2018) "*Cytokine Release Syndrome*," J.Immunother. Cancer. 6(1):56 pp.1-14; Milone, M.C. *et al*. (2018) "*The Pharmacology of T Cell Therapies*," Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 8:210-221; Dhodapkar, M.V. *et al*. (2017) "*Hematologic Malignancies: Plasma Cell Disorders*,"

Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. 37:561-568; Kroschinsky, F. *et al*. (2017) "*New Drugs, New Toxicities: Severe Side Effects Of Modern Targeted And Immunotherapy Of Cancer And Their Management*," Crit. Care 14;21(1):89). Таким образом, необходимы новые терапевтические стратегии.

IV. Биспецифичные молекулы

[0012] Возможность получения немоноспецифичных молекул (например, биспецифичных антител, биспецифичных диател, антител BiTE® и так далее) обеспечивает значительное преимущество по сравнению с моноспецифичными молекулами, такими как природные антитела: возможность объединения и совместной локализации клеток, которые экспрессируют различные эпитопы. Таким образом, биспецифичные молекулы имеют широкое применение, включая терапию и иммунодиагностику. Биспецифичность обеспечивает большую гибкость в проектировании и конструировании диатела для различных применений, обеспечивая повышенную авидность к мультимерным антигенам, перекрестное связывание различных антигенов и направленное нацеливание на конкретные типы клеток на основании присутствия обоих антигенов-мишеней. Особое значение имеет объединение различных клеток, например, перекрестное связывание эффекторных клеток, таких как цитотоксические Т-клетки, с опухолевыми клетками (Staerz *et al.* (1985) *"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,"* Nature 314:628-631, and Holliger *et al.* (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305).

[0013] Для получения молекул, обладающих большими возможностями, чем природные антитела, были разработаны разнообразные форматы рекомбинантных биспецифичных антител (см., например, публикации заявок PCT № WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), в большинстве из которых применяют линкерные пептиды либо для слияния дополнительного связывающего белка (например, scFv, VL, VH и так далее) с кором антитела или

введения его внутрь кора (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM), либо для слияния нескольких связывающих частей антитела (например, двух Fab-фрагментов или scFv) друг с другом. В альтернативных форматах применяют линкерные пептиды для слияния связывающего белка (например, scFv, VL, VH и так далее) с доменом димеризации, таким как домен CH2-CH3, или с альтернативными полипептидами (WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2006/107617, WO 2007/046893) и другие форматы, в которых домены CL и CH1 подвергают переключению относительно их соответствующих природных положений и/или в которых домены VL и VH были диверсифицированы (WO 2008/027236; WO 2010/108127) для обеспечения им возможности связывать более одного антигена.

[0014] В данной области техники дополнительно отмечена возможность получения диател, которые способны связывать два или более различных видов эпитопов (см., например, Holliger *et al.* (1993) "*'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448. Были описаны стабильные ковалентно связанные гетеродимерные немоноспецифичные диатела (см., например, WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; Johnson, S. *et al.* (2010) "*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion,*" J.Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. *et al.* (2010) "*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,*" Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. *et al.* (2011) "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,*" Blood 117(17):4542-4551). Такие диатела включают один или более остатков цистеина в каждом из применяемых видов полипептидов. Например, было показано, что добавление остатка цистеина к С-концу таких конструкций обеспечивает возможность образования дисульфидных связей между полипептидными цепями, стабилизирующих полученный гетеродимер без влияния на характеристики связывания бивалентной молекулы. Помимо этого, были описаны трехвалентные молекулы, содержащие диателоподобный домен (см., например, WO 2015/184203 и WO

2015/184207). Эпитоп-связывающие домены диатела также могут быть нацелены на поверхностную детерминанту любой иммунной эффекторной клетки, такую как CD3, CD16, CD32 или CD64, которые экспрессируются на Т-лимфоцитах, клетках - естественных киллерах (NK) или других мононуклеарных клетках. Во многих исследованиях также было обнаружено, что связывание диатела с детерминантами эффекторных клеток, например, рецепторами Fcγ (FcγR), активирует эффекторную клетку (Holliger *et al.* (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) *"Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins,"* Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Как правило, активация эффекторных клеток инициируется связыванием связанного с антигеном антитела с эффекторной клеткой посредством взаимодействия Fc-FcγR; таким образом, в этом отношении молекулы диател могут проявлять Ig-подобную функциональную активность независимо от того, содержат ли они Fc-домен (например, при оценке в любом анализе эффекторных функций, известном в данной области техники или приведенном в качестве примера в настоящей заявке (например, анализе ADCC)). Путем перекрестного связывания опухолевых и эффекторных клеток диателo не только обеспечивает близость эффекторной клетки к опухолевой клетке, но и приводит к эффективному уничтожению опухоли (см., например, Cao *et al.* (2003) *"Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics,"* Adv. Drug. Deliv. Rev.55:171-197).

[0015] В стадии разработки находится несколько биспецифичных молекул, нацеленных на CD123 и CD3, способных опосредовать перенаправленную Т-клетками гибель экспрессирующих CD123 злокачественных клеток (см., например, Vey, N., *et al.* (2017) "*Interim Results From A Phase 1 First-In-Human Study Of Flotetuzumab, a CD123 x CD3 Bispecific DART Molecule In AML/MDS,*" Annals of Oncology, 28(S5)5, mdx373.001; Godwin, C.D., *et al.* (2017) "*Bispecific Anti-CD123 x Anti-CD3 Adaptir™ Molecules APVO436 and APVO437 Have Broad*

Activity Against Primary Human AML Cells In Vitro" Blood. 130(S1): 2639; Forslund, A., *et al*. (2016) "*Ex Vivo Activity Profile of the CD123xCD3 Duobody® Antibody JNJ-63709178 Against Primary Acute Myeloid Leukemia Bone Marrow Samples*" Blood 128(22):2875.). Однако усилия по применению биспецифичных связывающих молекул, которые способны нацеливать Т-клетку на локализацию гематологического злокачественного новообразования, не были полностью успешными. Следовательно, остается неудовлетворенной потребность в разработке новых стратегий лечения гематологических злокачественных новообразований с применением биспецифичных к **CD123 x CD3** связывающих молекул. Настоящее изобретение непосредственно направлено на удовлетворение этой и других потребностей, описанных ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] Настоящее изобретение относится к способу лечения гематологического злокачественного новообразования, такого как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС), включая гематологические злокачественные новообразования, которые являются рефрактерными к химиотерапевтическим и/или гипометилирующим агентам. Способ относится к введению биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы пациенту в количестве, эффективном для стимуляции гибели клеток гематологического злокачественного новообразования у пациента. Настоящее изобретение, в частности, относится к варианту реализации такого способа, в котором клеточный образец от пациента до такого введения свидетельствует об экспрессии одного или более генов-мишеней, которая повышена относительно исходного уровня экспрессии таких генов, например, исходного уровня экспрессии таких генов в референсной популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием, или относительно уровня экспрессии референсного гена.

[0017] В частности, настоящее изобретение относится к способу определения того, будет ли пациент подходящим образом отвечать на применение

биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы для лечения гематологического злокачественного новообразования, где указанный способ включает:

(a) оценку экспрессии одного или более генов-мишеней в клеточном образце от пациента до введения биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы относительно экспрессии одного или более генов-мишеней и/или референсных генов; и

(b) идентификацию пациента как пациента, подходящим образом отвечающего на лечение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой, если обнаружено, что экспрессия одного или более генов-мишеней повышена относительно экспрессии одного или более генов-мишеней и/или референсных генов, причем указанный один или более генов-мишеней выбраны из группы, состоящей из: SERPHINH1, NOTCH2, FCGR3A/B, FPR1, FBP1, PDGFA, CRABP2, THBS1, ICOS и CD8B.

[0018] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором указанный способ включает оценку: (i) экспрессии одного или более генов-мишеней; и (ii) одного или более референсных генов, экспрессия которых не имеет характерной связи с гематологическим злокачественным новообразованием.

[0019] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который включает оценку экспрессии одного или более генов-мишеней относительно исходной экспрессии одного или более референсных генов пациента.

[0020] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который включает оценку экспрессии одного или более генов-мишеней пациента относительно экспрессии одного или более генов-мишеней индивидуума, страдающего гематологическим злокачественным новообразованием, или популяции таких индивидуумов. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором экспрессия одного или более генов-мишеней такого пациента больше, чем первый квартиль (то есть больше, чем наименьшие 25%), больше, чем второй

квартиль (то есть больше, чем наименьшие 50%), или больше, чем третий квартиль (то есть больше, чем наименьшие 75%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) такого индивидуума или такой популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием.

[0021] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который включает оценку экспрессии одного или более генов-мишеней пациента относительно экспрессии одного или более генов-мишеней индивидуума, который ранее безуспешно получал лечение от гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению (например, индивидуума, который не смог успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы), или популяции таких индивидуумов. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором экспрессия одного или более генов-мишеней такого пациента больше, чем первый квартиль (то есть больше, чем наименьшие 25%), больше, чем второй квартиль (то есть больше, чем наименьшие 50%), или больше, чем третий квартиль (то есть больше, чем наименьшие 75%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) такого индивидуума или такой популяции индивидуумов, безуспешно получавших лечение.

[0022] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который включает оценку экспрессии одного или более генов-мишеней пациента относительно экспрессии одного или более генов-мишеней индивидуума, который ранее успешно получал лечение от гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению (например, индивидуума, который успешно отвечал на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы), или популяции таких индивидуумов. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором экспрессия одного или более генов-мишеней такого

пациента находится в пределах первого квартиля (то есть в пределах наименьших 25%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней), в пределах второго квартиля (то есть между наименьшими 25% и 50%) или в пределах третьего квартиля (то есть между наименьшими 50% и 75%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) такого индивидуума или такой популяции индивидуумов, успешно получавших лечение.

[0023] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где относительный уровень экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции устанавливают путем усреднения уровня экспрессии генов в клеточных образцах, полученных от популяции индивидуумов.

[0024] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где такой пациент демонстрирует уровень экспрессии по меньшей мере одного из таких генов-мишеней:

(a) который превышает первый квартиль уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием; или

(b) который превышает первый квартиль уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы; или

(c) который находится в пределах по меньшей мере первого квартиля уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, которые успешно отвечали на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы.

[0025] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где такой пациент демонстрирует уровень экспрессии по меньшей мере одного из таких генов-мишеней:

(a) который превышает второй квартиль уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием; или

(b) который превышает второй квартиль уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы; или

(c) который находится в пределах по меньшей мере второго квартиля уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, которые успешно отвечали на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы.

[0026] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где такой пациент демонстрирует уровень экспрессии по меньшей мере одного из таких генов-мишеней:

(a) который превышает третий квартиль уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, страдающих от указанного гематологического злокачественного новообразования; или

(b) который превышает третий квартиль уровней экспрессии такого гена-мишени в популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение указанного гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы; В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где такой способ дополнительно включает введение лечебной дозировки биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы пациенту, если установлено, что пациент является подходящим ответчиком на такое лечение, и к таким способам, где введение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы стимулирует гибель клеток гематологического злокачественного новообразования у пациента.

[0027] В настоящем изобретении также предложен способ лечения гематологического злокачественного новообразования, где указанный способ включает:

(a) применение способа согласно любому из указанных выше вариантов реализации для определения того, будет ли пациент подходящим образом отвечать на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы для лечения гематологического злокачественного новообразования;

(b) введение пациенту лечебной дозировки биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы, если установлено, что пациент подходящим образом отвечает на такое лечение;

причем введение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы стимулирует гибель клеток гематологического злокачественного новообразования у пациента.

[0028] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который дополнительно включает оценку экспрессии такого одного или более генов-мишеней в клеточном образце, полученном от пациента один или более раз после начала лечения.

[0029] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где клеточный образец представляет собой образец костного мозга или крови. В частности, вариант реализации таких способов, где клеточный образец представляет собой образец костного мозга.

[0030] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который также включает выявление уровня экспрессии одного или более генов-мишеней в образце костного мозга пациента. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который также включает выявление уровня экспрессии одного или более референсных генов.

[0031] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, которые включают выявление уровня экспрессии таких одного или более генов-мишеней и/или таких одного или более референсных генов в образце

костного мозга пациента, в частности, до введения биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы.

[0032] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором оценку экспрессии или определение того, будет ли пациент подходящим образом отвечать на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы для лечения гематологического злокачественного новообразования, осуществляют путем:

(a) определения уровней экспрессии генов для каждого гена-мишени в одном или более клеточных образцах с применением платформы экспрессии генов; и

(b) сравнения уровней экспрессии гена-мишени с уровнями экспрессии одного или более референсных генов.

[0033] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором оценку экспрессии или определение того, будет ли пациент подходящим образом отвечать на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы для лечения гематологического злокачественного новообразования, осуществляют путем:

(a) измерения необработанных значений уровней РНК для каждого гена-мишени в одном или более клеточных образцах в платформе экспрессии генов;
причем указанная платформа экспрессии генов содержит референсный набор генов домашнего хозяйства; и

(b) присвоения относительного значения экспрессии каждому из измеренных необработанных значений уровней РНК для генов-мишеней с применением измеренных уровней РНК внутренних референсных генов.

[0034] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где один или более референсных генов включают один или более из: ABCF1, G6PD, NRDE2, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP и UBB.

[0035] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где показатель сигнатуры гена определяется для одного или более генов-мишеней. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения такой показатель сигнатуры гена определяют на основании необработанных значений уровней РНК каждого гена-мишени способом, включающим:

(a) измерение необработанных значений уровней РНК для каждого гена-мишени в еще одном клеточном образце с применением платформы экспрессии генов, содержащей референсный набор генов домашнего хозяйства,

(b) нормализацию каждого из измеренных необработанных значений уровней РНК к среднему геометрическому значению таких генов домашнего хозяйства и необязательно дальнейшую нормализацию каждого значения РНК к стандарту,

(c) логарифмическое преобразование каждого нормализованного значения РНК,

(d) суммирование значений логарифмически трансформированной РНК для каждого гена-мишени в сигнатуре, и

(e) деление суммы нормализованных логарифмически трансформированных значений РНК на количество генов-мишеней в сигнатуре, с получением показателя сигнатуры гена.

[0036] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где показатель сигнатуры гена пациента, который:

(a) превышает первый квартиль показателей для сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием; или

(b) превышает первый квартиль показателей для сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного

новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы; или

(c) находится в пределах по меньшей мере первого квартиля показателей для сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые успешно отвечали на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы,

указывает на более благоприятный ответ пациента на лечение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой.

[0037] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где показатель сигнатуры гена пациента, который:

(a) превышает второй квартиль для сигнатуры гена, рассчитанный на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием; или

(b) превышает второй квартиль для сигнатуры гена, рассчитанный на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы; или

(c) находится в пределах по меньшей мере второго квартиля показателей для сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые успешно ответили на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы,

указывает на более благоприятный ответ пациента на лечение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой.

[0038] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где показатель сигнатуры гена пациента, который:

(a) превышает третий квартиль показателей для сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием; или

(b) превышает третий квартиль показателей для сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы,

указывает на более благоприятный ответ пациента на лечение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой.

[0039] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула представляет собой биспецифичное антитело или биспецифичную молекулу, содержащую scFv.

[0040] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула представляет собой JNJ-63709178, XmAb14045 или APVO436.

[0041] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула представляет собой ковалентно связанное биспецифичное диатело, имеющее две, три или четыре полипептидные цепи.

[0042] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула содержит:

(a) домен VH_{CD123}, содержащий CDR **SEQ ID NO:6**; и

(b) домен VL_{CD123}, содержащий CDR **SEQ ID NO:10**.

[0043] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула содержит:

(a) домен VH_{CD123}, содержащий **SEQ ID NO:6**; и

(b) домен VL_{CD123}, содержащий **SEQ ID NO:10**.

[0044] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула содержит:

(a) домен VH_{CD3}, содержащий CDR **SEQ ID NO:14**; и

(b) домен VL_{C23}, содержащий CDR **SEQ ID NO:1**.

[0045] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула содержит:

(a) домен VH_{CD3}, содержащий **SEQ ID NO:14**; и

(b) домен VL_{CD3}, содержащий **SEQ ID NO:1**.

[0046] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула представляет собой диатело, которое содержит:

(a) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:21**; и

(b) вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:23**; и

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

[0047] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где гематологическое злокачественное новообразование такого пациента выбрано из группы, состоящей из: острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), бластного криза ХМЛ, связанного с онкогеном Абельсона ХМЛ (транслокации Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (МДС), острого В-лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), острого Т-лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), синдрома Рихтера, трансформации ХЛЛ

Рихтера, волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), неходжкинской лимфомы (НХЛ), включая мантийноклеточную лимфому (МКЛ) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта.

[0048] В настоящем изобретении также предложены варианты реализации таких способов, в которых гематологическое злокачественное новообразование такого пациента представляет собой ОМЛ, МДС, БПДКН или Т-ОЛЛ.

[0049] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, отличающийся тем, что гематологическое злокачественное новообразование у такого пациента является рефрактерным к химиотерапии (**СТХ**), как то рефрактерным к цитотоксической химиотерапии цитарабином/антрациклином или рефрактерным к химиотерапии гипометилирующими агентами (**HMA**).

[0050] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, который также включает определение уровня экспрессии CD123 бластных клеток (раковых клеток) по сравнению с соответствующим исходным уровнем CD123, экспрессируемым нормальными мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК).

[0051] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где уровень экспрессии определяют путем измерения экспрессии CD123 на клеточной поверхности. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором экспрессия CD123 на клеточной поверхности повышена по меньшей мере приблизительно на 20% по сравнению с исходным уровнем экспрессии. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, в котором повышение экспрессии CD123 делает пациента более чувствительным к лечению биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой.

[0052] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, где эффективная дозировка биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы выбрана из группы, состоящей из приблизительно 30, приблизительно 60, приблизительно 100, приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400 и приблизительно 500 нг/кг массы тела пациента в день.

[0053] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации всех описанных выше способов, согласно которому лечебную дозировку вводят в виде непрерывной инфузии. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, при котором лечебная дозировка составляет приблизительно 30 нг/кг/день при введении посредством непрерывной инфузии в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 60 нг/кг массы тела пациента/день при введении посредством непрерывной инфузии в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 100 нг/кг/день при введении посредством непрерывной инфузии в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 200 нг/кг/день при введении посредством непрерывной инфузии в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 300 нг/кг/день при введении посредством непрерывной инфузии в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 400 нг/кг/день при введении посредством непрерывной инфузии в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 500 нг/кг/день при введении посредством непрерывной инфузии в течение 1 дня. В настоящем изобретении также предложен вариант реализации таких способов, при котором лечебная дозировка дополнительно включает введение приблизительно 500 нг/кг/день при введении путем непрерывной инфузии в течение еще 21 дня.

[0054] В настоящем изобретении также предложен вариант реализации всех описанных выше способов, при котором указанный пациент представляет собой человека.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ:

[0055] На **Фигурах 1A-1C** представлена общая структура иллюстративных молекул диател. На **Фигуре 1A** представлена структура первой и второй полипептидных цепей двухцепочечного биспецифичного к **CD123 x CD3** диателa («**DART-A**», также известного как флотетузумаб), содержащего два эпитоп-связывающих домена, способствующие гетеродимеризации домены и цистеинсодержащий линкер. На **Фигурах 1B-1C** представлена общая структура биспецифичного к **CD123 x CD3** диателa, имеющего два эпитоп-связывающих домена, состоящих из трех полипептидных цепей. Две из полипептидных цепей содержат домен CH2 и CH3, расположенный таким образом, что объединенные цепи образуют Fc-домен или его часть. Полипептидные цепи, содержащие домены VL и VH, дополнительно содержат способствующий гетеродимеризации домен и линкер. Остаток цистеина может присутствовать в линкере (**Фигуры 1A** и **1B**) и/или в способствующем гетеродимеризации домене (**Фигура 1C**). Домены VL и VH, распознающие один и тот же эпитоп, показаны с применением одного и того же затенения или штриховки.

[0056] **Фигура 2** иллюстрирует экспрессию топ-10 генов, связанных с полным ответом на флотетузумаб (полная ремиссия (CR), полная ремиссия с частичным гемопоэтическим восстановлением (CRh), полная ремиссия с неполным гемопоэтическим восстановлением (CRi)). Экспрессия каждого гена в этой когорте была масштабирована от -2 до +2. Ответ пациента после лечения, а также статус и иммунный кластер на момент включения в исследование указаны в верхних строках. Статус иммунного кластера был определен как подробно описано ранее (Vadakekolathu J, *et al.* (2020) "*Immune Landscapes Predict Chemotherapy Resistance And Immunotherapy Response In Acute Myeloid Leukemia*," *Sci Transl Med.* 12:eaaz0463).

[0057] На **Фигуре 3** представлены показатели сигнатур 10 генов для пациентов с полным ответом, частичным ответом и отсутствием ответа.

[0058] На **Фигуре 4** представлена тепловая карта, обобщающая коэффициенты корреляции между классификационными показателями 10 генов и показателями сигнатур, специфичных для типа иммунных клеток и биологической активности в исходных образцах костного мозга пациентов с рецидивирующим рефрактерным ОМЛ.

[0059] На **Фигуре 5** показаны кривые AUROC, измеряющие прогностическую способность показателя сигнатуры 10 генов и цитогенетического риска согласно критериям ELN, отдельно или в комбинации, для антилейкозной активности флотетузумаба.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0060] Настоящее изобретение относится к способу лечения гематологического злокачественного новообразования, такого как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС), включая гематологические злокачественные новообразования, которые являются рефрактерными к химиотерапевтическим и/или гипометилирующим агентам. Указанный способ относится к введению биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы пациенту в количестве, эффективном для стимуляции гибели клеток указанного гематологического злокачественного новообразования у указанного пациента. Настоящее изобретение, в частности, относится к варианту реализации такого способа, в котором клеточный образец от пациента до такого введения свидетельствует об экспрессии одного или более генов-мишеней, которая повышена относительно исходного уровня экспрессии таких генов, например, исходного уровня экспрессии таких генов в референсной популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием, или относительно уровня экспрессии референсного гена.

[0061] Как указано выше, резистентность к химиотерапии и рецидив остаются значимыми причинами смертности у детей и взрослых с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Ожидается, что при получении традиционной химиотерапии только 26,9% пациентов будут иметь выживаемость более 5 лет.

[0062] Терапевтический подход к лечению пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) существенно не изменился за срок более 30 лет. Стандартная терапия первой линии представляет собой схему с двумя препаратами, в которой цитарабин применяют в сочетании с даунорубицином (так называемая индукционная терапия 7+3, сокращенно именуемая в настоящей заявке «**CTX**»). Гипометилирующие агенты (сокращенно называемые в настоящей заявке «**HMA**») децитабин и азацитидин обычно вводят пожилым пациентам или пациентам, для которых схема **CTX** считается неподходящей. Тем не менее, данные литературы указывают на то, что до 45% пациентов рефрактерны к стандартной химиотерапии первой линии. Дальнейшая интенсификация традиционной цитотоксической химиотерапии была признана нецелесообразной из-за тяжести острых и долгосрочных побочных эффектов в отношении нормальных тканей, обычно вызываемых этими лекарственными средствами (Tasian, S.K.(2018 "*Acute Myeloid Leukemia Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy: How Far Up The Road Have We Traveled?*," Ther. Adv. Hematol. 9(6):135-148; Przespolewski, A. *et al*. (2018) "*Advances In Immunotherapy For Acute Myeloid Leukemia*" Future Oncol. 14(10):963-978; Shimabukuro-Vornhagen, A. *et al*. (2018) "*Cytokine Release Syndrome*," J. Immunother.Cancer. 6(1):56 pp. 1-14; Milone, M.C. *et al*. (2018) "*The Pharmacology of T Cell Therapies*," Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 8:210-221; Dhodapkar, M.V. *et al*. (2017) "*Hematologic Malignancies: Plasma Cell Disorders*," Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. 37:561-568; Kroschinsky, F. *et al*. (2017) "*New Drugs, New Toxicities: Severe Side Effects Of Modern Targeted And Immunotherapy Of Cancer And Their Management*," Crit. Care 14;21(1):89).

[0063] Биспецифичные антитела, которые взаимодействуют с Т-клетками, стимулируют высвобождение провоспалительных цитокинов. Такие цитокины могут повышать эффективность против лейкоза посредством прямой цитотоксичности, а также активации и привлечения иммунных клеток в очаг опухоли (Hoseini, S.S. *et al*. (2107) "*Acute Myeloid Leukemia Targets For Bispecific Antibodies*," Blood Cancer Journal 7:e522, doi:10.1038/bcj.2017.2; pp. 1-12). В частности, лечение флотетузумабом, биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулой, тестируется в исследовании фазы 1/2

рецидивирующего/рефрактерного («**R/R**») ОМЛ. Несмотря на большой потенциал иммунотерапии для избирательного нацеливания на раковые клетки, вызывающие гематологические злокачественные новообразования (см., например, Koch, J. *et al.* (2017) "*Recombinant Antibodies to Arm Cytotoxic Lymphocytes in Cancer Immunotherapy*," Transfus. Med. Hemother. 44:337-350; Lichtenegger, F.S. *et al.* (2017) "*Recent Developments In Immunotherapy Of Acute Myeloid Leukemia*," J. Hematol. Oncol. 10:142, стр. 1-20), попытки применения биспецифичных связывающих молекул, которые способны нацеливать Т-клетку на локализацию гематологического злокачественного новообразования, не были полностью успешными.

[0064] Таким образом, разработка новых стратегий лечения, включая иммунотерапию, остается приоритетной задачей. Ранее сообщалось, что пациенты с ОМЛ с иммунно обогащенным и IFN-гамма-доминантным микроокружением опухоли («**TME**») имеют значительно более короткую безрецидивную выживаемость, что свидетельствует о рефрактерности к стандартной индукционной химиотерапии (Vadakekolathu, J. *et al.* (2017) "*Immune Gene Expression Profiling in Children and Adults with Acute Myeloid Leukemia Identifies Distinct Phenotypic Patterns*," Blood 130:3942A). Кроме того, сообщалось, что некоторые признаки экспрессии генов коррелируют с ответом на биспецифическую молекулу CD123 x CD3, флотетузумаб (Vadakekolathu J, *et al.* (2020) "*Immune Landscapes Predict Chemotherapy Resistance And Immunotherapy Response In Acute Myeloid Leukemia*," Sci. Transl. Med. 12(546):eaaz0463).

[0065] В контексте настоящей заявки термин «**сигнатура экспрессии генов**» предназначен для обозначения паттерна экспрессии генов группы генов, характерной для конкретного типа клеток и/или биологического процесса (см., *например*, Stenner, F. *et al.* (2018) "*Cancer Immunotherapy and the Immune Response in Follicular Lymphoma*," Front. Oncol. 8:219 doi: 10.3389/fonc.2018.00219, стр. 1-7; Cesano, A. *et al.* (2018) "*Bringing The Next Generation Of Immuno-Oncology Biomarkers To The Clinic*," Biomedicines 6(14) doi: 10.3390/biomedicines6010014, стр. 1-11; Shrestha, G. *et al.* (2016) "*The Value Of Genomics In Dissecting The RAS-*

Network And In Guiding Therapeutics For RAS-Driven Cancers," Semin. Cell Dev. Biol. 58:108-117; Gingras, I. *et al*. (2015) "*CCR 20th Anniversary Commentary: Gene-Expression Signature in Breast Cancer--Where Did It Start and Where Are We Now?*," Clin. Cancer Res. 21(21):4743-4746; Eberhart, C.G.(2011) "*Molecular Diagnostics In Embryonal Brain Tumors*," Brain Pathol. 21(1):96-104; Baylin, S.B. (2009) "*Stem Cells, Cancer, And Epigenetics*," StemBook, ed.THE STEM CELL RESEARCH COMMUNITY, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.50.1, стр. 1-14; Asakura, M. *et al*. (2009) "*Global Gene Expression Profiling In The Failing Myocardium*," Circ. J. 73(9):1568-1576; Shaffer, A.L. *et al*. (2001) "*Signatures Of The Immune Response*," Immunity 15(3):375-385; Staudt, L.M. *et al*. (2005) "*The Biology Of Human Lymphoid Malignancies Revealed By Gene Expression Profiling*," Adv. Immunol. 87:163-208). Наблюдаемая сигнатура экспрессии генов и/или изменения этой сигнатуры вследствие нарушения (или отсутствия нарушения) биологического процесса (процессов) могут быть применены для оценки наличия, характера и/или тяжести патологического состояния.

[0066] Центральный аспект настоящего изобретения относится к идентификации уникальной «**сигнатуры экспрессии 10 генов**», которая прогнозирует благоприятный ответ на терапию с применением биспецифичных к **CD123 x CD3** связывающих молекул, включая терапию с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы флотетузумаба. 10 генов «**сигнатуры экспрессии 10 генов**» представляют собой: SERPHINH1, NOTCH2, FCGR3A/B, FPR1, FBP1, PDGFA, CRABP2, THBS1, ICOS и CD8B. Настоящее изобретение частично основано на признании того факта, что некоторые субпопуляции пациентов с гематологическим злокачественным новообразованием (например, острым миелоидным лейкозом) особенно хорошо поддаются лечению биспецифичными к **CD123 x CD3** связывающими молекулами (например, флотетузумабом). Члены этой субпопуляции могут быть легко идентифицированы по их способности демонстрировать повышенную экспрессию такой сигнатуры экспрессии 10-генов.

I. Идентификация популяций пациентов, особенно подходящих для лечения с применением биспецифичных к CD123 x CD3 связывающих молекул согласно настоящему изобретению

A. Способы определения «сигнатур экспрессии генов»

[0067] Чтобы определить, демонстрирует ли пациент повышенную экспрессию сигнатуры экспрессии 10 генов, чтобы таким образом идентифицировать его как особенно подходящего для лечения гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению, оценивают образец РНК из клеточного образца, полученного от пациента, для определения того, свидетельствует ли он о повышенной экспрессии одного или более «**целевых**» генов, экспрессия которых коррелирует с такой сигнатурой. Для такой оценки могут быть применены ранее проведенные обнаружение и/или измерение экспрессии генов или она может включать этап (этапы) обнаружения и/или измерения экспрессии таких генов. В контексте настоящей заявки термин «**клеточный образец**» относится к образцу, содержащему клетки или экстракт клеток.

[0068] Любой клеточный образец может быть применен в качестве источника РНК или белка для применения при определении того, демонстрирует ли пациент сигнатуру экспрессии 10 генов, которая характерна для ответа на благоприятный ответ на терапию с использованием **CD123 x CD3** биспецифических связывающих молекул. В некоторых вариантах реализации изобретения такие сравнения экспрессии генов проводят с применением РНК, полученной из образца костного мозга (КМ), или из образца крови, или из образца бластных клеток (раковых клеток) пациента или популяции доноров. В тех случаях, когда РНК получают из таких клеток популяции доноров для получения сведений об исходном уровне экспрессии, может быть применено среднее значение применяемых уровней экспрессии (например, может быть применено среднее геометрическое значение). Для проведения таких сравнений экспрессии генов может быть применен ряд различных референсных популяций. В конкретных

вариантах реализации уровень экспрессии по меньшей мере одного гена-мишени, проявляемый пациентом, сравнивают с уровнем экспрессии такого гена-мишени, проявляющимся в: популяции индивидуумов, страдающих от гематологического злокачественного новообразования; популяции индивидуумов, страдающих от такого гематологического злокачественного новообразования на момент определения такого референсного уровня экспрессии, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования (то есть популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы); и/или популяции индивидуумов, страдавших от такого гематологического злокачественного новообразования на момент определения такого референсного уровня экспрессии, которым впоследствии было проведено успешное лечение от гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению (то есть популяции индивидуумов, которые успешно ответили на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы). Если популяция сравнения представляет собой популяцию индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием, такая популяция предпочтительно включает индивидуумов, страдающих тем же гематологическим злокачественным новообразованием, что и пациент. Такая популяция может включать индивидуумов, которые имели рецидив после предшествующего лечения химиотерапевтическим агентом и/или которые были рефрактерны к лечению химиотерапевтическим агентом (то есть имели первичную рефрактерность). Если популяция сравнения представляет собой популяцию индивидуумов, которые успешно или неуспешно ответили на лечение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы гематологического злокачественного новообразования, такая популяция предпочтительно включает индивидуумов, страдающих тем же гематологическим злокачественным новообразованием, что и пациент.

[0069] В контексте настоящей заявки экспрессия гена считается «повышенной», если по сравнению с исходным уровнем или другой величиной сравнения (например, экспрессией такого гена в популяции) его экспрессия по меньшей мере приблизительно на 10% больше, по меньшей мере приблизительно на 20% больше, по меньшей мере приблизительно на 30% больше, по меньшей мере приблизительно на 40% больше, по меньшей мере приблизительно на 50% больше, по меньшей мере приблизительно на 60% больше, по меньшей мере приблизительно на 70% больше, по меньшей мере приблизительно на 80% больше, по меньшей мере приблизительно на 90% больше, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 2 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 3 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 4 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 4,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 5 раз больше, по меньшей мере приблизительно в 5,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 6 раз больше, по меньшей мере приблизительно в 6,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, по меньшей мере приблизительно в 7,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 8 раз больше, по меньшей мере приблизительно в 8,5 раза больше, по меньшей мере приблизительно в 9 раз больше, по меньшей мере приблизительно в 10 раз больше. Такое повышение может быть альтернативно описано с точки зрения «кратности изменения log_2». Применительно к повышению экспрессии кратность изменения log_2 0,4 эквивалентна приблизительно на 30% большей экспрессии, кратность изменения log_2 0,5 эквивалентна приблизительно на 40% большей экспрессии; кратность изменения log_2 0,6 эквивалентна приблизительно на 50% большей экспрессии; кратность изменения log_2 0,7 эквивалентна приблизительно на 60% большей экспрессии; кратность изменения log_2 0,8 эквивалентна приблизительно на 70% большей экспрессии; кратность изменения log_2 0,9 эквивалентна приблизительно на 90% большей экспрессии; кратность изменения log_2 1 эквивалентна 2-кратному повышению; кратность изменения log_2 1,5 эквивалентна 2,8-кратному повышению; кратность изменения log2 2 эквивалентна 4-кратному повышению; кратность изменения log_2 2,5

эквивалентна 5,7-кратному повышению; кратность изменения $\log_2 3$ эквивалентна 8-кратному повышению; кратность изменения $\log_2 3{,}5$ эквивалентна 11,3-кратному повышению; кратность изменения $\log_2 4$ эквивалентна 16-кратному повышению и так далее. Кратность изменения $\log_2$ обычно применяют при сравнении подсчетов с данными массива, а также она является подходящей для t-критериев.

[0070] В качестве альтернативы такие повышения описаны в терминах «**показателя сигнатуры генов**», где измеряют экспрессию каждого из кластеров генов-мишеней, нормализуют по одному или более генам домашнего хозяйства и/или внутренним стандартам и суммируют для получения единого показателя сигнатуры генов. Необязательно, после нормализации и до суммирования экспрессия каждого гена-мишени может быть логарифмически преобразована и/или взвешена. Способы расчета таких показателей известны в данной области техники, и конкретные способы представлены в настоящей заявке (см. Пример 1 ниже).

[0071] Также показатель сигнатуры 10 генов пациента считается «повышенным», если он больше первого квартиля показателей сигнатуры генов (то есть больше, чем наименьшие 25%), больше второго квартиля показателей сигнатуры генов (то есть больше, чем наименьшие 50%), больше третьего квартиля показателей сигнатуры генов (то есть больше, чем наименьшие 75%), больше, чем 85%, больше 90% или больше 95% показателей сигнатуры генов, рассчитанных на основе уровней экспрессии таких генов-мишеней в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием.

[0072] Также показатель сигнатуры 10 генов пациента считается «повышенным», если он больше, чем первый квартиль показателей сигнатуры генов (то есть больше, чем наименьшие 25%), больше, чем второй квартиль показателей сигнатуры генов (то есть больше, чем наименьшие 50%), больше, чем третий квартиль показателей сигнатуры генов (то есть больше, чем наименьшие 75%), больше, чем 85%, больше, чем 90% или больше, чем 95%

показателей сигнатуры генов, рассчитанных на основании уровней экспрессии таких генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования (например, популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение гематологического злокачественного новообразования биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой).

[0073] Показатель сигнатуры 10 генов пациента также считается «повышенным», если он находится в пределах по меньшей мере первого квартиля показателей сигнатуры генов (то есть в пределах нижних 25%), в пределах по меньшей мере второго квартиля (то есть между нижними 25% и 50%), в пределах по меньшей мере третьего квартиля (то есть между нижними 50% и 75%), больше, чем 85%, больше, чем 90% или больше, чем 95% показателей сигнатуры генов, рассчитанных на основании уровней экспрессии таких генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые ранее успешно получали лечение от гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению (например, популяции индивидуумов, которые успешно отвечали на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы).

[0074] Выявление повышенного показателя сигнатуры 10 генов свидетельствует о более благоприятном ответе пациента на лечение гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичных к **CD123 x CD3** молекул согласно настоящему изобретению.

[0075] В одном из вариантов реализации пациента идентифицируют как демонстрирующего повышенную сигнатуру экспрессии 10-гена и, таким образом, особенно поддающегося лечению в отношении гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению путем определения того, является ли экспрессия гена-мишени «повышенной» по сравнению с исходным уровнем его экспрессии у оцениваемого пациента, когда такой пациент был здоров, или до

того, как такому пациенту был поставлен диагноз гематологического злокачественного новообразования, или по сравнению с экспрессией этого гена во время курса химиотерапевтического лечения такого пациента или во время курса лечения такого пациента, включающего применение биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы.

[0076] Во втором варианте реализации пациента идентифицируют как демонстрирующего повышенную сигнатуру экспрессии 10 генов и, таким образом, особенно поддающегося лечению гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению путем сравнения уровня экспрессии одного или более генов-мишеней со средним или взвешенным исходным уровнем экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием. Считается, что ген-мишень, экспрессия которого превышает такой усредненный или взвешенный исходный уровень, демонстрирует «повышенный» уровень экспрессии, и способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения при лечении гематологического злокачественного новообразования у таких пациентов. Например, способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который больше, чем первый квартиль (то есть больше, чем наименьшие 25%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который больше, чем второй квартиль (то есть больше, чем наименьшие 50%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые

демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который больше, чем третий квартиль (то есть больше, чем наименьшие 75%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который больше, чем 85%, больше, чем 90% или больше, чем 95% уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в популяции индивидуумов, страдающих гематологическим злокачественным новообразованием.

[0077] В третьем варианте реализации пациента идентифицируют как демонстрирующего повышенную сигнатуру экспрессии 10 генов и, таким образом, особенно поддающегося лечению гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению путем сравнения уровня экспрессии одного или более генов-мишеней со средним или взвешенным исходным уровнем экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в популяции индивидуумов, которые ранее безуспешно получали лечение от гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению (например, популяции индивидуумов, которые не смогли успешно ответить на лечение от гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы). Считается, что ген-мишень, экспрессия которого равна такому усредненному или взвешенному исходному уровню или превышает его, демонстрирует «повышенный» уровень экспрессии, и способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения при лечении гематологического злокачественного новообразования у таких пациентов. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который

больше, чем первый квартиль (то есть больше, чем наименьшие 25%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции индивидуумов, безуспешно получавших лечение. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который больше, чем второй квартиль (то есть больше, чем наименьшие 50%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции индивидуумов, безуспешно получавших лечение. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который больше, чем третий квартиль (то есть больше, чем наименьшие 75%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции индивидуумов, безуспешно получавших лечение. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который больше, чем 85%, больше, чем 90% или больше, чем 95% уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции индивидуумов, безуспешно получавших лечение.

[0078] В четвертом варианте реализации пациента идентифицируют как демонстрирующего сигнатуру с повышенной экспрессией 10 генов и, таким образом, особенно поддающегося лечению гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению путем сравнения уровня экспрессии одного или более генов-мишеней со средним или взвешенным исходным уровнем экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в популяции индивидуумов, которые ранее успешно получали лечение гематологического злокачественного новообразования с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению (например, популяции индивидуумов, которые успешно отвечали на лечение гематологического злокачественного новообразования с

применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы). Считается, что ген-мишень, экспрессия которого равна такому усредненному или взвешенному исходному уровню или превышает его, демонстрирует «повышенный» уровень экспрессии, и способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения при лечении гематологического злокачественного новообразования у таких пациентов. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который находится в пределах по меньшей мере первого квартиля (то есть в пределах наименьших 25%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции индивидуумов, успешно получавших лечение. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который находится в пределах по меньшей мере второго квартиля (то есть между наименьшими 25% и 50%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции индивидуумов, успешно получавших лечение. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который находится в пределах по меньшей мере третьего квартиля (то есть между наименьшими 50% и 75%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции индивидуумов, успешно получавших лечение. Способы и композиции согласно настоящему изобретению являются еще более подходящими для применения у пациентов, которые демонстрируют «повышенный» уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней), который находится в пределах по меньшей мере четвертого квартиля (то есть больше наименьших 75%) уровней экспрессии такого гена-мишени (генов-мишеней) в такой популяции ранее получавших лечение индивидуумов.

[0079] В некоторых вариантах реализации экспрессия гена-мишени является «повышенной», определяется путем сравнения уровня его экспрессии с уровнем экспрессии одного или более генов, которые не связаны с заболеванием или которые не проявляют повышенной экспрессии вследствие заболевания («**референсные**» гены). Поскольку референсные гены часто экспрессируются на разных уровнях, для расчета коэффициентов масштабирования может быть применено среднее геометрическое значение экспрессии референсных генов. Среднее геометрическое значение получают перемножения значений каждого гена образца в наборе данных, а затем получения $n^{-го}$ корня (где n - количество чисел в наборе) полученной величины. Среднее геометрическое аналогично среднему арифметическому, поскольку оно указывает на центральную тенденцию набора чисел. Однако, в отличие от среднего арифметического, среднее геометрическое менее чувствительно к изменению величины количества импульсов между зондами. Для сравнения биологических сигнатур в когорте образцов может быть применено среднее геометрическое из набора «**референсных**» генов для нормализации отдельных образцов в наборе данных, чтобы сравнения между биологическими генами проводились независимо от различий, обусловленных техническими вариациями, такими как ввод массы образца и качество образца.

[0080] Предпочтительные «**референсные**» гены конститутивно экспрессируются на одном уровне в нормальных и злокачественных клетках. Гены домашнего хозяйства (Eisenberg, E. *et al.* (2003) "*Human Housekeeping Genes Are Compact*," Trends in Genetics. 19(7):362-365; kon Butte, A.J. *et al.* (2001) "*Further Defining Housekeeping, Or "Maintenance," Genes Focus On 'A Compendium Of Gene Expression In Normal Human Tissues'*," Physiol. Genomics. 7(2):95-96; Zhu, J. *et al.* (2008) "*On The Nature Of Human Housekeeping Genes*," Trends in Genetics 24(10):481-484; Eisenberg, E. *et al.* (2013) "*Human Housekeeping Genes, Revisited*," Trends in Genetics. 29(10):569-574), такие как гены, необходимые для поддержания основных клеточных функций, являются предпочтительным классом референсных генов.

[0081] В другом варианте реализации терапия связывающей **CD123 x CD3** молекулой согласно настоящему изобретению может дополнительно включать введение связывающей PD-L1 человека молекулы, такой как антитело к PD-L1 человека, или диатело, содержащее связывающий PD-L1 человека домен. Связывающие PD-L1 человека молекулы, которые могут быть применены в соответствии с этим вариантом реализации, включают **атезолизумаб**, **авелумаб** и **дурвалумаб** (см., например, патенты США № 9,873,740; 8,779,108). Аминокислотные последовательности полных тяжелых и легких цепей атезолизумаба (WHO Drug Information, 2015, Recommended INN: List 74, 29(3):387), дурвалумаба (WHO Drug Information, 2015, Recommended INN: List 74, 29(3):393-394) и авелумаба (WHO Drug Information, 2016, Recommended INN: List 74, 30(1):100-101) известны в данной области техники.

[0082] В другом альтернативном варианте реализации терапия связывающими **CD123 x CD3** молекулами согласно настоящему изобретению может дополнительно включать введение связывающей PD-1 человека молекулы, такой как антитело к PD-1 человека или диатело, имеющее связывающий PD-1 человека домен. Связывающие PD-1 молекулы человека, которые могут быть использованы в соответствии с этим вариантом реализации изобретения, включают: **ниволумаб** (также известный как 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106 и продаваемый как OPDIVO® компанией Bristol-Myers Squibb), **пембролизумаб** (ранее известный как ламбролизумаб, также известный как MK-3475, SCH-900475 и продаваемый как KEYTRUDA® компанией Merck), **EH12.2H7** (коммерчески доступный от BioLegend), **пидилизумаб** (CAS Reg. №: 1036730-42-3, также известный как CT-011, CureTech), **ретифанлимаб** (CAS Рег. №: 2226345-85-1, также известный как MGA012) и DART-I (раскрытый в WO 2017/019846) (см. также, например, патенты США № 5,952,136; 7,488,802; 7,521,051; 8,008,449; 8,088,905; 8,354,509; 8,552,154; 8,779,105; 8,900,587; 9,084,776; публикации патентов PCT WO 2004/056875; WO 2006/121168; WO 2008/156712; WO 2012/135408; WO 2012/145493; WO 2013/014668; WO 2014/179664; WO 2014/194302; WO 2015/112800; WO 2017/019846 и WO 2017/214092).

B. Иллюстративные «гены-мишени»

[0083] **В Таблице 1** раскрыты гены-мишени и репрезентативный неограничивающий номер доступа GenBank® для каждого гена, идентифицированного в сигнатуре 10 генов.

Таблица 1			
Описание гена	**Номер доступа GenBank †**	**Описание гена**	**Номер доступа GenBank †**
CD8B	NM_004931.5	ICOS	NM_012092.4
CRABP2	NM_001878.4	NOTCH2	NM_024408.4
FCGR3A/B	NM_000569.8/ NM_001244753.2	PDGFA	NM_002607.5
FBP1	NM_000507.4	SERPINH1	NM_001235.5
FPR1	NM_002029.4	THBS1	NM_003246.4
† неограничивающий репрезентативный пример, также охватывают аллели и/или сплайс-варианты.			

C. Типовые «референсные» гены

[0084] Гены домашнего хозяйства, которые конститутивно экспрессируются на одном уровне в нормальных и злокачественных клетках, составляют типовой класс референсных генов. Гены домашнего хозяйства включают гены, участвующие в **общей экспрессии генов** (такие как гены, кодирующие факторы транскрипции, репрессоры, факторы сплайсинга РНК, факторы трансляции, тРНК-синтетазы, РНК-связывающие белки, рибосомные белки, митохондриальные рибосомные белки, РНК-полимеразы, факторы процессинга белка, белки теплового шока, гистоны, регуляторы клеточного цикла, апоптоза, онкогены, факторы репарации/репликации ДНК и так далее), **метаболизме** (такие как гены, кодирующие ферменты: углеводного обмена, цикла лимонной кислоты, метаболизма липидов, метаболизма аминокислот, NADH-дегидрогеназы, цитохром-С-оксидазу, АТФазы, лизосомальные ферменты, белки протеасом, рибонуклеазы, тиоредуктазы и так далее), поддержании **структурной целостности клетки** (такие как гены, кодирующие белки цитоскелета, белки, участвующие в синтезе органелл, митохондриальные белки и так далее), и гены **белков клеточной поверхности** (такие как гены, кодирующие белки клеточной адгезии, ионные каналы и транспортеры, рецепторы,

HLA/иммуноглобулины/белки распознавания клеток и так далее), киназ/сигнальных белков (таких как факторы роста, фактор некроза тканей, казеинкиназа и так далее). Референсные гены, которые подходят для этой цели, включают гены, которые кодируют:

- **белки, связывающие стерол-регулирующий элемент** (например, ATF1, ATF2, ATF4, ATF6, ATF7, ATF7, BTF3, E2F4, ERH, HMGB1, ILF2, IER2, JUND, TCEB2 и так далее);
- **репрессоры** (например, PUF60 и так далее);
- **белки сплайсинга РНК** (например, BAT1, HNRPD, HNRPK, PABPN1, SRSF3 и так далее);
- **факторы трансляции** (например, EIF1, EIF1AD, EIF1B, EIF2A, EIF2AK1, EIF2AK3, EIF2AK4, EIF2AK1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4, EIF2S2, EIF3A, EIF3B, EIF3D, EIF3G, EIF3I, EIF3H, EIF3J, EIF3K, EIF3L, EIF3M, EIF3S5, EIF3S8, EIF4A1, EIF4A2, EIF4A3, EIF4E2, EIF4G1, EIF4G2, EIF4G3, EIF4H, EIF5, EIF5, EIF5A, EIF5AL1, EIF5B, EIF6, TUFM и так далее);
- **тРНК-синтетазы** (например, AARS, AARS2, AARSD1434, CARS, CARS2, DARS, DARS2, EARS2614, FARS2, FARSA, FARSB, GARS, HARS, HARS2, IARS, IARS2, KARS, LARS2, MARS, MARS2, NARS, NARS2, QARS, RARS, RARS2, SARS, TARS, VARS2, WARS2, YARS, YARS2436 и так далее);
- **РНК-связывающие белки** (например, ELAVL1 и так далее);
- **рибосомные белки** (например, RPL5, RPL8, RPL9, RPL10A, RPL11, RPL14, RPL25, RPL26L1, RPL27, RPL30, RPL32, RPL34, RPL35, RPL35A, RPL36AL, RPS5, RPS6, RPS6KA3, RPS6KB1, RPS6KB2, RPS13, RPS19BP1, RPS20, RPS23, RPS24, RPS27, RPN1 и так далее);
- **белки митохондриальных рибосом** (например, MRPL9, MRPL1, MRPL10, MRPL11, MRPL12, MRPL13, MRPL14, MRPL15, MRPL16, MRPL17, MRPL18, MRPL19, MRPL2, MRPL20, MRPL21, MRPL22, MRPL23, MRPL24, MRPL27, MRPL28, MRPL3, MRPL30, MRPL32, MRPL33, MRPL35, MRPL36, MRPL37, MRPL38, MRPL4, MRPL40, MRPL41, MRPL42, MRPL43, MRPL44, MRPL45, MRPL46, MRPL47, MRPL48, MRPL49, MRPL50, MRPL51, MRPL52, MRPL53, MRPL54,

MRPL55, MRPL9, MRPS10, MRPS11, MRPS12, MRPS14, MRPS15, MRPS16, MRPS17, MRPS18A, MRPS18B, MRPS18C, MRPS2, MRPS21, MRPS22, MRPS23, MRPS24, MRPS25, MRPS26, MRPS27, MRPS28, MRPS30, MRPS31, MRPS33, MRPS34, MRPS35, MRPS5, MRPS6, MRPS7, MRPS9 и так далее);

- **РНК-полимеразы** (например, POLR1C, POLR1D, POLR1E, POLR2A, POLR2B, POLR2C, POLR2D, POLR2E, POLR2F, POLR2G, POLR2H, POLR2I, POLR2J, POLR2K, POLR2L, POLR3C, POLR3E, POLR3GL, POLR3K и так далее);
- **белки, участвующие в процессинге белков** (например, PPID, PPIE, PPIF, PPIG, PPIH, CANX, CAPN1, CAPN7, CAPNS1, NACA, NACA2, PFDN2, PFDN4, PFDN5, PFDN6, SNX2, SNX3, SNX4, SNX5, SNX6, SNX9, SNX12, SNX13, SNX17, SNX18, SNX19, SNX25, SSR1, SSR2, SSR3, SUMO1, SUMO3 и так далее);
- **белки теплового шока** (например, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPA14, HSBP1 и так далее);
- **гистоны** (например, HIST1H2BC, H1FX, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H2AFZ и так далее);
- **белки клеточного цикла** (например, ARHGAP35, ARHGAP5, ARHGDIA, ARHGEF10L, ARHGEF11, ARHGEF40, ARHGEF7, RAB10, RAB11A, RAB11B, RAB14, RAB18, RAB1A, RAB1B, RAB21, RAB22A, RAB2A, RAB2B380, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB40C, RAB4A, RAB5A, RAB5B, RAB5C, RAB6A, RAB7A, RAB9A, RABEP1, RABEPK, RABGEF1, RABGGTA, RABGGTB, CENPB, CTBP1, CCNB1IP1, CCNDBP1, CCNG1, CCNH, CCNK402, CCNL1, CCNL2, CCNY, PPP1CA, PPP1CC, PPP1R10, PPP1R11, PPP1R15B, PPP1R37, PPP1R7, PPP1R8, PPP2CA, PPP2CB552, PPP2R1A, PPP2R2A, PPP2R2D, PPP2R3C, PPP2R4, PPP2R5A, PPP2R5B, PPP2R5C, PPP2R5D, PPP2R5E, PPP4C, PPP4R1, PPP4R2, PPP5C, PPP6C, PPP6R2, PPP6R3, RAD1, RAD17, RAD23B, RAD50, RAD51C, IST1 и так далее);
- **белки апоптоза** (например, DAD1, DAP3, DAXX и так далее);
- **онкогенные белки** (например, ARAF, MAZ, MYC и так далее);

- **белки репарации/репликации ДНК** (например, MCM3AP, XRCC5, XRCC6 и так далее);
- **белки метаболизма** (например, PRKAG1, PRKAA1, PRKAB1, PRKACA, PRKAG1, PRKAR1A, PRKRIP1 и так далее);
- **белки метаболизма углеводов** (например, ALDOA, B3GALT6, B4GALT3, B4GALT5, B4GALT7, GSK3A, GSK3B, TPI1, PGK1, PGAM5, ENOPH1, LDHA, TALDO1, TSTA3);
- **белки цикла лимонной кислоты** (например, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD и так далее);
- **белки метаболизма липидов** (например, HADHA и так далее);
- **белки метаболизма аминокислот** (например, COMT и так далее);
- **НАДН-дегидрогеназы** (например, NDUFA2, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA7, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB10, NDUFB11, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC1, NDUFC2, NDUFC2, NDUFS5, NDUFV2, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2 и так далее);
- **цитохром-С-оксидазы** (например, COX4I1, COX5B, COX6B1, COX6C, COX7A2, COX7A2L, COX7C, COX8, COX8A, COX11, COX14, COX15, COX16, COX19617, COX20, CYC1, UQCC, UQCR10, UQCR11, UQCRB, UQCRC1, UQCRC2, UQCRHL591, UQCRQ, ATPase, ATP2C1, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5D, ATP5F1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5H, ATP5J, ATP5J2, ATP5J2, ATP5L, ATP5O, ATP5S, ATP5SL, ATP6AP1, ATP6V0A2, ATP6V0B, ATP6V0C, ATP6V0D1, ATP6V0E1, ATP6V1C1, ATP6V1D, ATP6V1E1, ATP6V1F, ATP6V1G1, ATP6V1H, ATPAF2, ATPIF1 и так далее);
- **лизосомальные белки** (например, CTSD, CSTB, LAMP1, LAMP2, M6PR и так далее);
- **протеасомные белки** (например, PSMA1, PSMA2, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB5, PSMB6, PSMB7, PSMC2, PSMC3, PSMC4, PSMC5, PSMC6, PSMD1,

PSMD10, PSMD11, PSMD12, PSMD13, PSMD14, PSMD2, PSMD3, PSMD4, PSMD5, PSMD6, PSMD7, PSMD8, PSMD9, PSME2, PSME3, PSMF1, PSMG2, PSMG3, PSMG4591, UBA1, UBA2, UBA3, UBA5, UBA52, UBAC2, UBALD1, UBAP1, UBAP2L, UBB, UBC, UBE2A, UBE2B, UBE2D2, UBE2D3, UBE2D4, UBE2E1, UBE2E2, UBE2E3, UBE2F, UBE2G2, UBE2H, UBE2I, UBE2J1, UBE2J2, UBE2K, UBE2L3, UBE2M, UBE2N, UBE2NL989, UBE2Q1, UBE2R2, UBE2V1, UBE2V2, UBE2W, UBE2Z, UBE3A, UBE3B, UBE3C, UBE4A, UBE4B, USP10, USP14, USP16, USP19, USP22, USP25, USP27X073, USP33, USP38, USP39, USP4, USP47, USP5, USP7, USP8, USP9X590 и так далее);

- **рибонуклеазы** (например, RNH и так далее);
- **тиоредуктазы** (например, TXN2, TXNDC11, TXNDC12, TXNDC15, TXNDC17, TXNDC9, TXNL1, TXNL4A, TXNL4B, TXNRD1, белки цитоскелета, ANXA6, ANXA7, ARPC1A, ARPC2, ARPC5L, CAPZA2, CAPZB, RHOB, RHOT1, RHOT2, TUBB, WDR1 и так далее);
- **белки, участвующие в синтезе органелл** (например, BLOC1S1, BLOC1S2, BLOC1S3, BLOC1S4, BLOC1S6, AP1G1, AP1M1, AP2A1, AP2A2, AP2M1, AP2S1, AP3B1, AP3D1, AP3M1, AP3S1, AP3S2, AP4B1, AP5M1, ANXA6, ANXA7, AP1B1, CLTA, CLTB, CLTC и так далее);
- **митохондриальные белки** (например, MTX2 и так далее);
- **белки клеточной поверхности** (например, AP2S1, CD81, GPAA1, LGALS9, MGAT2, MGAT4B, VAMP3 и так далее);
- **белки клеточной адгезии** (например, CTNNA1, CTNNB1, CTNNBIP1, CTNNBL1, CTNND1458 и так далее);
- **ионные каналы и белки-транспортеры** (например, ABCB10, ABCB7, ABCD3, ABCE1, ABCF1, ABCF2, ABCF3, CALM1, MFSD11, MFSD12, MFSD3, MFSD5, SLC15A4, SLC20A1, SLC25A11, SLC25A26, SLC25A28, SLC25A3, SLC25A32, SLC25A38, SLC25A39, SLC25A44, SLC25A46, SLC25A5, SLC27A4, SLC30A1, SLC30A5, SLC30A9, SLC35A2, SLC35A4, SLC35B1, SLC35B2, SLC35C2, SLC35E1, SLC35E3, SLC35F5, SLC38A2, SLC39A1, SLC39A3, SLC39A7, SLC41A3, SLC46A3, SLC48A1, рецепторы, ACVR1, ACVR1B, CD23 и так далее);

- **белки распознавания HLA/иммуноглобулинов/клеток** (например, BAT1, BSG, MIF, TAPBP и так далее);
- **киназы/сигнальные белки** (например, ADRBK1, AGPAT1, ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARL2, CSF1, CSK, DCT, EFNA3, FKBP1A, GDI1, GNAS1, GNAI2, HAX1, ILK, MAPKAPK2, MAP2K2, MAP3K11, PITPNM, RAC1, RAP1B, RAGA, STK19, STK24, STK25, YWHAB, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ и так далее);
- **факторы роста** (например, AIF1, HDGF, HGS, LTBP4, VEGFB, ZFP36L1, фактор некроза ткани, CD40, казеинкиназа, CSNK1E, CSNK2B и так далее); и
- **различные белки** (например, ALAS1, ARHGEF2, ARMET, AES, BECN1, BUD31, CKB, CPNE1, ENSA, FTH1, GDI2, GUK1, HPRT, IFITM1, JTB, MMPL2, NME2, NONO, P4HB, PRDX1, PTMA, RPA2, SULT1A3, SYNGR2, TTC1, C11Orf13, C14orf2, C21orf33, SPAG7, SRM, TEGT, DAZAP2, MEA1 и так далее).

[0085] Типовые гены домашнего хозяйства включают гены, перечисленные в **Таблице 2**. В **Таблице 2** также представлен репрезентативный неограничивающий номер доступа NCBI для каждого гена. Может быть применена любая комбинация или субкомбинация таких генов (и/или их сплайс-вариантов).

Таблица 2

Принятое обозначение	Номер доступа NCBI	ID гена	Полное наименование
ABCF1	NM_001090.2	23	*Homo sapiens*, АТФ-связывающая кассета, подсемейство F (GCN20), представитель 1 (ABCF1), транскрипционный вариант 2, мРНК
ACTB	NM_001101.2	60	Актин *Homo sapiens*, бета (ACTB), мРНК
ALAS1	NM_000688.4	211	*Homo sapiens*, аминолевулинат, дельта-, синтаза 1 (ALAS1), транскрипционный вариант 1, мРНК
B2M	NM_004048.2	567	*Homo sapiens*, бета-2-микроглобулин (B2M), мРНК

Таблица 2			
Принятое обозначение	**Номер доступа NCBI**	**ID гена**	**Полное наименование**
CLTC	NM_004859.2	1213	*Homo sapiens*, клатрин, полипептид тяжелой цепи (Hc) (CLTC), мРНК
EEF1G	NM_001404.4	1937	*Homo sapiens,* эукариотический фактор элонгации трансляции 1 гамма (EEF1G), мРНК
G6PD	NM_000402.2	2539	*Homo sapiens*, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G6PD), ядерный ген, кодирующий митохондриальный белок, мРНК
GAPDH	NM_002046.3	2597	*Homo sapiens*, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), мРНК
GUSB	NM_000181.1	2990	*Homo sapiens*, глюкуронидаза, бета (GUSB), мРНК
HPRT1	NM_000194.1	3251	*Homo sapiens*, гипоксантинфосфорибозилтрансфераза 1 (синдром Леша-Нихана) (HPRT1), мРНК
LDHA	NM_005566.1	3939	*Homo sapiens*, лактатдегидрогеназа A (LDHA), мРНК
NRDE2	NM_017970.3	55051	Фактор, необходимый для РНК-интерференции, доменсодержащий
OAZ1	NM_004152.3	4946	*Homo sapiens*, антифермент орнитиндекарбоксилазы 1 (OAZ1), транскрипционный вариант 1, мРНК
PGK1	NM_000291.2	5230	*Homo sapiens*, фосфоглицераткиназа 1 (PGK1), мРНК
POLR1B	NM_019014.3	84172	*Homo sapiens*, полипептид B РНК-полимеразы I, 128 кДа (POLR1B), мРНК
POLR2A	NM_000937.2	5430	*Homo sapiens*, полипептид A (ДНК-зависимой) РНК-полимеразы II, 220 кДа (POLR2A), мРНК
PPIA	NM_021130.4	5478	*Homo sapiens*, пептидил-пролил-изомераза A (PPIA), транскрипционный вариант 1, мРНК
RPL19	NM_000981.3	6143	*Homo sapiens*, рибосомный белок L19 (RPL19), мРНК
RPLP0	NM_001002.3	6175	*Homo sapiens*, рибосомный белок большой субъединицы, P0 (RPLP0), транскрипционный вариант 1, мРНК
SDHA	NM_004168.1	6389	*Homo sapiens*, комплекс сукцинатдегидрогеназы, субъединица A, флавопротеин (Fp) (SDHA),

Таблица 2			
Принятое обозначение	**Номер доступа NCBI**	**ID гена**	**Полное наименование**
			ядерный ген, кодирующий митохондриальный белок, мРНК
STK11IP	NM_052902.3	114790	Белок, взаимодействующий с серин/треонинкиназой 11
TBC1D10B	NM_015527.3	26000	Семейство доменов TBC1, представитель 10B
TBP	NM_003194.3	6908	*Homo sapiens,* TATA-бокс-связывающий белок (TBP), транскрипционный вариант 1, мРНК
TBP	NM_001172085.1	6908	*Homo sapiens*, TATA-box связывающий белок (TBP), транскрипционный вариант 2, мРНК
TUBB	NM_178014.2	203068	*Homo sapiens*, тубулин, бета (TUBB), мРНК
UBB	NM_018955.3	7314	Убиквитин B

[0086] В некоторых вариантах реализации изобретения используют следующие референсные гены: ABCF1, G6PD, NRDE2, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP и UBB).

D. Иллюстративные способы оценки экспрессии генов-мишеней и референсных генов

[0087] Чтобы выявить уровень экспрессии гена-мишени (генов-мишеней) относительно исходного уровня или уровня референсного гена (генов), в клеточном образце определяют количество мРНК, соответствующее каждому оцениваемому гену-мишени, и нормализуют к экспрессии мРНК, соответствующей исходному уровню или уровню референсного гена (генов). Для проведения такого анализа может быть применен любой подходящий способ. В иллюстративном способе применяют систему анализа nCOUNTER® (NanoString Technologies, Inc.). В системе анализа nCOUNTER® РНК образца инкубируют в присутствии наборов геноспецифичних репортерных зондов и захватывающих зондов в условиях, достаточных для гибридизации РНК образца с зондами. Каждый репортерный зонд несет флуоресцентный штрих-код, а каждый захватывающий зонд содержит фрагмент биотина, способный иммобилизовать гибридизованный комплекс на твердую подложку для сбора данных. После

гибридизации избыточный зонд удаляют и сканируют подложку с помощью автоматизированного флуоресцентного микроскопа. Штрих-коды считывают для каждой молекулы-мишени. Анализ данных может быть проведен с применением программного обеспечения для анализа nSolver® 4.0 (NanoString Technologies, Inc.) или аналогичного. Данные, представленные в Примере 1, были получены с применением наборов панелей экспрессии генов PanCancer IO 360™ (NanoString Technologies, Inc.), которые содержат набор зондов для 770 различных генов (750 генов охватывают ключевые пути на границе опухоли, в микроокружении опухоли и ключевые пути иммунного ответа, и 20 внутренних референсных генов, которые могут быть применены для нормализации данных (**Таблица 5**). Показатель сигнатуры 10 генов рассчитывают следующим образом:

- Необработанные данные о количестве для каждого гена нормализуют по среднему геометрическому выбранных генов домашнего хозяйства (HK) (например, ABCF1, NRDE2, G6PD, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP, UBB) для каждого образца.
- Затем нормализованные по HK данные нормализуют по стандартам панели IO 360, предпочтительно по тем, которые анализируют на тех же картриджах, что и исследуемые образцы.
- Затем нормализованное количество для каждого гена подвергают логарифмическому преобразованию.
- Каждое из нормализованных и логарифмически преобразованных значений для РНК суммируют.
- Сумму нормализованных логарифмически трансформированных значений для РНК делят на количество генов-мишеней в сигнатуре (*т. е.* 10) с получением единого показателя.

II. Иллюстративные биспецифичные к CD123 x CD3 связывающие молекулы

A. JNJ-63709178

[0088] JNJ-63709178 представляет собой гуманизированное биспецифичное антитело IgG4, лишенное Fc-функции. Указанное антитело получали с

применением технологии Genmab DuoBody®, и оно способно связывать как CD123 на опухолевых клетках, так и CD3 на Т-клетках. JNJ-63709178 обладает способностью обеспечивать накопление Т-клеток вблизи опухолевых клеток, экспрессирующих CD123, и индуцировать гибель этих опухолевых клеток *in vitro* (MOLM-13, OCI-AML5 и KG-1; EC50 = 0,51-0,91 нМ). Антитело JNJ-63709178 раскрыто в источниках WO 2016/036937, Gaudet, F. *et al.* (2016) "*Development of a **CD123 x CD3** Bispecific Antibody (JNJ-63709178) for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML)*," Blood 128:2824; and Forslund, A. *et al.* (2016) "*Ex Vivo Activity Profile of the **CD123 x CD3** Duobody® Antibody JNJ-63709178 Against Primary Acute Myeloid Leukemia Bone Marrow Samples*," Blood 128:2875, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки). Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей JNJ-63709178 и/или родственных антител: 13RB179, 13RB180, 13RB181, 13RB182, 13RB183, 13RB186, 13RB187, 13RB188, 13RB189, CD3B19, 7959, 3978, 7955, 9958, 8747, 8876, 4435 и 5466 раскрыты в WO 2016/036937.

B. XmAb14045

[0089] XmAb14045 (также известное как вибекотамаб) представляет собой нацеленное на опухоль антитело, которое содержит как связывающий CD123 домен, так и связывающий цитотоксические Т-клетки домен (CD3). Биспецифичный Fc-домен XmAb служит каркасом для этих двух антигенсвязывающих доменов и обеспечивает длительный период полужизни, стабильность и простоту получения XmAb14045. Вовлечение CD3 XmAb14045 активирует опосредованную Т-клетками высокоэффективную и направленную гибель опухолевых клеток, экспрессирующих CD123 (публикация патента США 2017/0349660; Chu, S.Y. *et al.* (2014) "*Immunotherapy with Long-Lived Anti-**CD123 x CD3** Bispecific Antibodies Stimulates Potent T Cell-Mediated Killing of Human AML Cell Lines and of CD123+ Cells in Monkeys: A Potential Therapy for Acute Myelogenous Leukemia*," Blood 124(21):2316, указанные источники включены в настоящую заявку посредством ссылки). Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей XmAb14045 и схожих биспецифичных к **CD123 x CD3**

связывающих молекул раскрыты в публикации патента США 2017/0349660 и WHO Drug Information, Proposed INN: List 120, 2018, 32(4):658-660.

C. APVO436

[0090] APVO436 представляет собой биспецифичную к **CD123 x CD3** связывающую молекулу ADAPTIR™, которая содержит область scFv к CD123 и область scFv к CD3. Каждая из областей scFv связана с Fc-доменом, который был модифицирован с целью устранения эффекторной функции ADCC/CDC. Раскрыто, что APVO436 связывает экспрессирующие CD123 и CD3 клетки человека со значениями EC_{50} в низком диапазоне нМ и демонстрирует сильную мишень-специфичную активность против экспрессирующих CD123 линий опухолевых клеток при низких отношениях эффектор/мишень. Раскрыто, что APVO436 обладает способностью эффективно индуцировать эндогенную активацию и пролиферацию Т-клеток, сопровождающуюся обеднением экспрессирующих CD123 клеток, в экспериментах с образцами субъектов с первичным ОМЛ и нормальными образцами доноров. APVO436 (см. Comeau, M.R. *et al.* (2018) "*APVO436, a Bispecific anti-CD123 x anti-CD3 ADAPTIR™ Molecule for Redirected T-cell Cytotoxicity, Induces Potent T-cell Activation, Proliferation and Cytotoxicity with Limited Cytokine Release*," AACR Annual Meeting April 2018, Abstract 1786; Godwin, C.D. *et al.* (2017) "*Bispecific Anti-CD123 x Anti-CD3 ADAPTIR™ Molecules* APVO436 *and APVO437 Have Broad Activity Against Primary Human AML Cells In Vitro*," American Society of Hematology Annual Meeting, December 2017, Blood 130:2639; Comeau, M.R. *et al.* (2017) "*Bispecific anti-CD123 x anti-CD3 ADAPTIR™ Molecules for Redirected T-cell Cytotoxicity in Hematological Malignancies*," AACR Annual Meeting April 2017, Abstract 597). Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей биспецифичных к **CD123 x CD3** связывающих молекул APVO436 описаны в WO 2018/057802A1.

D. DART-A

[0091] **DART-A** (также известный как флотетузумаб, номер CAS: 1664355-28-5) представляет собой иллюстративную биспецифичную к **CD123 x CD3** связывающую молекулу согласно настоящему изобретению. **DART-A**

представляет собой биспецифичное диатело, оптимизированное по последовательности, способное одновременно и специфично связываться с эпитопом CD123 и эпитопом CD3 (биспецифичное диатело к «**CD123 x CD3**») (патентная публикация США № US 2016-0200827, публикация PCT WO 2015/026892, Al-Hussaini, M. *et al.* (2016) "*Targeting CD123 In Acute Myeloid Leukemia Using A T-Cell-Directed Dual-Affinity Retargeting Platform*," Blood 127:122-131, Vey, N. *et al.* (2017) "*A Phase 1, First-in-Human Study of MGD006/S80880 (**CD123 x CD3**) in AML/MDS*," 2017 ASCO Annual Meeting, June 2-6, 2017, Chicago, IL: Abstract TPS7070, полное содержание каждого из указанных источников включено в настоящее описание посредством ссылки). Было обнаружено, что **DART-A** демонстрирует повышенную функциональную активность по сравнению с другими не оптимизированными по последовательности биспецифичными к **CD123 x CD3** диателами аналогичного состава, и, таким образом, называется «биспецифичным к **CD123 x CD3** диателом, оптимизированным по последовательности». В заявке PCT PCT/US2017/050471 описаны конкретные схемы введения **DART-A** пациентам, и она полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

[0092] **DART-A** содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь (**Фигура 1**). Первая полипептидная цепь указанного биспецифичного диатела содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, вариабельный домен легкой цепи (домен VL) моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VL_{CD3}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), вариабельный домен тяжелой цепи (домен VH) моноклонального антитела, способный связываться с CD123 (VH_{CD123}), и C-конец.

[0093] Иллюстративной последовательностью для такого домена VL_{CD3} является **SEQ ID NO:1**:

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG

[0094] Антигенсвязывающий домен VL_{CD3} содержит:

CDR_L1 (**SEQ ID NO:2**): RSSTGAVTTSNYAN

CDR_L2 (**SEQ ID NO:3**): GTNKRAP

CDR_L3 (**SEQ ID NO:4**): ALWYSNLWV

[0095] Иллюстративной последовательностью для такого линкера 1 является **SEQ ID NO:5**: GGGSGGGG. Иллюстративной последовательностью для такого домена VH_{CD123} является **SEQ ID NO:6**:

EVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMKWVRQA PGQGLEWIGD
IIPSNGATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSH
LLRASWFAYW GQGTLVTVSS

[0096] Антигенсвязывающий домен VH_{CD123} содержит:

CDR_H1 (**SEQ ID NO:7**): DYYMK

CDR_H2 (**SEQ ID NO:8**): DIIPSNGATFYNQKFKG

CDR_H3 (**SEQ ID NO:9**): SHLLRASWFAY

[0097] Вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с CD123 (VL_{CD123}), промежуточный линкерный пептид (например, линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VH_{CD3}), и C-конец. Иллюстративной последовательностью для такого домена VL_{CD123} является **SEQ ID NO:10**:

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIK

[0098] Антигенсвязывающий домен VL_{CD123} содержит:

CDR_L1 (**SEQ ID NO:11**): KSSQSLLNSGNQKNYLT

CDR_L2 (**SEQ ID NO:12**): WASTRES

CDR_L3 (**SEQ ID NO:13**): QNDYSYPYT

[0099] Иллюстративной последовательностью для такого домена VH_{CD3} является **SEQ ID NO:14**:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[00100] Антигенсвязывающий домен VH_{CD3} содержит:

CDR_H1 (**SEQ ID NO:15**): TYAMN

CDR_H2 (**SEQ ID NO:16**): RIRSKYNNYATYYADSVKD

CDR_H3 (**SEQ ID NO:17**): HGNFGNSYVSWFAY

[00101] Оптимизированные по последовательности биспецифичные к **CD123 x CD3** диатела согласно настоящему изобретению сконструированы таким образом, что такие первый и второй полипептиды ковалентно связываются друг с другом через остатки цистеина по всей длине. Такие остатки цистеина могут быть введены в промежуточный линкер (например, линкер 1), который разделяет домены VL и VH полипептидов. В качестве альтернативы, второй пептид (линкер 2) вводят в каждую полипептидную цепь, например, в положении с N-конца к домену VL или с C-конца к домену VH такой полипептидной цепи. Иллюстративной последовательностью для такого линкера 2 является **SEQ ID NO:18**: GGCGGG.

[00102] Образование гетеродимеров может быть вызвано дальнейшим конструированием таких полипептидных цепей, обеспечивающим содержание полипептидных спиралей противоположного заряда. Таким образом, в конкретном варианте реализации одна из полипептидных цепей будет сконструирована таким образом, чтобы содержать «E-спиральный» домен (**SEQ ID NO:19:** EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK), остатки которого будут образовывать отрицательный заряд при pH 7, в то время как другая из двух полипептидных цепей будет сконструирована таким образом, чтобы содержать «K-спиральный» домен (**SEQ ID NO:20**: KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE), остатки которого будут образовывать положительный заряд при pH 7. Присутствие таких заряженных доменов способствует ассоциации первого и второго полипептидов и тем самым способствует гетеродимеризации.

[00103] Не имеет значения, какая из спиралей находится в первой, а какая во второй полипептидной цепи. Однако иллюстративное оптимизированное по

последовательности биспецифичное к **CD123 x CD3** диатело согласно настоящему изобретению («**DART-A**») содержит первую полипептидную цепь, имеющую указанную последовательность (**SEQ ID NO:21**):

```
QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVQSGAELK KPGASVKVSC KASGYTFTDY
YMKWVRQAPG QGLEWIGDII PSNGATFYNQ KFKGRVTITV DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCARSHLL RASWFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAALE
KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK
```

[00104] Цепь 1 **DART-A** состоит из: **SEQ ID NO:1 — SEQ ID NO:5 — SEQ ID NO:6 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:19**. Полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь **DART-A**, представляет собой **SEQ ID NO:22**:

```
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggcgg
aggcgaggtg cagctggtgc agtccggggc tgagctgaag aaacccggag
cttccgtgaa ggtgtcttgc aaagccagtg gctacacctt cacagactac
tatatgaagt gggtcaggca ggctccagga cagggactgg aatggatcgg
cgatatcatt ccttccaacg gggccacttt ctacaatcag aagtttaaag
gcagggtgac tattaccgtg gacaaatcaa caagcactgc ttatatggag
ctgagctccc tgcgctctga agatacagcc gtgtactatt gtgctcggtc
acacctgctg agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg
tgacagtgtc ttccggagga tgtggcggtg gagaagtggc cgcactggag
aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc gctgcacttg aaaaggaggt
cgcagccctg gagaaa
```

[00105] Вторая полипептидная цепь **DART-A** имеет последовательность (**SEQ ID NO:23**):

```
DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF
STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN
SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG
GGKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE
```

[00106] Цепь 2 **DART-A** состоит из: **SEQ ID NO:10 — SEQ ID NO:5 — SEQ ID NO:14 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:20**. Полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь **DART-A**, представляет собой **SEQ ID NO:24**:

```
gacttcgtga tgacacagtc tcctgatagt ctggccgtga gtctggggga
gcgggtgact atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa
atcagaaaaa ctatctgacc tggtaccagc agaagccagg ccagcccccct
aaactgctga tctattgggc ttccaccagg gaatctggcg tgcccgacag
attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca atttctagtc
tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat
ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc
cggcggcgga ggcgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtcc
agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc
agcacatacg ctatgaattg ggtccgccag gctccaggga aggggctgga
gtgggttgga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca acctactatg
ccgactctgt gaaggataga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac
tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggccgtgta
ttactgtgtg agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tcttggtttg
cttattgggg acaggggaca ctggtgactg tgtcttccgg aggatgtggc
ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa
ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag
```

[00107] **DART-A** обладает способностью одновременно связывать CD123 и CD3, что установлено для клеток человека и яванского макака. Было обнаружено, что обеспечение **DART-A** вызывает активацию Т-клеток, опосредует снижение количества бластов, стимулирует размножение Т-клеток, индуцирует активацию Т-клеток и вызывает перенаправленную гибель раковых клеток-мишеней (**Таблица 3**).

Таблица 3
Равновесные константы диссоциации (K_D) для связывания DART-A с CD3 и CD123 человека и яванского макака

Антигены	k_a (± СО) ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (± СО) (c^{-1})	K_D (± СО) (нМ)
CD3ε/δ человека	5,7 (± 0,6) x 10^5	5,0 (± 0,9) x 10^{-3}	9,0 ± 2,3
CD3ε/δ яванского макака	5,5 (± 0,5) x 10^5	5,0 (± 0,9) x 10^{-3}	9,2 ± 2,3
CD123-His человека	1,6 (± 0,4) x 10^6	1,9 (± 0,4) x 10^{-4}	0,13 ± 0,01
CD123-His яванского макака	1,5 (± 0,3) x 10^6	4,0 (± 0,7) x 10^{-4}	0,27 ± 0,02

[00108] Более конкретно, **DART-A** демонстрирует выраженную способность к перенаправленной гибели клеток при концентрациях, необходимых для достижения 50% максимальной активности (EC50), находящихся в диапазоне суб-нг/мл, независимо от специфичности связывания эпитопа CD3, в линиях

клеток-мишеней с высокой экспрессией CD123 (Kasumi-3 (EC_{50}=0,01 нг/мл)), средней экспрессией CD123 (Molm13 (EC_{50}=0,18 нг/мл) и THP-1 (EC_{50}=0,24 нг/мл)) и средне-низкой или низкой экспрессией CD123 (TF-1 (EC_{50}=0,46 нг/мл) и RS4-11 (EC_{50}=0,5 нг/мл)). Схожим образом, перенаправленную **DART-A** гибель клеток также наблюдали в нескольких линиях клеток-мишеней в присутствии Т-клеток от разных доноров, и не наблюдали активности перенаправленной гибели клеток в линиях клеток, которые не экспрессируют CD123. Результаты приведены в **Таблице 4**.

Таблица 4

Линия клеток-мишеней	**Поверхностная экспрессия CD123 (сайты связывания антител)**	**EC_{50} оптимизированных по последовательности биспецифичных к CD123 x CD3 диател (нг/мл) E:T = 10:1**	**Макс. % гибели**
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	Отрицательно	Отсутствие активности	Отсутствие активности
HT29	Отрицательно	Отсутствие активности	Отсутствие активности

[00109] Помимо этого, при объединении Т-клеток человека и опухолевых клеток (Molm13 или RS4-11) и подкожной инъекции мышам, нокаутным по NOD/SCID-гамма (NSG), наблюдали существенное подавление опухолей MOLM13 при величине дозы 0,16, 0,5, 0,2, 0,1, 0,02 и 0,004 мг/кг. Доза 0,004 мг/кг и выше была активна в модели MOLM13. Более низкие дозы **DART-A**, вызывающие подавление роста опухоли в модели MOLM13 по сравнению с моделью RS4-11, согласуются с данными *in vitro*, демонстрирующими, что клетки MOLM13 имеют более высокий уровень экспрессии CD123, чем клетки RS4-11, что коррелировало с повышенной чувствительностью клеток MOLM13 к опосредованной **DART-A** цитотоксичности *in vitro*.

[00110] **DART-A** обладает активностью против образцов первичного ОМЛ (мононуклеаров костного мозга (МККМ) и мононуклеаров периферической

крови (МКПК)) пациентов с ОМЛ. Инкубирование образцов костного мозга первичного ОМЛ с **DART-A** приводило к обеднению популяции лейкозных клеток с течением времени, сопровождавшемуся одновременным размножением остаточных Т-клеток (как CD4, так и CD8) и индукцией маркеров активации Т-клеток (CD25 и Ki-67). Наблюдали повышение уровня гранзима B и перфорина как в CD8, так и в CD4 Т-клетках. Инкубирование образцов костного мозга первичного ОМЛ **с DART-A** приводило к обеднению популяции лейкозных клеток с течением времени по сравнению с необработанным контролем или контрольным DART. При подсчете Т-клеток (окрашивание CD8 и CD4) и анализе активации (окрашивание CD25) наблюдали размножение и активацию Т-клеток в образце под действием **DART-A** по сравнению с необработанным или обработанным контрольными DART образцом. Также было обнаружено, что **DART-A** обладает способностью опосредовать снижение количества пДК-клеток в популяции МКПК как человека, так и яванского макака, при этом снижение количества пДК яванского макака происходит уже через 4 дня после инфузии всего 10 нг/кг **DART-A**. Не наблюдали повышения уровней цитокинов интерферона-гамма, TNF-альфа, IL6, IL5, IL4 и IL2 у животных, получавших **DART-A**. Эти данные указывают на то, что опосредованная **DART-A** гибель клеток-мишеней осуществлялось с вовлечением пути гранзима B и перфорина.

[00111] Не наблюдали активности в отношении CD123-отрицательных мишеней (клеток U937) или при применении контрольного DART, что указывает на то, что наблюдаемая активация Т-клеток строго зависит от взаимодействия с клетками-мишенями и что одновалентного взаимодействия **DART-A** с CD3 было недостаточно для запуска активации Т-клеток.

[00112] Таким образом, **DART-A** представляет собой молекулу на основе антитела, взаимодействующую с субъединицей CD3ε TCR для перенаправления Т-лимфоцитов против клеток, экспрессирующих CD123, антиген, активированный при нескольких гематологических злокачественных новообразованиях. **DART-A** связывается как с антигенами человека, так и с антигенами яванского макака с близкой аффинностью и перенаправляет Т-клетки от обоих видов для обеспечения гибели CD123+ клеток. Обезьяны, которым 4 или

7 дней в неделю вводили путем инфузии еженедельно увеличивающиеся дозы **DART-A**, демонстрировали снижение количества циркулирующих CD123+ клеток через 72 часа после начала лечения, сохранявшееся в течение 4 недель лечения независимо от схемы введения. Также наблюдали снижение количества циркулирующих Т-клеток, однако оно восстанавливалось до исходного уровня до последующей инфузии у макаков при 4-дневной схеме дозирования, что согласуется с опосредованной **DART-A** мобилизацией. Введение **DART-A** увеличивало количество циркулирующих PD1+, но не TIM-3+ Т-клеток; помимо этого, анализ *ex vivo* Т-клеток получавших лечение макаков показал неизмененный перенаправленный лизис клеток-мишеней, что указывает на отсутствие истощения. Токсичность ограничивалась минимальным преходящим высвобождением цитокинов после первой инфузии **DART-A**, но не после последующих введений, даже когда доза была увеличена, и минимальным обратимым снижением массы эритроцитов с сопутствующим снижением CD123+ предшественников костного мозга.

E. Дополнительные биспецифичные молекулы диател

[00113] Альтернативная версия **DART-A**, содержащая Fc-область и имеющая общую структуру, показанную на Фигуре 1B, описана в US 2016-0200827. Иллюстративные полипептиды, которые содержат домены CH2 и CH3 Fc-домена, имеют последовательность (**SEQ ID NO:25**) («имеющий выступ» Fc-домен):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

где **X** представляет собой K или отсутствует,

и последовательность (**SEQ ID NO:26**) («имеющий впадину» Fc-домен):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPG**X**

где **X** представляет собой K или отсутствует.

[00114] Первый полипептид иллюстративной конструкции DART-A w/Fc содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с CD123 (VL_{CD123}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VH_{CD3}), линкер 2, E-спиральный домен, линкер 5, пептид 1, полипептид, который содержит домены CH2 и CH3 Fc-домена, и C-конец. Иллюстративный линкер 5 имеет последовательность: GGG. Иллюстративный пептид 1 имеет последовательность: DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:29**). Таким образом, первый полипептид такой конструкции DART-A w/Fc версии 1 состоит из: **SEQ ID NO:10 — SEQ ID NO:5 — SEQ ID NO:14 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:19 —** GGG **— SEQ ID NO:29 — SEQ ID NO:25** (где X представляет собой K).

[00115] Иллюстративная последовательность первого полипептида такой конструкции DART-A w/Fc версии 1 имеет последовательность (**SEQ ID NO:27**):

```
DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF
STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN
SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG
GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
QKSLSLSPGK
```

[00116] Вторая цепь такой конструкции DART-A w/Fc версии 1 будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VL_{CD3}), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с CD123 (VH_{CD123}), линкер 2, K-спиральный домен и C-конец. Таким образом, второй полипептид такой конструкции DART-A w/Fc версии 1 состоит из: **SEQ ID NO:1 — SEQ ID NO:5 — SEQ ID NO:6 — SEQ ID NO:18 — SEQ ID NO:20**. Такой полипептид имеет последовательность (**SEQ ID NO:28**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVQSGAELK KPGASVKVSC KASGYTFTDY
YMKWVRQAPG QGLEWIGDII PSNGATFYNQ KFKGRVTITV DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCARSHLL RASWFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

[00117] Третья полипептидная цепь такого DART-A w/Fc версии 1 будет содержать домены CH2 и CH3 Fc-домена IgG. Иллюстративный полипептид, который состоит из пептида 1 (DKTHTCPPCP; **SEQ ID NO:29**) и доменов CH2 и CH3 Fc-домена (**SEQ ID NO:26**, где **X** представляет собой K), имеет последовательность **SEQ ID NO:30**:

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

[00118] Дополнительные биспецифичные к **CD123 x CD3** диатела, содержащие альтернативные оптимизированные анти-CD3-связывающие домены, представлены в WO 2019/160904. В частности, такие диатела содержат домен VH_{CD123} с **SEQ ID NO:6**, а домен VL_{CD123} представляет собой **SEQ ID NO:10** и дополнительно содержит Fc-область.

III. Фармацевтические составы

[00119] Композиции согласно настоящему изобретению включают нерасфасованные лекарственные композиции, пригодные для получения фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций), и фармацевтические композиции (то есть композиции, подходящие для введения субъекту или пациенту), которые могут быть применены для приготовления единичных лекарственных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы и фармацевтически приемлемый носитель.

[00120] Иллюстративные фармацевтические составы содержат биспецифичную к **CD123 x CD3** связывающую молекулу и водный стабилизатор, а также, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель.

[00121] В контексте настоящей заявки термин «**фармацевтически приемлемый носитель**» предназначен для обозначения разбавителя, адъюванта (например, адъюванта Фрейнда (полного и неполного)), вспомогательного вещества или переносящей среды, которые одобрены регулирующим органом или указаны в Фармакопее США или в другой общепризнанной фармакопее как подходящие для введения животным, и, более конкретно, людям. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе полученные из нефти масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода может быть использована в качестве носителя при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть применены в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция, если это желательно, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов для поддержания pH. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобного.

[00122] Как правило, ингредиенты композиции согласно настоящему изобретению поставляются либо отдельно, либо в виде смеси в единичной лекарственной форме, например, в виде жидкого состава, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично

закрытой емкости, такой как флакон, ампула или саше, с указанием количества активного агента. В случае, если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть отпущена совместно с инфузионным флаконом, содержащим стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. В случае, если композицию вводят путем инъекции, в комплект поставки может входить ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы компоненты могли быть смешаны перед введением.

[00123] В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащие одну или более емкостей, содержащих биспецифичную к **CD123 x CD3** связывающую молекулу отдельно или совместно со стабилизатором и/или фармацевтически приемлемым носителем. Дополнительно в фармацевтическую упаковку или набор также могут быть включены один или более других профилактических или терапевтических агентов, пригодных для лечения заболевания. В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащие одну или более емкостей, наполненных одним или более компонентами фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Совместно с такой емкостью (емкостями) необязательно может находиться пояснение в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу лекарственных средств или биологических продуктов, отражающее одобрение указанным органом производства, применения или продажи для введения человеку.

IV. Наборы

[00124] В настоящем изобретении предложены наборы, которые содержат биспецифичную к **CD123 x CD3** связывающую молекулу, инструкции (например, относящиеся к хранению, выбору дозы, показаниям, побочным эффектам, противопоказаниям и так далее) и необязательно стабилизатор и/или носитель, который может быть применен в указанных выше способах. В таких

наборах биспецифичная к **CD123 x CD3** связывающая молекула может быть упакована в герметично закрытую емкость, такую как ампула, флакон, саше и т. д., которая может указывать на количество содержащейся в ней молекулы. Емкость может быть изготовлена из любого фармацевтически приемлемого материала, такого как стекло, смола, пластик и так далее. Биспецифичная к **CD123 x CD3** связывающая молекула в таком наборе может быть поставлена в виде жидкого раствора, сухого стерильного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытой емкости, которые могут быть повторно разведены, например, водой или физиологическим раствором до подходящей концентрации для введения субъекту. Такой жидкий или лиофилизированный препарат следует хранить при температуре от 2°C до 8°C в емкости производителя, и указанный препарат следует вводить в течение приблизительно 24 часов, в течение приблизительно 12 часов, в течение приблизительно 6 часов, в течение приблизительно 5 часов, в течение приблизительно 3 часов или в течение приблизительно 1 часа после повторного растворения. Набор может дополнительно содержать один или более других профилактических и/или терапевтических агентов, пригодных для лечения рака, в одной или более емкостях, и/или набор может дополнительно содержать одно или более цитотоксических антител, которые связывают один или более раковых антигенов, связанных с раком. В некоторых вариантах реализации указанный другой профилактический или терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В других вариантах реализации профилактический или терапевтический агент представляет собой биологический или гормональный терапевтический агент. Набор может дополнительно содержать инструкции по применению или другую печатную информацию.

[00125] Дополнительно в фармацевтическую упаковку или набор также могут быть включены один или более других профилактических или терапевтических агентов, пригодных для лечения заболевания. В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащие одну или более емкостей, наполненных одним или более ингредиентами фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Совместно с такой емкостью

(емкостями) необязательно может находиться пояснение в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу лекарственных средств или биологических продуктов, отражающее одобрение указанным органом производства, применения или продажи для введения человеку.

V. Способы введения

[00126] Фармацевтические составы, содержащие биспецифичную к **CD123 x CD3** связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, могут быть предложены для лечения, профилактики и облегчения одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества молекулы согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок или конъюгированную молекулу согласно настоящему изобретению. В одном аспекте такие композиции являются по существу очищенными (то есть по существу свободными от веществ, которые ограничивают их эффект или вызывают нежелательные побочные эффекты). В конкретном варианте реализации субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, такое как не являющееся приматом (например, крупный рогатый скот, лошадь, кошка, собака, грызун и так далее) или являющееся приматом (например, обезьяна, такая как яванский макак, человек и так далее). В конкретном варианте реализации субъект или пациент представляет собой человека.

[00127] Способы введения фармацевтического состава, содержащего биспецифичную к **CD123 x CD3** связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное). В конкретном варианте реализации биспецифичные к **CD123 x CD3** связывающие молекулы вводят внутривенно. Композиции могут быть введены

любым удобным путем, например, путем инфузии, и могут быть введены совместно с другими биологически активными агентами.

[00128] Введение путем инфузии может быть осуществлено с применением инфузионного насоса. «**Инфузионные насосы**» представляют собой медицинское устройство, которое контролируемым образом доставляет жидкости в организм пациента, в частности, с определенной скоростью и в течение длительного периода времени. Инфузионные насосы могут приводиться в действие механически, но, как правило, имеют электропривод. Некоторые инфузионные насосы являются «**стационарными**» инфузионными насосами и предназначены для применения у постели пациента. Другие, называемые «**амбулаторными**» инфузионными насосами, выполнены с возможностью перемещения или ношения. «**Шприцевой**» насос представляет собой инфузионный насос, в котором подаваемая жидкость удерживается в резервуаре камеры (например, шприца), а подвижный поршень применяется для управления объемом камеры и, следовательно, подачи жидкости. В «**эластомерном**» инфузионном насосе жидкость удерживается в растягивающемся баллонном резервуаре, и давление от эластичных стенок баллона приводит к подаче жидкости. В «**перистальтическом**» инфузионном насосе набор роликов сжимает гибкую трубку вдоль, выталкивая жидкость вперед. В «**многоканальном**» инфузионном насосе жидкости могут подаваться из нескольких резервуаров с несколькими скоростями. «**Смарт-насос**» представляет собой инфузионный насос, который оснащен компьютеризированной системой подачи жидкости, способной предупреждать о риске неблагоприятного лекарственного взаимодействия или о том, что параметры насоса были установлены вне заданных пределов. Примеры инфузионных насосов хорошо известны и представлены, например, в публикации [анонимной] 2002 “*General-Purpose Infusion Pumps*,” Health Devices 31(10):353-387; и в патентах США № 10,029,051, 10,029,047, 10,029,045, 10,022,495, 10,022,494, 10,016,559, 10,006,454, 10,004,846, 9,993,600, 9,981,082, 9,974,901, 9,968,729, 9,931,463, 9,927,943 и так далее.

[00129] В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические составы, содержащие биспецифичную к **CD123 x CD3-связывающую** молекулу

согласно настоящему изобретению, вводят путем инфузии с помощью одного или более амбулаторных насосов, чтобы пациент сохранял подвижность во время курса лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические составы биспецифической связывающей молекулы **CD123 x CD3** согласно настоящему изобретению вводят путем непрерывной инфузии. В конкретном варианте реализации 7-дневная схема непрерывной инфузии включает лечебную дозировку приблизительно 30 нг/кг массы тела пациента/день в течение 3 дней с последующей лечебной дозировкой приблизительно 100 нг/кг/день в течение 4 дней (например, лечебную дозировку 30 нг/кг массы тела пациента/день в течение 3 дней с последующей лечебной дозировкой 100 нг/кг/день в течение 4 дней; и так далее). В другом конкретном варианте реализации 7-дневная схема непрерывной инфузии включает лечебную дозировку приблизительно 30 нг/кг массы тела пациента/день в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 60 нг/кг массы тела пациента/день в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 100 нг/кг/день в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 200 нг/кг/день в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 300 нг/кг/день в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 400 нг/кг/день в течение 1 дня с последующей лечебной дозировкой приблизительно 500 нг/кг/день в течение 1 дня. В некоторых вариантах реализации за такой 7-дневной схемой непрерывной инфузии следует 21-дневная схема непрерывной инфузии, в которой ежедневно в течение 21 дня вводят лечебную дозировку 500 нг/кг/день. В некоторых вариантах реализации за такой 21-дневной схемой непрерывной инфузии следует 21-дневная схема непрерывной инфузии, в которой лечебную дозировку приблизительно 500 нг/кг/день вводят в течение дней 1-4 каждой недели такой 21-дневной схемы, и в течение дней 5-7 каждой недели лечебную дозировку не вводят.

[00130] В любом из описанных выше курсов лечения можно дополнительно контролировать долю CD8+ Т-лимфоцитов в микроокружении опухоли. Такой мониторинг может происходить до введения биспецифичной к **CD123 x CD3**

связывающей молекулы, в ходе терапии связывающей **CD123 x CD3** молекулой и/или после завершения цикла терапии связывающей **CD123 x CD3** молекулой.

VI. Применение композиций согласно настоящему изобретению

[00131] Биспецифичные к **CD123 x CD3** связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут быть применены для лечения любого заболевания или состояния, связанного с экспрессией CD123 или характеризующегося экспрессией CD123. В частности, биспецифичные к **CD123 x CD3** связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут быть применены для лечения гематологических злокачественных новообразований. Биспецифичные к **CD123 x CD3** связывающие молекулы согласно настоящему изобретению, в частности, подходят для применения для лечения гематологических злокачественных новообразований, включая химиорефрактерные гематологические злокачественные новообразования. В контексте настоящей заявки химиорефрактерное гематологическое злокачественное новообразование представляет собой гематологическое злокачественное новообразование, которое является рефрактерным к двум или более попыткам индукции, характеризуется первым CR длительностью менее 6 месяцев или неэффективностью лечения после двух или более циклов лечения гипометилирующим агентом).

[00132] Таким образом, без ограничения, такие молекулы могут быть применены для диагностики или лечения острого миелоидного лейкоза (**ОМЛ**) (включая первичный химиорефрактерный ОМЛ), хронического миелогенного лейкоза (**ХМЛ**), включая бластный криз ХМЛ и связанный с онкогеном Абельсона ХМЛ (**транслокацию Bcr-ABL**), миелодиспластического синдрома (**МДС**), острого В-лимфобластного лейкоза (**В-ОЛЛ**), острого Т-лимфобластного лейкоза (**Т-ОЛЛ**), хронического лимфоцитарного лейкоза (**ХЛЛ**), включая синдром Рихтера или трансформацию ХЛЛ Рихтера, волосатоклеточного лейкоза (**ВКЛ**), бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (**БПДКН**), неходжкинской лимфомы (**НХЛ**), включая мантийноклеточную лимфому (**МКЛ**)

и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (**МЛЛ**), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта. Биспецифичные к **CD123 x CD3** связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут быть дополнительно применены для получения лекарственных средств для лечения описанных выше состояний.

[00133] Биспецифичные к **CD123 x CD3** связывающие молекулы согласно настоящему изобретению, в частности, подходят для применения для лечения острого миелоидного лейкоза (**ОМЛ**, включая первичный химиорефрактерный острый миелоидный лейкоз), гематологического миелодиспластического синдрома (**МДС**), бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (**БПДКН**), неходжкинской лимфомы (**НХЛ**) или острого Т-лимфобластного лейкоза (**Т-ОЛЛ**).

ПРИМЕРЫ

[00134] После приведения общего описания настоящего изобретения для более легкого его понимания будут представлены следующие примеры, которые представлены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если не указано иное.

Пример 1
Сигнатуры экспрессии генов популяций пациентов, особенно подходящих для лечения с применением биспецифичной к CD123 x CD3 связывающей молекулы согласно настоящему изобретению

[00135] Чтобы продемонстрировать корреляцию между профилями экспрессии генов пациентов с гематологическим злокачественным новообразованием, в частности, ОМЛ, и благоприятным исходом терапии с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы, выделяли РНК из образцов костного мозга («**КМ**»), полученных от пациентов с индивидуального согласия пациента, от пациентов с рецидивирующим или рефрактерным ОМЛ, включенных в клиническое исследование флотетузумаба фазы 1/2 (NCT# 02152956, иллюстративной биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы).

[00136] Экспрессия 770 генов, связанных с иммунной системой, включая предварительно определенные показатели сигнатуры иммунных генов, исследованные в исходных образцах костного мозга подгруппы пациентов, получавших иллюстративную биспецифичную к CD123 x CD3 молекулу флотетузумаба. Вкратце, анализ NanoString PanCancer IO360™ использовали для исследования экспрессии 770 генов, включая обилие 14 типов иммунных клеток и 32 иммуноонкологических сигнатур в образцах костного мозга подгруппы пациентов (n=38) с рецидивирующим/рефрактерным ОМЛ, обработанных флотетузумабом в рекомендованной дозе фазы 2 (RP2D; 38 образцов костного мозга, собранных на исходном уровне, и 34 образца костного мозга, собранных при лечении (после циклов 1 [n=25] и 2 [n=9]). Количество генов IO 360 определяли с помощью системы nCounter® (NanoString Technologies, Inc.) по существу следующим образом: РНК (~100 нг на образец) выделяли из нефракционированных аспиратов костного мозга и инкубировали со смесью репортерного и захватывающего зондов для гибридизации. Количество транскриптов анализировали в системе анализа nCounter FLEX, применяют настройку высокого разрешения. Выходные файлы подсчета репортерного кода (RCC) используются для расчета показателей сигнатуры гена. Оценки сигнатуры для предварительно определенных сигнатур, описанных NanoString, рассчитывали как предварительно определенные линейные комбинации (средневзвешенные значения) биологически релевантных наборов генов, по существу, как описано в WO 2020/092404 и Vadakekolathu J, *et al*. (2020) «*Immune Landscapes Predict Chemotherapy Resistance And Immunotherapy Response In Acute Myeloid Leukemia*,» Sci. Transl. Med. 12(546):eaaz0463. Кроме того, был создан ранжированный список генов (значения χ^2) с использованием пакета программ Orange3 (версия 3.25.0). Неконтролируемая иерархическая кластеризация (евклидово расстояние, полное сцепление).

[00137] Как сообщалось ранее, у пациентов с первичной индукционной недостаточностью (PIF)/ранним рецидивом (ER) наблюдалась более высокая иммунная инфильтрация по сравнению с пациентами с поздним рецидивом (LR). Показатели *PD-L1* и воспалительного хемокина были выше у пациентов,

получавших PIF/ER и HMA, по сравнению с LR. Показатель сигнатуры опухолевого воспаления (TIS) коррелировал с показателями антигенпроцессорного механизма и воспалительного хемокина ($P<0,0001$), что свидетельствует о возникновении презентации антигена и хемопривлечения Т-клеток в образцах с сильным Т-клеточным воспалением (Vadakekolathu J, *et al.* (2020) "*Immune Landscapes Predict Chemotherapy Resistance And Immunotherapy Response In Acute Myeloid Leukemia*. Sci. Transl. Med. 12(546):eaaz0463).

[00138] Дальнейший анализ проводили путем ранжирования 770 генов, связанных с иммунной системой, на панели экспрессии генов. В результате этого ранжирования была идентифицирована парсимониальная сигнатура экспрессии, охватывающая первые 10 генов, связанных с полным ответом на иллюстративную биспецифную к **CD123 x CD3** молекулу флотетузумаба, определяемым как полная ремиссия (CR), полная ремиссия с неполным гемопоэтическим восстановлением (CRi) или полная ремиссия с частичным гемопоэтическим восстановлением (CRh). 10 идентифицированных генов: CD8B, CRABP2, FCGR3A/B, FBP1, FPR1, ICOS, NOTCH2, PDGFA, SERPINH1 и THBS1 перечислены в **Таблице 1** выше. В **Таблице 1** также представлен иллюстративный неограничивающий номер доступа NCBI для каждого гена. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию этих 10 генов, связанную с полным ответом на типовую биспецифичную к CD123 x CD3 молекулу флотетузумаба, представлена на **Фигуре 2**. Недавно идентифицированный показатель сигнатуры 10 генов был рассчитан как средняя сумма экспрессии генов в когорте пациентов. Экспрессия этой сигнатуры 10 генов была выше у пациентов с PIF/ER на момент включения в исследование по сравнению с LR и у пациентов с высоким или промежуточным показателем иммунного кластера. На **Фигуре 3** представлены показатели сигнатур 10 генов в соответствии с ответом пациента (полный ответ, частичный ответ или отсутствие ответа) и показано, что пациенты, демонстрирующие антилейкозный ответ, имеют более высокие баллы сигнатур 10 генов. Как показано на тепловой карте, представленной на **Фигуре 4**, этот показатель сигнатуры 10 генов коррелировал с измеренной степенью иммунной инфильтрации костного мозга, определяемой экспрессией

предварительно определенных показателей сигнатуры иммунного гена (NanoString), включая типы нейтрофилов, макрофагов и миелоидных клеток, и с воспалительными хемокинами и другими показателями сигнатуры, которые отражают Т-клеточное воспаленние, IFN-γ-управляемую TME. Не ограничиваясь каким-либо конкретным механизмом, следует отметить, что гены в сигнатуре включают CD8B, *ICOS* иммунных контрольных точек и *NOTCH2*, все из которых отражают управляемое Т-клетками и сильно иммуносупрессированное микроокружение опухоли, которое может быть повторно активировано **CD123 x CD3** биспецифичными связывающими молекулами, такими как флотетузумаб. В этом отношении усиленная передача сигналов Notch коррелировала с усиленной инфильтрацией CD8 Т-клеток у пациентов с колоректальной карциномой и с ингибированными Т-клеточными ответами. Кроме того, сигналинг Notch2, но не Notch1, критически необходим для получения цитотоксических Т-лимфоцитов с противоопухолевой активностью в экспериментальных моделях лимфомы и действует как активатор транскрипции гранзима B.

[00139] Анализ сетей функциональных ассоциаций белков проводили с использованием STRING (string-db.org). Эти данные показали, что 10 генов, связанных с полным ответом, были обогащены онтологиями и путями, связанными со связыванием и процессингом антигена, активностью рецептора, активированного VEGF, сигналингом Notch, регуляцией микроРНК при раке и дифференцировкой Т-хелпера типа 1 (Th1) и Th2 (**Таблица 5**). Эти данные подтверждают потенциальную роль усиленной и устойчивой презентации антигена при TME в стимулировании антилейкозных ответов на биспецифичные к **CD123 x CD3** связывающие молекулы, такие как флотетузумаб.

Таблица 5 Онтология генов (GO) и пути KEGG, захваченные 10 главными генами, связанными с полным ответом на флотетузумаб			
Срок GO	**Описание**	**Количество в наборе генов**	**FDR**
GO:0005102	Связывание сигнального рецептора	25 из 1513	$1,63 \times 10^{-12}$
GO:0042605	Связывание пептидного антигена	7 из 22	$1,00 \times 10^{-10}$
GO:0003823	Связывание антигена	8 из 56	$3,98 \times 10^{-10}$
GO:0019838	Связывание фактора роста	9 из 126	$4,05 \times 10^{-9}$
GO:0005518	Связывание с коллагеном	7 из 61	$2,31 \times 10^{-8}$
GO:0005161	Связывание рецептора тромбоцитарного фактора роста	5 из 15	$6,26 \times 10^{-8}$
GO:0005515	Связывание белка	38 из 326605	$1,25 \times 10^{-7}$
GO:0005021	Рецепторная активность, активируемая фактором роста эндотелия сосудов	4 из 7	$4,24 \times 10^{-7}$
GO:0046977	Связывание TAP	4 из 7	$4,24 \times 10^{-7}$
GO:0044877	Связывание белоксодержащего комплекса	15 из 968	$4,26 \times 10^{-7}$
GO:0048407	Связывание тромбоцитарного фактора роста	4 из 11	$1,26 \times 10^{-6}$
Путь	**Описание**	**Количество в наборе генов**	**FDR**
hsa05165	Папилломавирусная инфекция человека	20 из 317	$1,56 \times 10^{-20}$
hsa04330	Сигнальный путь Notch	10 из 48	$1,49 \times 10^{-14}$

hsa05166	Инфекция HTLV-I	14 из 250	$1,43 \times 10^{-13}$
hsa05206	МикроРНК при раке	12 из 149	$2,12 \times 10^{-13}$
hsa04658	Дифференциация клеток Th1 и Th2	10 из 888	$1,49 \times 10^{-12}$
hsa04612	Процессинг и презентация антигена	9 из 66	$5,40 \times 10^{-12}$
hsa04145	Фагосома	10 из 145	$1,12 \times 10^{-10}$
hsa05200	Пути при раке	151 из 515	$6,68 \times 10^{-10}$
hsa04015	Сигнальный путь Rap1	10 из 203	$1,82 \times 10^{-9}$
hsa04514	Молекулы клеточной адгезии (CAMs)	9 из 139	$1,82 \times 10^{-9}$
hsa05330	Отторжение аллотрансплантата	6 из 35	$9,90 \times 10^{-9}$
FDR = скорость обнаружения ложных данных			

[00140] Кривые AUROC, определяющие прогностическую способность статуса риска заболевания согласно критериям European Leukemia-Net (ELN) (Dohner H, *et al*., 2017, "*Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from a international expert panel."* Blood **129**(4): 424-47) на момент начала исследования и показатель сигнатур 10 генов для антилейкозной активности иллюстративной биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулы флотетузумаба, по отдельности или в комбинации, показаны на **Фигуре 5**, стандартные ошибки и доверительные интервалы приведены в **Таблице 6**. Следует отметить, что оценка 10-генных сигнатур имела значение AUROC 0,854, если рассматривать отдельно, и 0,904, если рассматривать в сочетании с категорией риска согласно критериям ELN, по сравнению с 0,672 только для категории риска согласно критериям ELN. Кроме того, лечение биспецифичной к **CD123 x CD3** связывающей молекулой флотетузумабом модулировала TME, что предполагает повышенный уровень иммунной инфильтрации, экспрессии PD-L1, презентации антигена и сигнатур сигнального гена IFN-γ.

Таблица 6 **Анализ кривой AUROC**					
Переменная	**Площадь**	**С.О.**	**p-значение**	**ДИ 95%** **Нижняя граница**	**Верхняя граница**
Риск согласно критериям ELN	0,672	0,10	0,122	0,476	0,869
Оценка сигнатуры 10-гена	0,854	0,067	0,001	0,724	0,985
Риск согласно критериям ELN + показатель сигнатуры 10 генов	0,904	0,055	0,000	0,797	1,000
SE - стандартная ошибка; CI - доверительный интервал. AUROC = 1,0 означает идеальное прогнозирование, а AUROC = 0,5 означает отсутствие прогнозирующей способности. Кривые AUROC оценивали с использованием пакета программ SPSS, как было опубликовано ранее (Vadakekolathu J. *et al*. (2020) "*Immune Landscapes Predict Chemotherapy Resistance And Immunotherapy Response In Acute Myeloid Leukemia,*" Sci. Transl. Med. 12(546):eaaz0463; Wagner S, *et al*. (2019) "*A Parsimonious 3-Gene Signature Predicts Clinical Outcomes In An Acute Myeloid Leukemia Multicohort Study*," Blood Adv. 3(8):1330-1346)					

[00141] Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы для каждой отдельной публикации и патентной заявки было конкретно и отдельно указано, что их полное содержание включено в настоящую заявку посредством ссылки. Несмотря на то, что настоящее изобретение описано применительно к его частным вариантам реализации, следует понимать, что оно допускает дополнительные модификации, и данная заявка подразумевает охватывание любых изменений, применений или адаптаций настоящего изобретения, соответствующих, в целом, принципам настоящего изобретения и включающих такие отступления от настоящей заявки, как отступления, относящиеся к общеизвестной или общепринятой практике в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение, и которые могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше в настоящей заявке.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения того, будет ли пациент подходящим для лечения гематологического злокачественного новообразования образом отвечать на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы, причем указанный способ включает:

   (a) оценку экспрессии одного или более генов-мишеней в клеточном образце от указанного пациента до введения указанной биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы относительно экспрессии одного или более генов-мишеней и/или референсных генов; и

   (b) идентификацию указанного пациента как пациента, подходящим образом отвечающего на лечение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой, если обнаружено, что экспрессия указанного одного или более генов-мишеней повышена по сравнению с указанной экспрессией указанного одного или более генов-мишеней и/или референсных генов, причем указанный один или более генов-мишеней выбраны из группы, состоящей из: SERPHINH1, NOTCH2, FCGR3A/B, FPR1, FBP1, PDGFA, CRABP2, THBS1, ICOS и CD8B.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ включает оценку:

   (i) экспрессии одного или более генов-мишеней; и

   (ii) одного или более референсных генов, экспрессия которых не характерна для указанного гематологического злокачественного новообразования.

3. Способ по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что указанный способ включает оценку экспрессии указанного одного или более генов-мишеней относительно исходной экспрессии указанного одного или более референсных генов указанного пациента.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанный способ включает оценку экспрессии указанного одного или более генов-мишеней указанного пациента относительно экспрессии указанного одного или более генов-мишеней:

(a) индивидуума, страдающего указанным гематологическим злокачественным новообразованием, или популяции таких индивидуумов; или

(b) индивидуума, который неуспешно ответил на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы для лечения указанного гематологического злокачественного новообразования, или популяции таких индивидуумов; или

(c) индивидуума, который успешно ответил на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы для лечения указанного гематологического злокачественного новообразования, или популяции таких индивидуумов.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что относительный уровень экспрессии указанного одного или более генов-мишеней в указанной популяции устанавливают путем усреднения уровня экспрессии генов в клеточных образцах, полученных от указанной популяции индивидуумов.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанный пациент демонстрирует уровень экспрессии по меньшей мере одного из указанных генов-мишеней:

(a) который превышает первый квартиль уровней экспрессии указанного гена-мишени в популяции индивидуумов, страдающих от указанного гематологического злокачественного новообразования; или

(b) который превышает первый квартиль уровней экспрессии указанного гена-мишени в популяции индивидуумов, которые неуспешно ответили на лечение указанного гематологического злокачественного новообразования с

применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы; или

(c) который находится в пределах по меньшей мере первого квартиля уровней экспрессии указанного гена-мишени в популяции индивидуумов, которые успешно ответили на лечение указанного гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает введение лечебной дозировки указанной биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы указанному пациенту, если установлено, что указанный пациент будет подходящим образом отвечать на такое лечение, и причем указанное введение указанной биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы стимулирует гибель клеток указанного гематологического злокачественного новообразования у указанного пациента.

8. Способ лечения гематологического злокачественного новообразования, причем указанный способ включает:

(a) применение способа по любому из пп. 1-6 для определения того, будет ли пациент подходящим для лечения указанного гематологического злокачественного новообразования образом отвечать на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы;

(b) введение лечебной дозировки указанной биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы указанному пациенту, если установлено, что указанный пациент подходящим образом будет отвечать на такое лечение;

при этом указанное введение указанной биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы стимулирует гибель клеток указанного

гематологического злокачественного новообразования у указанного пациента.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что указанный клеточный образец представляет собой образец костного мозга.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанную оценку экспрессии или указанное определение того, будет ли указанный пациент подходящим для лечения гематологического злокачественного новообразования образом отвечать на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы, осуществляют путем:

(a) определения уровней экспрессии генов для каждого гена-мишени в одном или более клеточных образцах с применением платформы экспрессии генов; и

(b) сравнения указанных уровней экспрессии гена-мишени с уровнями экспрессии одного или более референсных генов.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанную оценку экспрессии или указанное определение того, будет ли указанный пациент подходящим для лечения гематологического злокачественного новообразования образом отвечать на применение биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы, осуществляют путем:

(a) измерения необработанных значений уровней РНК для каждого гена-мишени в еще одном клеточном образце с применением платформы экспрессии генов, причем указанная платформа экспрессии генов содержит референсный набор генов домашнего хозяйства, и

(b) присвоения относительного значения экспрессии каждому из измеренных указанных необработанных значений уровней РНК для генов-мишеней с применением измеренных уровней РНК внутренних референсных генов.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанные один или более референсных генов включают один или более из: ABCF1, G6PD, NRDE2, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP и UBB.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где для указанного одного или более генов-мишеней определяют показатель сигнатуры гена.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанный показатель сигнатуры гена определяют способом, включающим:

(a) измерение необработанных значений уровней РНК для каждого гена-мишени в еще одном клеточном образце с применением платформы экспрессии генов, содержащей референсный набор генов домашнего хозяйства,

(b) нормализацию каждого из измеренных необработанных значений уровней РНК по среднему геометрическому указанных генов домашнего хозяйства и необязательно дальнейшую нормализацию каждого значения РНК по отношению к стандарту,

(c) логарифмическое преобразование каждого нормализованного значения РНК,

(d) суммирование указанных логарифмически преобразованных значений РНК для каждого гена-мишени в указанной сигнатуре, и

(e) деление суммы нормализованных логарифмически преобразованных значений РНК на количество генов-мишеней в указанной сигнатуре с получением показателя сигнатуры гена.

15. Способ по любому из пп. 13-14, отличающийся тем, что показатель сигнатуры гена пациента, который:

(a) превышает первый квартиль показателей для указанной сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней

экспрессии одного или более указанных генов-мишеней в популяции индивидуумов, страдающих от указанного гематологического злокачественного новообразования; или

(b) превышает первый квартиль показателей для указанной сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более указанных генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые неуспешно ответили на лечение указанного гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы; или

(c) находится в пределах по меньшей мере первого квартиля показателей для указанной сигнатуры гена, рассчитанных на основании уровней экспрессии одного или более указанных генов-мишеней в популяции индивидуумов, которые успешно ответии на лечение указанного гематологического злокачественного новообразования с применением биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы,

указывает на более благоприятный ответ пациента на лечение указанной биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулой.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанная биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула представляет собой биспецифичное антитело или биспецифичную молекулу, содержащую scFv.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что указанная биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула представляет собой JNJ-63709178, XmAb14045 или APVO436.

18. Способ по любому из пп. 1-15, где указанная биспецифичная к **CD123 x CD3** молекула представляет собой ковалентно связанное биспецифичное диатело, имеющее две, три или четыре полипептидные цепи.

19. Способ по п. 18, где указанное диатело включает:

(a) первую полипептидную цепь, имеющую аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:21**; и

(b) вторую полипептидную цепь, имеющую аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:23**; и

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

20. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что указанное гематологическое злокачественное новообразование указанного пациента выбрано из группы, состоящей из: острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), бластного криза ХМЛ, связанного с онкогеном Абельсона ХМЛ (транслокации Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (МДС), острого В-лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), острого Т-лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), синдрома Рихтера, трансформации ХЛЛ Рихтера, волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), неходжкинской лимфомы (НХЛ), включая мантийноклеточную лимфому (МКЛ) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта.

21. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанное гематологическое злокачественное новообразование указанного пациента представляет собой ОМЛ.

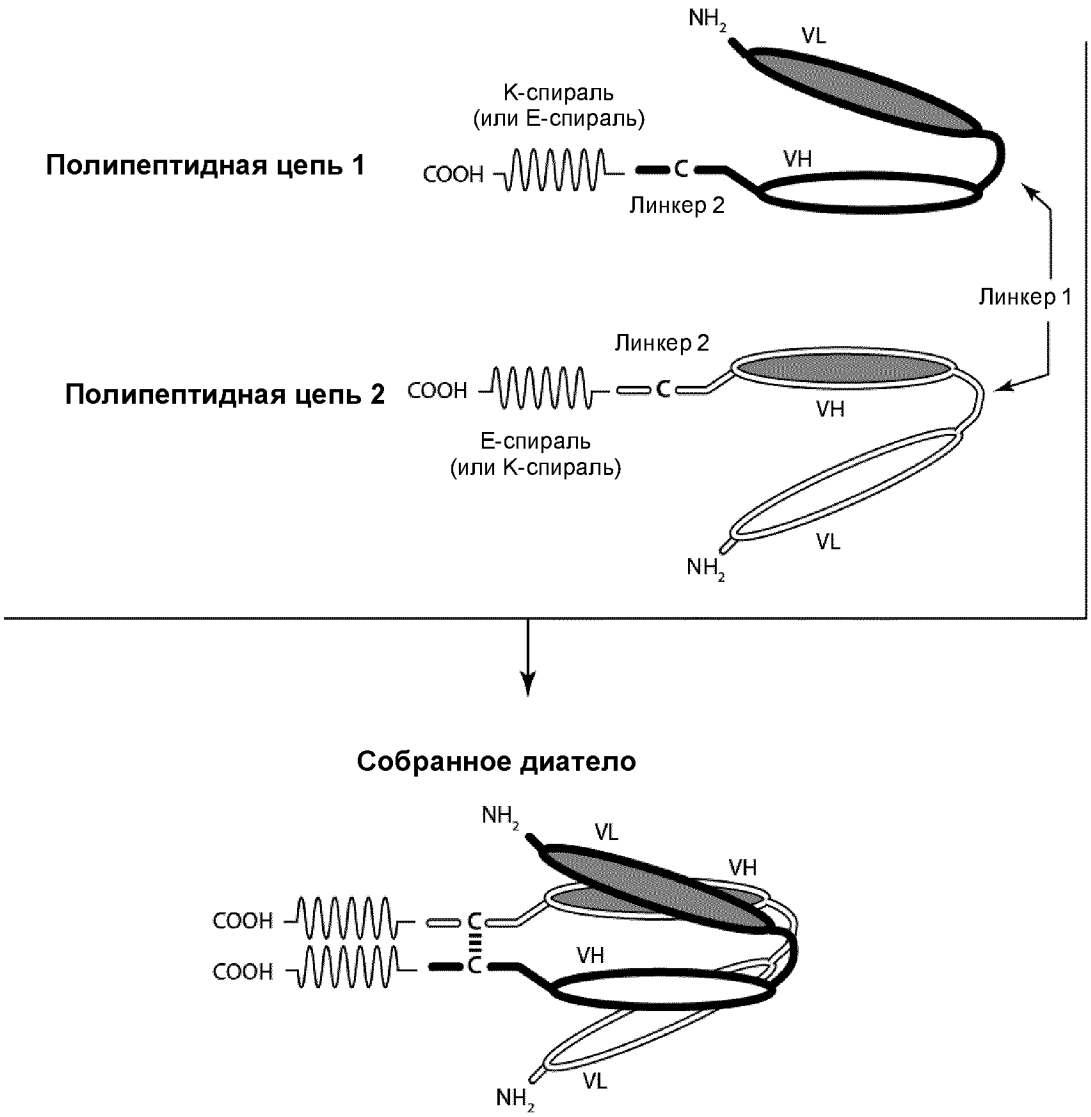
22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что указанное гематологическое злокачественное новообразование указанного пациента является рефрактерным к химиотерапии.

23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что указанная лечебная дозировка указанной биспецифичной к **CD123 x CD3** молекулы включает по меньшей мере одну дозу, выбранную из

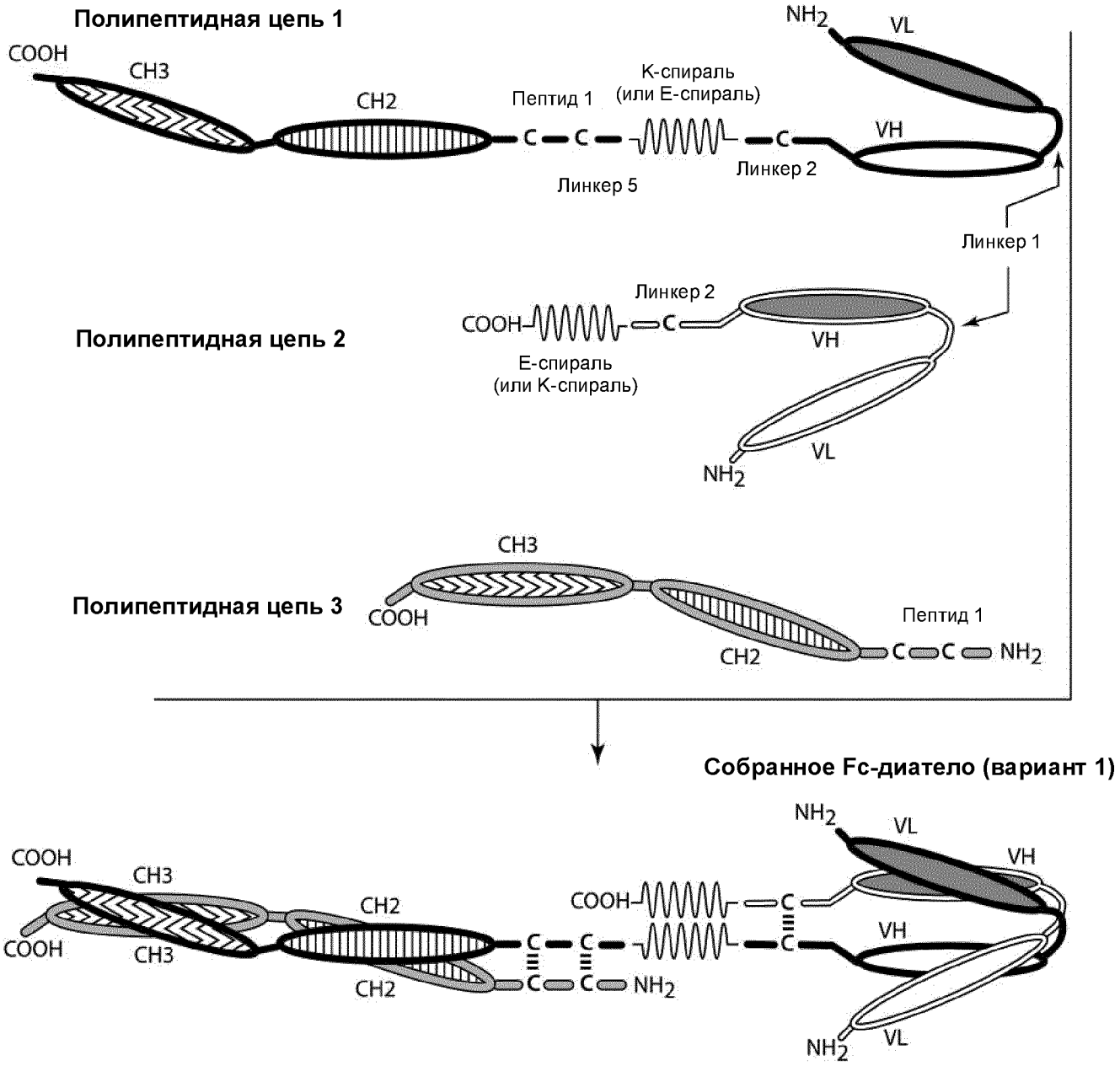
группы, состоящей из приблизительно 30, приблизительно 60, приблизительно 100, приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400 и приблизительно 500 нг/кг массы тела пациента/день.

24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанную лечебную дозировку вводят путем непрерывной инфузии.

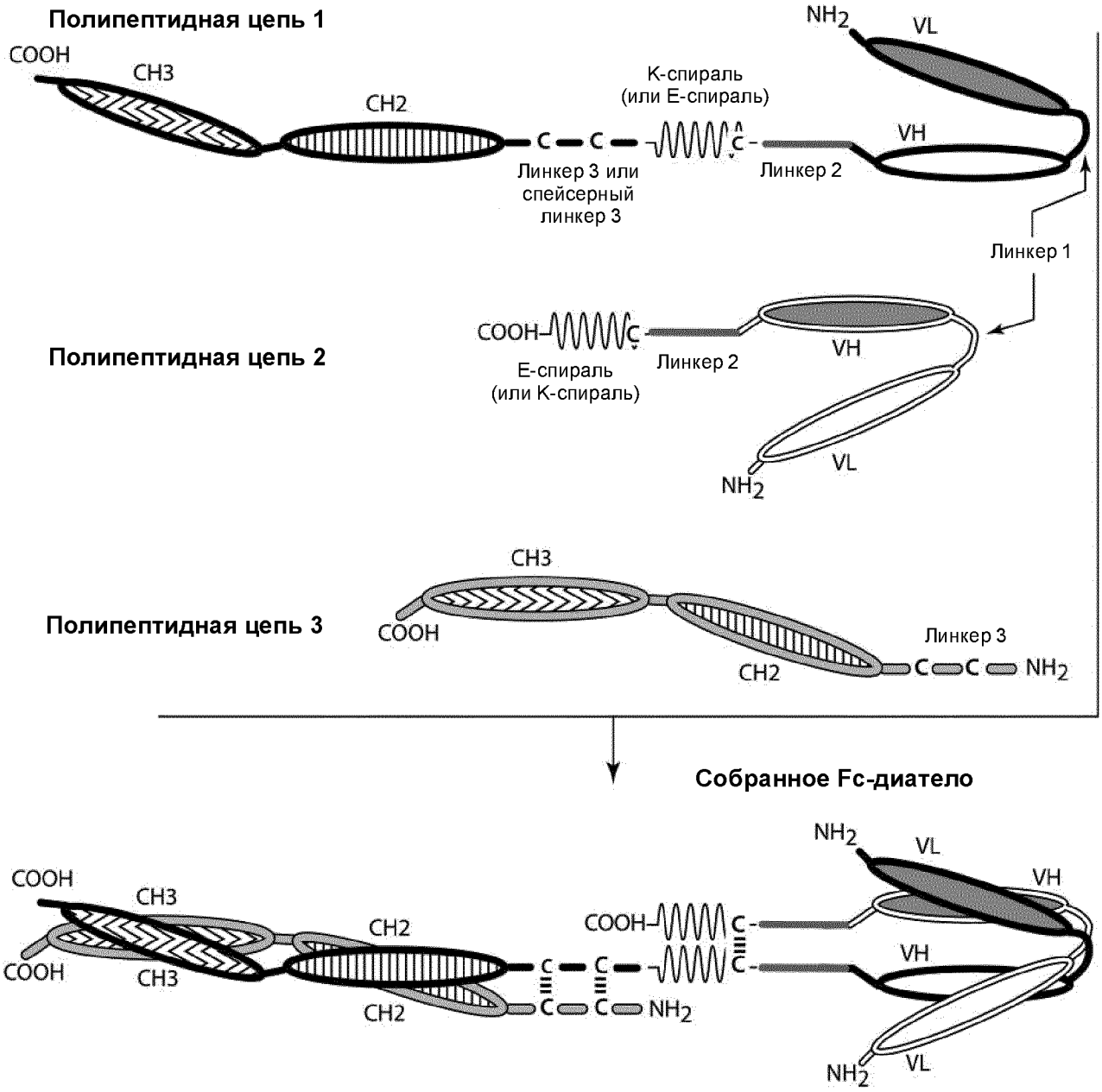
25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что указанный пациент представляет собой пациента-человека.


NH2
VL
K-спираль
(или E-спираль)
Полипептидная цепь 1
COOH
C
VH
Линкер 2
Линкер 1
Линкер 2
Полипептидная цепь 2
COOH
C
VH
E-спираль
(или K-спираль)
VL
NH2
Собранное диатело
NH2
VL
VH
COOH
C
COOH
C
VH
NH2
VL

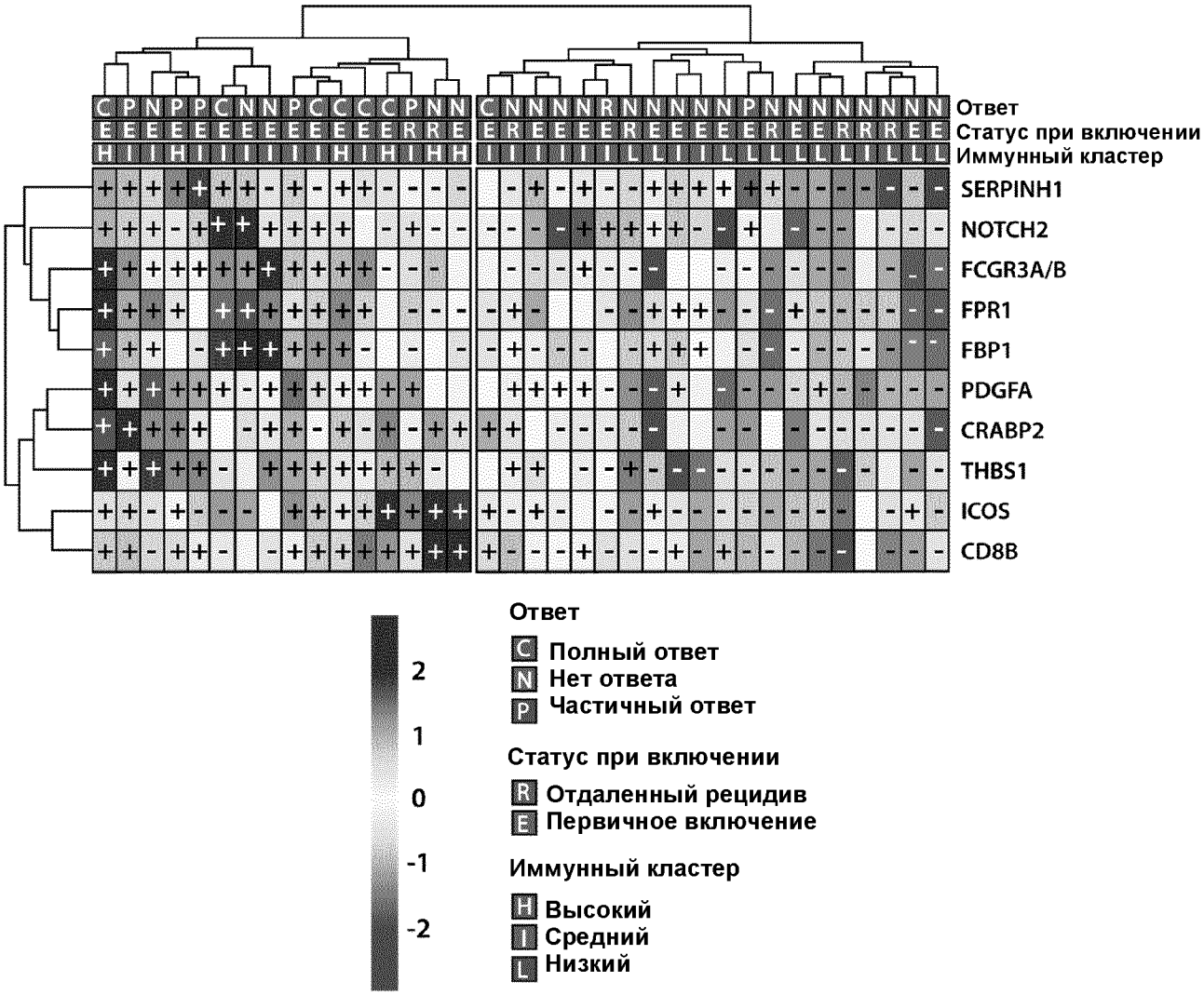
Фигура 1A


Полипептидная цепь 1
COOH
CH3
CH2
Пептид 1
K-спираль
(или E-спираль)
C
C
C
Линкер 5
Линкер 2
NH2
VL
VH
Линкер 1
Полипептидная цепь 2
Линкер 2
COOH
C
VH
E-спираль
(или K-спираль)
VL
NH2
Полипептидная цепь 3
CH3
COOH
CH2
Пептид 1
C
C
NH2
Собранное Fc-диатело (вариант 1)
COOH
CH3
COOH
CH3
CH2
CH2
C
C
C
C
NH2
COOH
C
C
NH2
VL
VH
VH
NH2
VL

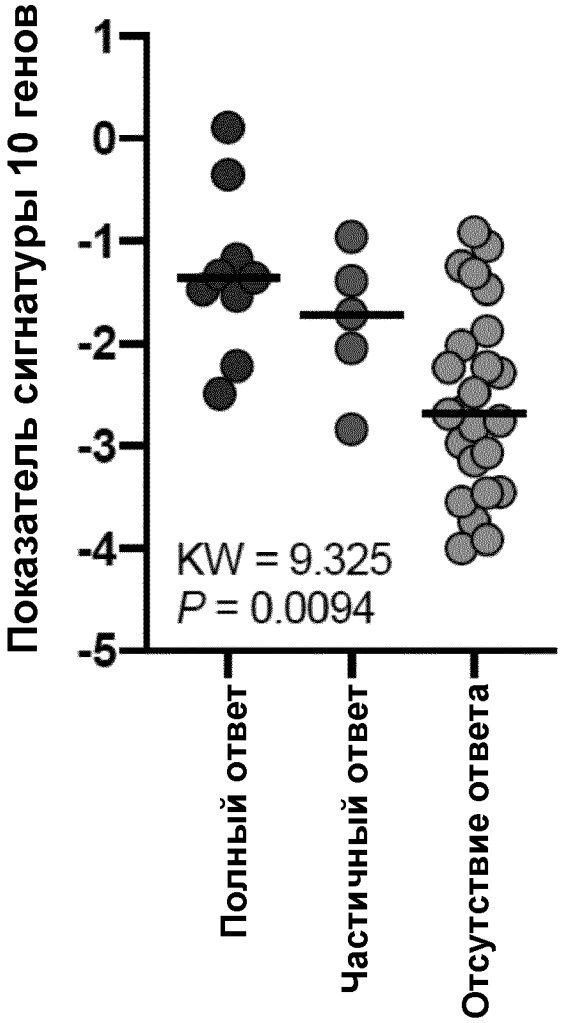
Фигура 1B


Полипептидная цепь 1
COOH
CH3
CH2
C C
K-спираль
(или E-спираль)
C
Линкер 3 или
спейсерный
линкер 3
Линкер 2
NH2
VL
VH
Линкер 1
Полипептидная цепь 2
COOH
C
E-спираль
(или K-спираль)
Линкер 2
VH
VL
NH2
Полипептидная цепь 3
CH3
COOH
CH2
Линкер 3
C C NH2
Собранное Fc-диатело
COOH
CH3
COOH
CH3
CH2
CH2
C C
C C NH2
COOH
C
C
NH2
VL
VH
VH
NH2
VL

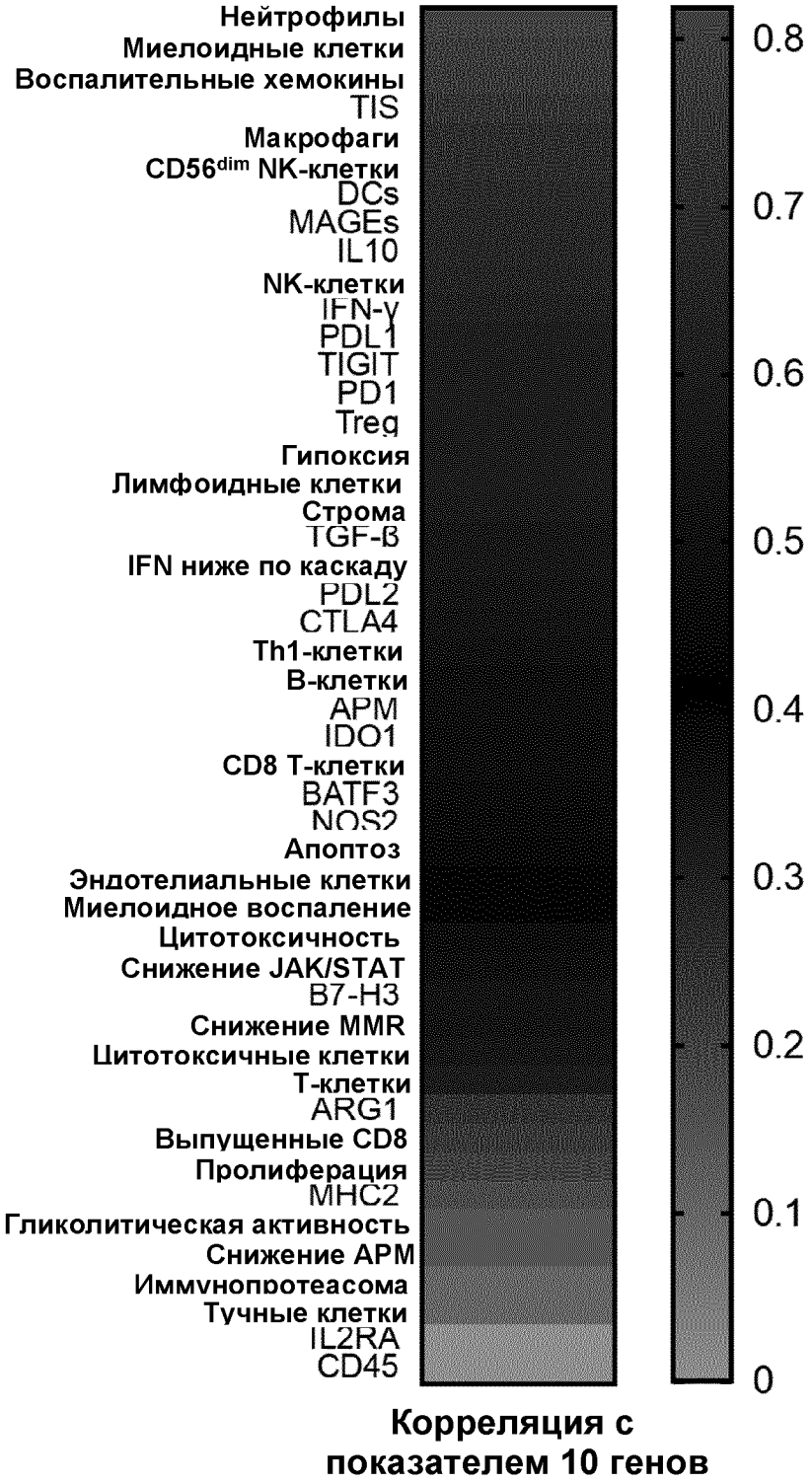
Фигура 1C


Ответ
Статус при включении
Иммунный кластер
SERPINH1
NOTCH2
FCGR3A/B
FPR1
FBP1
PDGFA
CRABP2
THBS1
ICOS
CD8B
2
1
0
-1
-2
Ответ
C Полный ответ
N Нет ответа
P Частичный ответ
Статус при включении
R Отдаленный рецидив
E Первичное включение
Иммунный кластер
H Высокий
I Средний
L Низкий

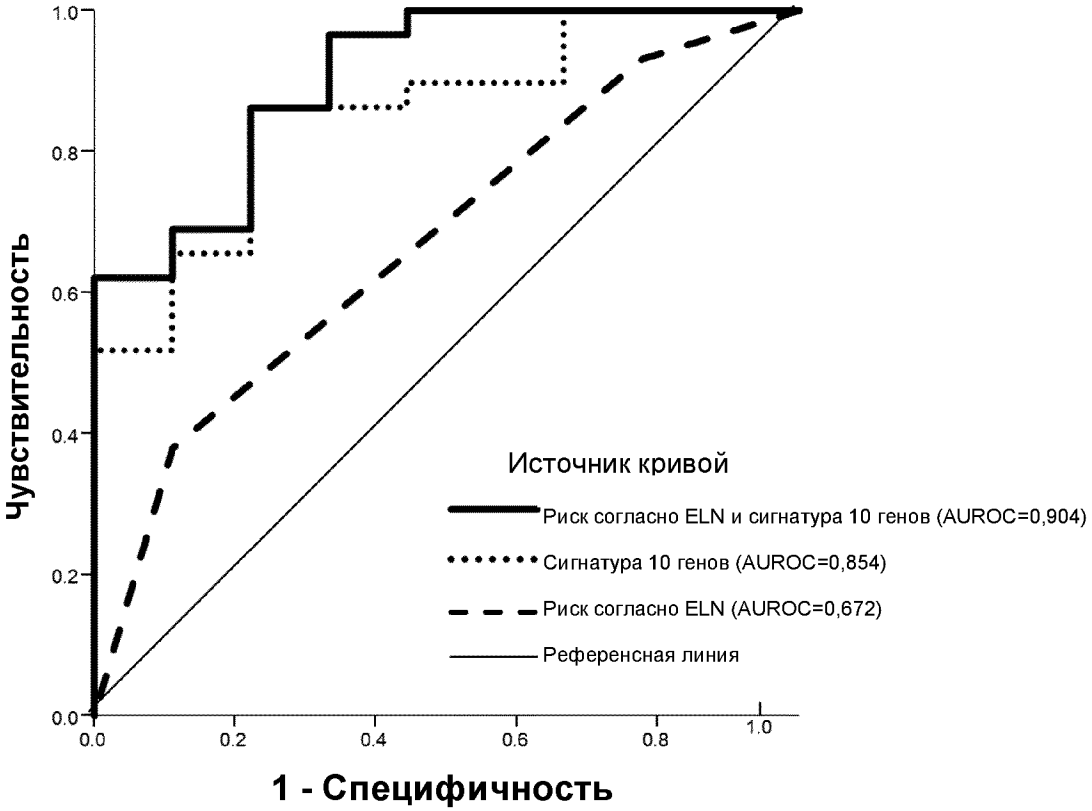
Фигура 2


Показатель сигнатуры 10 генов
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
KW = 9.325
P = 0.0094
Полный ответ
Частичный ответ
Отсутствие ответа

Фигура 3


Нейтрофилы
Миелоидные клетки
Воспалительные хемокины
TIS
Макрофаги
CD56dim NK-клетки
DCs
MAGEs
IL10
NK-клетки
IFN-γ
PDL1
TIGIT
PD1
Treg
Гипоксия
Лимфоидные клетки
Строма
TGF-β
IFN ниже по каскаду
PDL2
CTLA4
Th1-клетки
B-клетки
APM
IDO1
CD8 T-клетки
BATF3
NOS2
Апоптоз
Эндотелиальные клетки
Миелоидное воспаление
Цитотоксичность
Снижение JAK/STAT
B7-H3
Снижение MMR
Цитотоксичные клетки
T-клетки
ARG1
Выпущенные CD8
Пролиферация
MHC2
Гликолитическая активность
Снижение APM
Иммунопротеасома
Тучные клетки
IL2RA
CD45
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Корреляция с
показателем 10 генов

Фигура 4


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Чувствительность
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1 - Специфичность
Источник кривой
Риск согласно ELN и сигнатура 10 генов (AUROC=0,904)
Сигнатура 10 генов (AUROC=0,854)
Риск согласно ELN (AUROC=0,672)
Референсная линия

Фигура 5