



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112867735 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 09

(21) 申请号 201980058621.6	(72) 发明人 黄智华 饶以群 沈武忠 崔玉敏 严孝强
(22) 申请日 2019.09.06	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112867735 A	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494 专利代理师 封新琴
(43) 申请公布日 2021.05.28	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(66) 本国优先权数据 201811041588.X 2018.09.07 CN	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.03.08	(56) 对比文件 CN 107903324 A, 2018.04.13
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/CN2019/104680 2019.09.06	审查员 邓宗碧
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/048525 EN 2020.03.12	
(73) 专利权人 埃泰美德(香港)有限公司 地址 中国香港铜锣湾	权利要求书4页 说明书90页 序列表29页 附图7页

(54) 发明名称
双特异性抗原结合蛋白及其用途

(57) 摘要
本发明提供了特异性结合CD3和肿瘤抗原(例如CD19)的双特异性抗原结合蛋白(BSAP)。本发明还提供了所述BSAP在制备药物组合物、治疗癌症的方法和包含所述BSAP的试剂盒中的用途。

1. 一种双特异性抗原结合蛋白 (BSAP), 其包含:

I) 特异性识别CD19的Fab (抗CD19 Fab), 其中所述抗CD19 Fab包含:

(a) 免疫球蛋白 (Ig) 重链可变区 (VH) 和Ig重链恒定区1 (CH1), 和

(b) Ig轻链可变区 (VL) 和Ig轻链恒定区 (CL); 以及

II) 特异性识别CD3的scFv (抗CD3 scFv);

其中:

(i) 所述抗CD3 scFv的C末端经由任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端;

(ii) 所述抗CD3 scFv的C末端经由任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端; 或

(iii) 其中所述BSAP包含第一抗CD3 scFv和第二抗CD3 scFv, 其中所述第一抗CD3 scFv的C末端经由第一任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端, 并且其中所述第二抗CD3 scFv的C末端经由第二任选的接头连接至所述CD19 Fab的VL的N末端;

其中:

(1) 其中所述抗CD19 Fab的VH包含如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的重链高变区1 (HVR-H1)、如SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的HVR-H2、和如SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的HVR-H3; 并且其中所述抗CD19 Fab的VL包含如SEQ ID NO:4的氨基酸序列所示的轻链高变区1 (HVR-L1)、如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的HVR-L2、和如SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的HVR-L3; 或

(2) 其中所述抗CD19 Fab的VH包含如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的重链高变区1 (HVR-H1)、如SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的HVR-H2、和如SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的HVR-H3; 并且其中所述抗CD19 Fab的VL包含如SEQ ID NO:37的氨基酸序列所示的轻链高变区1 (HVR-L1)、如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的HVR-L2、和如SEQ ID NO:39的氨基酸序列所示的HVR-L3;

其中所述抗CD3 scFv包含VH和VL; 其中所述抗CD3 scFv的VH包含如SEQ ID NO:9的氨基酸序列所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的HVR-H2、和如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HVR-H3; 并且其中所述抗CD3 scFv的VL包含如SEQ ID NO:12的氨基酸序列所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的HVR-L2、和如SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的HVR-L3。

2. 根据权利要求1所述的BSAP, 其中所述抗CD3 scFv的C末端经由任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。

3. 根据权利要求1所述的BSAP, 其中所述抗CD3 scFv的C末端经由任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。

4. 根据权利要求1所述的BSAP, 其中所述BSAP包含第一抗CD3 scFv和第二抗CD3 scFv, 其中所述第一抗CD3 scFv的C末端经由第一任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端, 并且所述第二抗CD3 scFv的C末端经由第二任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。

5. 根据权利要求4所述的BSAP, 其中所述第一抗CD3 scFv和所述第二抗CD3 scFv相同。

6. 根据权利要求1所述的BSAP, 其中所述抗CD19 Fab的VH包含如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的HVR-H2、和如SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的HVR-H3; 并且其中所述抗CD19 Fab的VL包含如SEQ ID NO:4的氨基酸序列所

示的HVR-L1、如SEQ ID NO:5的氨基酸序列所示的HVR-L2、和如SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的HVR-L3。

7. 根据权利要求1所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的VH包含如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的HVR-H1、如SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的HVR-H2、和如SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的HVR-H3;并且其中所述抗CD19 Fab的VL包含如SEQ ID NO:37的氨基酸序列所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:38的氨基酸序列所示的HVR-L2、和如SEQ ID NO:39的氨基酸序列所示的HVR-L3。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的VH包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的氨基酸序列;并且其中所述抗CD19 Fab的VL包含如SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:8或40具有至少95%同一性的氨基酸序列。

9. 根据权利要求8所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且其中所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

10. 根据权利要求8所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且其中所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1所述的BSAP,其中所述抗CD3 scFv的VH包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:15具有至少95%同一性的氨基酸序列,并且其中所述抗CD3 scFv的VL包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:16具有至少95%同一性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求11所述的BSAP,其中所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,并且其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

13. 根据权利要求12所述的BSAP,其中所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

14. 根据权利要求1-7、9-13中任一项所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键连接。

15. 根据权利要求14所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过1至5个二硫键连接。

16. 根据权利要求15所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过2个二硫键连接。

17. 根据权利要求1-7、9-13、15-16中任一项所述的BSAP,其中所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,并且其中所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

18. 根据权利要求1-7、9-13、15-16中任一项所述的BSAP,其中所述接头包含选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸的2至30个氨基酸残基。

19. 根据权利要求1-7、9-13、15-16中任一项所述的BSAP,其中所述接头包含选自SEQ ID NO:20-22、33和41-54的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1-7、9-13、15-16中任一项所述的BSAP,其中所述接头包含6至12个氨基酸残基。

21. 根据权利要求1-7、9-13、15-16中任一项所述的BSAP,其中所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序

列具有至少95%同一性的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

22.根据权利要求21所述的BSAP,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

23.根据权利要求21所述的BSAP,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

24.根据权利要求21所述的BSAP,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

25.根据权利要求21所述的BSAP,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

26.根据权利要求21所述的BSAP,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

27.根据权利要求21所述的BSAP,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

28.一种分离的核酸,其编码根据权利要求1-27中任一项所述的BSAP。

29.根据权利要求28所述的分离的核酸,其包含如SEQ ID NO:29-32、36、60和61中任一项所示的核酸序列。

30.一种载体,其包含根据权利要求28所述的分离的核酸。

31.根据权利要求30所述的载体,其为病毒载体。

32.一种宿主细胞,其包含根据权利要求28所述的分离的核酸。

33.一种宿主细胞,其包含根据权利要求29所述的分离核酸,或根据权利要求30或31所述的载体。

34.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-27中任一项所述的BSAP和药学上可接受的载体。

35.有效量的根据权利要求1-27中任一项所述的BSAP在制备用于在个体中治疗CD19阳性癌症的药物中的用途,其中所述CD19阳性癌症选自急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞白血病(MCL)和B细胞淋巴瘤(BCL)。

36.有效量的根据权利要求34所述的药物组合物在制备用于在个体中治疗CD19阳性癌症的药物中的用途,其中所述CD19阳性癌症选自急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞白血病(MCL)和B细胞淋巴瘤(BCL)。

37.根据权利要求35所述的用途,其中所述药物用于静脉、皮下或瘤内施用。

38.根据权利要求35所述的用途,其中所述个体是人。

39.根据权利要求36所述的用途,其中所述药物用于静脉、皮下或瘤内施用。

40.根据权利要求36或39所述的用途,其中所述个体是人。

41.一种产生BSAP的方法,其包括:

(i)在有效表达编码的BSAP的条件下培养包含根据权利要求29所述的分离的核酸或根据权利要求30或31所述的载体的宿主细胞;以及

(ii)从所述宿主细胞中获得表达的BSAP。

42.根据权利要求41所述的方法,其中步骤(i)进一步包括产生包含所述核酸或所述载

体的宿主细胞。

43. 一种产生BSAP的方法,其包括:

(i) 在有效表达编码的BSAP的条件下培养包含根据权利要求28所述的分离的核酸的宿主细胞;以及

(ii) 从所述宿主细胞中获得表达的BSAP。

44. 一种产生BSAP的方法,其包括:

(i) 在有效表达编码的BSAP的条件下培养包含根据权利要求33所述的宿主细胞;以及

(ii) 从所述宿主细胞中获得表达的BSAP。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中所述步骤(i)进一步包括产生包含所述分离的核酸的宿主细胞。

46. 根据权利要求44所述的方法,其中所述步骤(i)进一步包括产生所述宿主细胞。

双特异性抗原结合蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年9月7日提交的中国专利申请号201811041588.X的优先权权益,将所述专利申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] ASCII文本文件序列表的提交

[0004] 将以下提交的ASCII文本文件的内容通过引用以其整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名称:720622000941SEQLIST.TXT,记录日期:2019年9月3日,大小:52 KB)。

技术领域

[0005] 本发明涉及特异性结合CD3和肿瘤抗原(例如CD19)的双特异性抗原结合蛋白(BSAP)。还提供了包含所述BSAP的药物组合物、使用所述BSAP治疗癌症的方法和包含所述BSAP的试剂盒。

背景技术

[0006] 一些抗原在肿瘤组织中过度表达、被诱变、或被选择性诱变。因此,靶向癌细胞表面上的特异性抗原的抗体可以用作癌症治疗剂。B淋巴细胞抗原CD19也称为CD19分子(分化簇19)、B淋巴细胞表面抗原B4、T细胞表面抗原Leu-12和CVID3。CD19在正常B淋巴细胞和恶性B淋巴细胞中均有表达,并且被认为是B细胞肿瘤相关抗原。它可用作B淋巴细胞发育、淋巴瘤诊断的生物标记物和白血病免疫疗法的靶标。

[0007] CD3是T细胞表达的抗原,包含6条多肽链(一条CD3 δ 链、一条CD3 γ 链、两条CD3 ζ 链和两条CD3 ϵ 链)。CD3 ϵ 、 δ 和 γ 链的跨膜结构域可与T细胞受体(TCR)和CD3 ζ 链相互作用形成TCR复合物,所述TCR复合物具有激活T细胞中的信号传导级联的功能。目前,许多治疗策略使用抗人CD3单克隆抗体靶向TCR信号转导,以治疗疾病。CD3特异性抗体OKT3是首个被批准用于人类治疗用途的单克隆抗体,并且在临床上用作免疫调节剂以治疗同种异体移植排斥。

[0008] 尽管双特异性抗体已显示在有效杀伤癌细胞方面具有潜力,但严重的不良作用(包括全身免疫激活、免疫原性(抗药物抗体作用))以及这些分子普遍较差的可制造性极大地限制了这类药物的广泛应用。例如,CD19 $\times$ CD3双特异性scFv-scFv(单链可变片段)融合蛋白(博纳吐单抗)的一个缺点是这种药物由于其半衰期短且与皮下施用不相容而需要每日静脉(i.v.)施用;然而,在临床试验期间仍然发生了神经反应如定向障碍、意识错乱、言语和语言障碍、震颤或惊厥(Bargou等人Science 321(5891):974-977,2008)。

[0009] 目前形式的双特异性抗体的缺陷使得其以良好的功效和安全性治疗癌症患者的广泛应用仍面临巨大的挑战。因此,在该领域迫切需要开发具有改进的功效、稳定性、安全性和可制造性的新双特异性抗体或治疗方案。

发明内容

[0010] 本发明提供了特异性结合CD3和肿瘤抗原(例如CD19)的双特异性抗原结合蛋白(BSAP,以下也称为“双特异性抗体”)、包含所述BSAP的药物组合物、以及使用所述BSAP治疗癌症的方法。

[0011] 在本发明的一方面,提供了一种BSAP,其包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如人CD19(“huCD19”)或食蟹猴CD19(“cynoCD19”))的抗肿瘤抗原Fab,其中所述抗肿瘤抗原Fab包含:(a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区1(CH1),和(b)Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL);以及ii)特异性识别CD3(例如人CD3(“huCD3”)或食蟹猴CD3(“cynoCD3”))的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VL的N末端。

[0012] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。

[0013] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19(例如huCD19或cynoCD19)。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链高变区1(HVR-H1)、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;其中所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的轻链高变区1(HVR-L1)、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;其中所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;其中所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,其中所述抗CD19 Fab的VL包含与SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,其中所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,其中所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

[0014] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH和VL;其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有

SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0015] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是抗CD3 scFv,其中所述抗CD3 scFv包含通过连接肽连接的VH和VL。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0016] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个二硫键,例如约2个二硫键)连接。

[0017] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,其中所述抗肿瘤抗原Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0018] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述接头和/或所述连接肽包含选自甘氨酸(Gly,G)、丝氨酸(Ser,S)、精氨酸(Arg,R)和丙氨酸(Ala,A)的约2至约30个(如约2至约15个)氨基酸残基。在一些实施方案中,所述接头和/或所述连接肽包含选自SEQ ID NO:20-22、33和41-54的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头包含约6至约12个氨基酸残基。

[0019] 在根据上述任何BSAP的一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,其中所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0020] 还提供了编码上述任何BSAP的分离的核酸、携带所述分离的核酸的表达载体、包含所述表达载体的分离的宿主细胞、以及产生上述任何BSAP的方法,所述方法包括培养所述分离的宿主细胞并从细胞培养物中回收所述BSAP。

[0021] 本文还提供了包含上述任何BSAP的用途、组合物(如药物组合物)、试剂盒和制品。在一些实施方案中,提供了包含任何上述BSAP以及任选的药学上可接受的载体的组合物(如药物组合物)。

[0022] 本文还提供了上述任何BSAP在制备用于治疗癌症的药物中的用途。在一些实施方案中,提供了一种在有需要的个体(例如人)中治疗癌症(例如BCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的任何上述BSAP或其组合物(如药物组合物)。在一些实施方案中,将所述BSAP或所述组合物(如药物组合物)静脉施用。在一些实施方案中,所述个体是

人。在一些实施方案中,所述癌症选自急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞白血病(MCL)和B细胞淋巴瘤(BCL)。

[0023] 从随后的详细描述和所附权利要求中,本发明的这些和其他方面与优点将变得清楚。应理解,本文中所述的各种实施方案的一种、一些或全部特性可以组合以形成本发明的其他实施方案。

[0024] 本文提及的所有出版物、专利、专利申请和公开的专利申请的公开内容都通过引用以其整体特此并入本文。

附图说明

[0025] 图1A描绘了示例性CD19×CD3抗原结合蛋白的结构,其中抗CD3 scFv连接至抗CD19 Fab的VH的N末端。图1B描绘了示例性CD19×CD3抗原结合蛋白的结构,其中抗CD3 scFv连接至抗CD19 Fab的VL的N末端。

[0026] 图2A描绘了示例性CD19×CD3 BSAP (“ITAB2009”)与表达细胞表面抗原CD3的食蟹猴T淋巴细胞和表达细胞表面抗原CD19的食蟹猴B淋巴细胞的结合亲和力。■标记的曲线示出,随着浓度的增加,ITAB2009与食蟹猴B淋巴细胞的结合率增加。●标记的曲线示出,随着浓度的增加,ITAB2009与食蟹猴T淋巴细胞的结合率增加。图2B描绘了示例性CD19×CD3BSAP ITAB2009与表达细胞表面抗原CD3的人T淋巴细胞和表达细胞表面抗原CD19的人B淋巴细胞的结合亲和力。■标记的曲线示出,随着浓度的增加,ITAB2009与人B淋巴细胞的结合率增加。●标记的曲线示出,随着浓度的增加,ITAB2009与人T淋巴细胞的结合率增加。

[0027] 图3A示出CD19×CD3 BSAP ITAB2003、ITAB2005、和ITAB2006介导的食蟹猴PBMC针对自体B细胞的细胞毒性。■标记的曲线示出,随着ITAB2006浓度的增加,食蟹猴PBMC的针对自体B细胞的细胞毒性增加。▲标记的曲线示出,随着ITAB2003浓度的增加,食蟹猴PBMC的针对自体B细胞的细胞毒性增加。□标记的曲线示出,随着ITAB2005浓度的增加,食蟹猴PBMC的针对自体B细胞的细胞毒性增加。○标记的点是采用BSAP的情况下食蟹猴PBMC的阴性对照。图3B示出CD19×CD3 BSAP ITAB2003、ITAB2005、和ITAB2006介导的人PBMC针对自体B细胞的细胞毒性。■标记的曲线示出,随着ITAB2006浓度的增加,人PBMC的针对自体B细胞的细胞毒性增加。▲标记的曲线示出,随着ITAB2003浓度的增加,人PBMC的针对自体B细胞的细胞毒性增加。□标记的曲线示出,随着ITAB2005浓度的增加,人PBMC的针对自体B细胞的细胞毒性增加。○标记的点是采用BSAP的情况下人PBMC的阴性对照。

[0028] 图4示出CD19×CD3 BSAP ITAB2003和ITAB2009介导的人PBMC针对肿瘤细胞Raji的体外细胞毒性。▲标记的曲线示出,随着ITAB2003浓度的增加,人PBMC的针对肿瘤细胞Raji的体外细胞毒性增加。●标记的曲线示出,随着ITAB2009浓度的增加,人PBMC的针对肿瘤细胞Raji的体外细胞毒性增加。

[0029] 图5描绘了在具有用人PBMC重建的免疫系统的免疫缺陷小鼠中不同剂量的CD19×CD3 BSAP ITAB2009对Raji异种移植物的生长抑制作用。○标记的曲线示出,在接种Raji细胞后,媒介物对照组小鼠中的皮下Raji细胞异种移植物的肿瘤体积随时间的变化。■标记的曲线示出,在接种Raji细胞后,ITAB2009 0.5μg/kg治疗组小鼠中的皮下Raji细胞异种移植物的肿瘤体积随时间的变化。▲标记的曲线示出,在接种Raji细胞后,ITAB2009 5μg/kg治疗组小鼠中的皮下Raji细胞异种移植物的肿瘤体积随时间的变化。▼标记的曲线示出,

在接种Raji细胞后, ITAB2009 50 μ g/kg治疗组小鼠中的皮下Raji细胞异种移植物的肿瘤体积随时间的变化。◆标记的曲线示出, 在接种Raji细胞后, 利妥昔单抗10 mg/kg治疗组小鼠中的皮下Raji细胞异种移植物的肿瘤体积随时间的变化。

[0030] 图6示出在Reh细胞接种(D0)后, 用CD19 $\times$ CD3 BSAP ITAB2009或用媒介物对照处理的具有用人原代T细胞重建的免疫系统的Reh白血病异种移植小鼠的卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)存活曲线。○标记的曲线示出, 媒介物对照组中小鼠随时间的存活率。■标记的曲线示出, ITAB2009治疗组中小鼠随时间的存活率。

[0031] 图7示出了在以不同剂量施用了ITAB2009的食蟹猴的血液中CD20+B细胞数量随时间的变化的曲线图。用媒介物缓冲液处理的食蟹猴用作对照。

[0032] 图8A-8D描绘了以不同剂量施用了ITAB2009的食蟹猴中的血清ALT水平(图8A)、血清AST水平(图8B)、血清CK水平(图8C)和血清LDH水平(图8D)随时间的变化。用媒介物缓冲液处理的食蟹猴用作对照。

具体实施方式

[0033] 本发明提供了一种双特异性抗原结合蛋白(BSAP), 其包含特异性识别肿瘤抗原的抗肿瘤抗原Fab(例如CD19, 如huCD19或cynoCD19)和特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv)。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)的重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)的N末端。本发明还提供了BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)用于治疗肿瘤特别是血液恶性肿瘤的用途。

[0034] 目前本领域的抗肿瘤双特异性抗体存在若干缺点, 如可制造性差、聚集、半衰期短、严重的不良作用(如全身免疫激活和免疫原性(抗药物抗体应答))、输注时间长、以及不能保留在肿瘤组织中, 这对这些抗癌双特异性抗体以良好的功效和安全性治疗癌症的广泛应用提出了巨大的挑战。例如博纳吐单抗(BLINCETO[®], 抗CD3/CD19双特异性scFv-scFv)于2014年在美国被批准作为费城染色体阴性复发性或难治性急性成淋巴细胞性白血病(ALL)的二线治疗。然而, 博纳吐单抗由于其半衰期短且与皮下施用不相容而需要每日静脉(i.v.)施用, 然而, 在临床试验期间仍然发生了神经效应如定向障碍、意识错乱、言语和语言障碍、震颤或惊厥(Bargou等人Science 321(5891):974-797, 2008)。

[0035] 在广泛的研究之后, 本申请的发明人意外地发现了一种有效的BSAP形式, 其中抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)。以CD19 $\times$ CD3 BSAP为例, 我们发现本文所述的CD19 $\times$ CD3BSAP与本领域已知的其他双特异性蛋白相比具有若干优点。首先, CD19 $\times$ CD3 BSAP具有增强的针对癌细胞尤其是对低表达CD19的肿瘤如B细胞淋巴瘤(BCL)和ALL的细胞毒性活性。其次, 本发明的BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)与非人灵长类动物(如食蟹猴)具有交叉反应性, 可利于毒理学研究。特别地, 本发明的BSAP具有与人和非人灵长类动物(例如食蟹猴)二者的靶肿瘤抗原(例如CD19)的结合活性, 这可利于将非人灵长类动物(如食蟹猴)中的毒理学研究的结果外推到人类临床研究中。第三, 本文所述的CD3 $\times$ CD19 BSAP具有改进的安全特性和耐受性, 如在非人灵长类动物(如食蟹猴)中证实的。

[0036] 因此, 在一方面, 本发明提供了一种BSAP(例如CD19 $\times$ CD3BSAP), 所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19, 如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19

Fab),其包含:(a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区1(CH1);和(b)Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL);以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab的CH1和CL通过二硫键连接。

[0037] 还提供了包含本文所述的任何BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)的药物组合物和试剂盒,及其用于治疗癌症的方法。

[0038] I.定义

[0039] 除非特别相反地指示,否则本发明的实践将采用本领域的技术范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法,为了说明的目的下文中描述了其中许多方法。此类技术在文献中有充分说明。参见例如Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,纽约,纽约州(2009);Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology,第3版,John Wiley&Sons,1995;Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版,2001);Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982);DNA Cloning:A Practical Approach,卷I&II(D.Glover,编);Oligonucleotide Synthesis(N.Gait,编,1984);Nucleic Acid Hybridization(B.Hames&S.Higgins,编,1985);Transcription and Translation(B.Hames&S.Higgins,编,1984);Animal Cell Culture(R.Freshney,编,1986);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984)和其他类似参考文献。

[0040] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”是指设计用于在临床病理学的进程中改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预。希望的治疗效果包括降低疾病进展速率、改善或缓和疾病状态、以及消退或者预后改进。例如,如果与癌症相关的一种或多种症状减轻或消除,则成功“治疗”个体,包括但不限于减少癌细胞的增殖(或破坏癌细胞)、减少由所述疾病产生的症状、提高患所述疾病的那些个体的生活品质、减少治疗所述疾病所需要的其他药物的剂量和/或延长个体的存活期。

[0041] 如本文所用,“有效量”是指药剂或药物有效治疗受试者的疾病或障碍的量。在癌症的情况下,有效量的药剂可减少癌细胞的数量;减小肿瘤尺寸;抑制(即,在一定程度上减慢并且优选地停止)癌细胞浸润到外周器官中;抑制(即,在一定程度上减慢并且优选地停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。本领域普通技术人员将容易理解,“治疗有效量”可以根据施用途、采用的药物赋形剂以及施用是否与另一种药物或药物组合物结合而变化。

[0042] 如本文所用,“个体”或“受试者”是指哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫、犬、啮齿动物或灵长类动物。在一些实施方案中,所述个体是人。

[0043] 术语“抗体”以最广泛的意义使用并且具体地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多特异性抗体(例如双特异性抗体)以及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性或功能即可。如本文所用,术语“免疫球蛋白”(Ig)和“抗体”可互换使用。

[0044] 术语“天然抗体”、“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用以指代基本上完整形式的抗体,而不是如下文所定义的抗体片段。这些术语特别是指含有Fc区的具有轻链(LC)和重链(HC)的抗体。天然抗体通常是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。每条轻链通过一个共价二硫键连接至重

链,而二硫连接的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间不同。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一端具有可变结构域(V_H),随后是多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L),并且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐,并且VL与VH对齐。认为特定的氨基酸残基在轻链可变结构域与重链可变结构域之间形成界面。

[0045] 术语“恒定结构域”是指相对于免疫球蛋白的其他部分即可变结构域(其含有抗原结合位点),免疫球蛋白分子中的具有更保守氨基酸序列的部分。恒定结构域含有重链的 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 结构域(统称为CH)以及轻链的CL结构域。

[0046] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可以称为“VH”。轻链的可变结构域可以称为“VL”。这些结构域通常是抗体中最可变的并且含有抗原结合位点。

[0047] 术语“可变”是指如下事实:在抗体之间,可变结构域的某些部分在序列上有很大差异,并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不是均匀地分布在抗体的整个可变结构域中。它集中在轻链和重链可变结构域二者中的三个称为高变区(HVR,也称为CDR)的区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,主要采用由三个HVR连接的 β -折叠构型,所述HVR形成连接 β -折叠结构的环并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的HVR通过FR区紧密靠近地保持在一起,并且与来自另一条链的HVR一起有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,贝塞斯达,马里兰州(1991))。虽然恒定结构域并不直接参与抗体与抗原的结合,但是展现出各种效应子功能,如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0048] 来自任何哺乳动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可基于其恒定结构域的氨基酸序列指定为两种明显不同类型(称为卡帕(“ κ ”)和拉姆达(“ λ ”))中的一种。

[0049] 如本文所用,术语IgG“同种型”或“亚类”意指免疫球蛋白的由其恒定区的化学和抗原性特征定义的任何亚类。

[0050] 根据抗体重链的恒定结构域的氨基酸序列,所述抗体(免疫球蛋白)可以指定为不同的类别。存在五个主要免疫球蛋白类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的若干可进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定结构域分别称为 α 、 γ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同免疫球蛋白类别的亚基结构和三维构型是熟知的,并且总体上描述于例如Abbas等人Cellular and Mol.Immunology,第4版(W.B.Saunders,Co.,2000)中。抗体可以是较大融合分子的一部分,所述较大融合分子由抗体与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价缩合形成。

[0051] “抗体片段”或“抗原结合结构域”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。在一些实施方案中,本文所述的抗体片段或抗原结合结构域是抗原结合片段。抗原结合片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段(如单链可变片段,scFv);双抗体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0052] 木瓜蛋白酶消化抗体产生:两个相同的抗原结合片段,称为“抗原结合片段”(Fab),每个包含一个单一的抗原结合位点;以及一个残余的“可结晶区片段”(Fc)片段,其名称反映了其易于结晶的能力。在一些实施方案中,胃蛋白酶处理产生较大的F(ab')₂片

段,一般可以认为是经由二硫键连接的两个Fab,并且仍然能够交联抗原。

[0053] “Fv”是含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一些实施方案中,双链Fv种类由紧密非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以以类似于双链Fv种类中的“二聚体”结构缔合。这两个Fv的折叠构型产生6个HVR(VH的三个HVR和VL的三个HVR),它们相互作用以限定抗原结合位点并促成抗体特异性的抗原结合。然而,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的HVR的一半Fv)也具有识别和结合抗原的能力,但其亲和力低于整个结合位点。

[0054] Fab片段包含完整的轻链(LC)、重链可变区(VH)和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于重链CH1结构域的羧基末端处添加几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基带有游离巯基基团的Fab'的名称。F(ab')₂抗体片段最初是作为Fab'片段对产生的,所述Fab'片段对之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0055] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽还包括VH和VL结构域之间的多肽接头(“连接肽”),其使scFv形成抗原结合所需的结构。有关scFv的综述,参见例如Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer Berlin Heidelberg, 1994. 269-315。

[0056] “Fc”片段包含两个重链的通过二硫键连接在一起的羧基末端部分。抗体的效应子功能是由Fc区的序列决定的,该区也是由某些类型的细胞上发现的Fc受体(FcR)识别的部分。

[0057] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,例如除了可能少量存在的可能突变例如自然发生的突变之外,构成所述群体的单独抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆”指示抗体的特征为:其不是不同抗体的混合物。在一些实施方案中,这种单克隆抗体通常包括包含结合靶标的多肽序列的抗体,其中靶标结合多肽序列是通过包括从多个多肽序列中选择单个靶标结合多肽序列的过程获得。例如选择过程可以从多个克隆(例如杂交瘤克隆库、噬菌体克隆库或重组DNA克隆库)中选择独特克隆。应理解,所选择的靶标结合序列可以进一步改变为例如以提高对靶标的亲和力、使靶标结合序列人源化、提高其在细胞培养中的产量、降低其体内免疫原性、产生多特异性抗体等,并且包含改变的靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。单克隆抗体制剂除了它们的特异性之外,优点还在于它们通常不被其他免疫球蛋白污染。

[0058] 修饰语“单克隆”指示抗体的特征为:其是从基本上同质的抗体群体获得,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过各种技术制备,所述技术包括例如杂交瘤方法(例如Kohler和Milstein, *Nature* 256:495-97 (1975); Hongo等人, *Hybridoma* 14(3):253-260 (1995), Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988); Hammerling等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), 重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567), 噬菌体展示技术(参见例如

Clackson等人, *Nature* 352:624-628(1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1992); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310(2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472(2004); 以及Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004)), 以及在具有编码人免疫球蛋白序列的部分或全部人免疫球蛋白基因座或基因的动物中产生人抗体或人样抗体的技术(参见例如W01998/24893; W0 1996/34096; W0 1996/33735; W0 1991/10741; Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551(1993); Jakobovits等人, *Nature* 362:255-258(1993); Bruggemann等人, *Year in Immunol.* 7:33(1993); 美国专利号5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和5,661,016; Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783(1992); Lonberg等人, *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-813(1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnol.* 14:845-851(1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826(1996); 以及Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995))。

[0059] 本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体, 其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 而所述重链和/或轻链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一种抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源, 只要它们展现出所需的生物学活性即可(参见例如美国专利号4,816,567; 以及Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体包括**PRIMATTZED®**抗体, 其中抗体的抗原结合区源自通过例如用目的抗原免疫猕猴所产生的抗体。

[0060] 非人(例如, 鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施方案中, 人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体), 其中来自受体的HVR(下文定义)的残基被来自如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的非人物种(供体抗体)的HVR的具有所需特异性、亲和力和/或能力的残基替代。在一些情况下, 人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基替代。此外, 人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。可以进行这些修饰以进一步完善抗体性能。通常, 人源化抗体将包含基本上所有如下项: 至少一个(通常两个)可变结构域, 其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的那些高变环, 且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体任选地也将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分, 通常是人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。关于进一步的细节, 参见例如Jones等人, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-329(1988); 以及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。还参见例如Vaswani和Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma&Immunol.* 1:105-115(1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038(1995); Hurle和Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433(1994); 和美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0061] “人抗体”是这样的抗体, 其具有与由人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列, 和/或已经使用如本文公开的任何用于制备人抗体的技术来制备。人抗体的这种定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术产生, 所述技术包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581(1991))。描述在Cole等人, *Monoclonal Antibodies and*

Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77(1985); Boerner等人, J. Immunol. 147(1):86-95(1991) 中的方法也可用于制备人单克隆抗体。还参见 van Dijk 和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001)。人抗体可以通过将抗原施用给已经过修饰以响应于抗原激发产生此类抗体但是其内源性基因座被禁用的转基因动物来制备, 所述转基因动物例如经免疫的异种小鼠(关于 XENOMOUSE™ 技术参见例如美国专利号 6,075,181 和 6,150,584)。关于通过人 B 细胞杂交瘤技术产生的人抗体还参见例如 Li 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562(2006)。

[0062] 当在本文中使用时,术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指抗体可变结构域的区域,其在序列上是高变的和/或形成结构上确定的环。通常,抗体包含六个 HVR:三个在 VH 中(H1、H2、H3),并且三个在 VL 中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3 和 L3 显示出六个 HVR 的最多的多样性,并且据信 H3 在将良好的特异性赋予给抗体方面尤其发挥独特的作用。参见例如 Xu 等人, Immunity 13:37-45(2000); Johnson 和 Wu, Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo, 编, Human Press, 托托瓦, 新泽西州, 2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在的骆驼科动物抗体在不存在轻链时是有功能的且稳定的。参见例如 Hamers-Casterman 等人, Nature 363:446-448(1993); Sheriff 等人, Nature Struct. Biol. 3:733-736(1996)。

[0063] 免疫球蛋白可变区的结构和位置可以通过参考 Kabat, E. A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第4版. US Department of Health and Human Services. 1987 及其更新版(现在可在因特网上(im muno.bme.nwu.edu)获得)来确定。

[0064] “框架”或“FR”残基是除如本文定义的 HVR 残基之外的那些可变结构域残基。

[0065] 如本文所用,术语“共价连接”是指通过一个或多个化学键的直接连接或通过一个或多个接头的间接连接。可以使用任何合适的化学键来产生直接连接,包括但不限于共价键如肽键和二硫键,或非共价键如氢键、疏水键、离子键或范德华键。

[0066] 如本文所用,“共价键”是指在共享一个或多个电子的两个原子之间的稳定键。共价键的例子包括但不限于肽键和二硫键。如本文所用,“肽键”是指氨基酸的羧基与相邻氨基酸的胺基之间形成的共价键。如本文所用,“二硫键”是指在两个硫原子之间形成的共价键。二硫键可由两个硫醇基团的氧化形成。在一些实施方案中,共价连接直接通过共价键连接。在一些实施方案中,共价连接直接通过肽键或二硫键连接。

[0067] 如本文所用,“二硫键”是指重链片段 CH1 和轻链片段 CL 通过一个或多个二硫键的组合。可以通过连接两个片段中的硫醇基团,在两个片段之间形成一个或多个二硫键。在一些实施方案中,可以分别在重链片段和轻链片段的一个或多个半胱氨酸之间形成一个或多个二硫键。

[0068] 如本文所用,术语“结合”、“特异性结合”、“特异性识别”或“对……具有特异性”是指可测量且可再现的相互作用,如靶标与抗体之间的结合,其决定在包括生物分子在内的异质分子群体存在时靶标的存在。例如,结合或特异性结合靶标(其可以是表位)的抗体是以比它结合其他靶标更大的亲和力、更大的亲合力、更容易、和/或更长的持续时间结合此靶标的抗体。在一个实施方案中,抗体与不相关靶标的结合程度为抗体与靶标结合的小于约 10%,如例如通过放射免疫测定(RIA)测量的。在一些实施方案中,特异性结合靶标的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 或 $\leq 0.1\text{ nM}$ 的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,抗体特异性结合蛋白质上的表位,所述表位在来自不同物种的所述蛋白质中是保守的。在

另一个实施方案中,特异性结合可以包括但不需要专一结合。

[0069] 如本文所用,关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”定义为在用以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分而比对序列和引入缺口(如果需要)后,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可按本领域技术范围内的各种方式来实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0070] 氨基酸取代可以包括但不限于将多肽中的一种氨基酸用另一种氨基酸替代。示例性取代示于表A中。可以将氨基酸取代引入到目的抗体中并针对所需活性筛选产物,所述所需活性例如保留/改进的抗原结合、降低的免疫原性、或改进的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0071] 表A

[0072]	原始残基	示例性取代
	Ala(A)	Val; Leu; Ile
	Arg(R)	Lys; Gln; Asn
	Asn(N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg
	Asp(D)	Glu; Asn
	Cys(C)	Ser; Ala
	Gln(Q)	Asn; Glu
	Glu(E)	Asp; Gln
	Gly(G)	Ala
	His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg
	Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
	Leu(L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
	Lys(K)	Arg; Gln; Asn
	Met(M)	Leu; Phe; Ile
	Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr

[0073]	原始残基	示例性取代
	Pro(P)	Ala
	Ser(S)	Thr
	Thr(T)	Val; Ser
	Trp(W)	Tyr; Phe
	Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
	Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0074] 氨基酸可以根据常见的侧链特性分组:(1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。非保守取代将需要将这些类别之一的成员交换为另一类别。

[0075] 如本文所用,“双特异性抗原结合蛋白”是指包含抗肿瘤抗原Fab的蛋白质,所述抗

肿瘤抗原Fab特异性结合至与特异性结合CD3的抗CD3结合结构域(例如scFv)共价连接的肿瘤抗原,其中所述抗肿瘤抗原Fab具有不同的特征。所述特征可以是生物学特征,如体外或体内活性。所述特征也可以是简单的化学或物理特性,如与靶分子的结合、催化反应等抗肿瘤抗原Fab和抗CD3结合结构域(例如scFv)可以通过单个肽键直接连接或者经由肽接头连接,但以框内方式彼此连接。

[0076] 如与抗体或抗原结合蛋白(如双特异性抗原结合蛋白,BSAP)结合使用的术语“双特异性”是指抗体或抗原结合蛋白能够特异性结合一个生物分子上的两个不同表位,或者能够特异性结合两个不同生物分子上的表位。除非另有说明,否则双特异性抗体或BSAP名称中列出的双特异性抗体或BSAP结合的抗原的顺序是任意的。即,术语“抗CD3/CD19”、“抗CD19/CD3”、“CD19×CD3”和“CD3×CD19”可互换使用,以指代特异性结合CD3和CD19二者的双特异性抗体(如BSAP)。

[0077] 术语“双特异性抗原结合蛋白”、“双特异性抗体”和“BSAP”可互换使用,以指代具有两种表位特异性的抗原结合蛋白。

[0078] 如本文所用,多肽的“C末端”是指多肽的最后一个氨基酸残基,所述氨基酸残基贡献其胺基以与其相邻氨基酸残基的羧基形成肽键。如本文所用,多肽的“N末端”是指多肽的第一个氨基酸,所述氨基酸贡献其羧基以与其相邻氨基酸残基的胺基形成肽键。

[0079] 如本文所用,术语“载体”是指能传播其所连接的另一核酸分子的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够引导与它们操作性连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0080] 术语“细胞”包括原代受试者细胞及其后代。

[0081] 术语“细胞因子风暴”,也称为“细胞因子级联”或“高细胞因子血症(hypercytokinemia)”,是一种潜在的致命免疫反应,其通常由细胞因子与免疫细胞之间的正反馈环路组成,其中各种细胞因子(例如INF- γ 、IL-10、IL-6、CCL2等)的水平高度升高。

[0082] 应理解,本文所述的本发明的实施方案包括“由实施方案组成”和/或“基本上由实施方案组成”。

[0083] 本文中对“约”某个值或参数的提及包括(并描述)涉及该值或参数本身的变化。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0084] 如本文所用,对“并非”某个值或参数的提及通常意指并描述“除了某个值或参数以外”。例如,所述方法不用于治疗X型的癌症,意指所述方法用于治疗除了X型以外的类型的癌症。

[0085] 本文使用的术语“约X-Y”具有与“约X至约Y”相同的含义。

[0086] 如本文和所附权利要求中所用,单数形式“一个/一种”、“或”和“所述”包括复数指代物,除非上下文另有明确规定。

[0087] II. 双特异性抗原结合蛋白(BSAP)

[0088] 本发明提供了一种BSAP,其包含特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的Fab(以下称为“抗肿瘤抗原Fab”,如“抗CD19 Fab”)和特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv)(以下称为“抗CD3结合结构域”,如“抗CD3 scFv”),其中所述抗肿瘤抗原Fab包含免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区1(CH1)以及Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL)。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原

Fab的CH1和CL通过二硫键连接。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)和抗CD3结合结构域(例如scFv)直接连接。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)和抗CD3结合结构域(例如scFv)通过接头连接。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)的VH和/或VL的N末端。在一些实施方案中,BSAP包含两个抗CD3结合结构域(例如scFv),其中第一抗CD3结合结构域连接至抗肿瘤抗原Fab的VH的N末端;并且其中第二抗CD3结合结构域连接至抗肿瘤抗原Fab的VL的N末端。图1A和1B展示了本文所述的BSAP的示例性构型。在一些实施方案中,BSAP包含特异性识别CD19的抗CD19 Fab和特异性识别CD3的抗CD3结合结构域(例如scFv),以下称为“CD19×CD3 BSAP”。

[0089] 本发明的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)具有显著的优点,包括但不限于:1)证实增强的癌细胞杀伤功效;2)本发明的BSAP(例如×CD3BSAP)在动物模型中证实对B细胞淋巴瘤和急性成淋巴细胞性白血病(ALL)的优越体内治疗作用;3)与如食蟹猴等非人灵长类动物具有交叉反应性,这可有助于对非人灵长类动物(例如食蟹猴)进行毒理学研究;4)改善安全性特征和耐受性。

[0090] 因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19Fab)的VH的N末端。因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至抗肿瘤抗原Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VL的N末端。因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和第一抗CD3结合结构域直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗肿瘤抗原Fab和第二抗CD3结合结构域直接或经由任选的第二接头连接;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在

一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19。因此,在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab是特异性识别CD19的抗CD19 Fab。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3ε(例如huCD3ε或cynoCD3ε)的N末端,例如CD3ε的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv(“抗CD3 scFv”),其中抗scFv包含任选地由连接肽连接的VH和VL。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,位于所述抗肿瘤抗原Fab与所述抗CD3结合结构域之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽选自SEQ ID NO:20-22、33和41-54,例如选自SEQ ID NO:21、22、33和53中任一个的氨基酸序列。

[0091] 在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0092] 因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3结合结构

域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗肿瘤抗原Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且抗肿瘤抗原Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中每个所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 、cynoCD3 ϵ)的N末端,例如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19。在一些实施方案中,位于所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基

的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0093] 在一些实施方案中,特异性结合(或特异性识别)CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域是scFv。

[0094] 因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3scFv直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3 scFv经由任选的接头连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗肿瘤抗原Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原CD19。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性结合CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,位于所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0095] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的

氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且抗肿瘤抗原Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中每个所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 、cynoCD3 ϵ)的N末端,例如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19。在一些实施方案中,位于所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,所述接

头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0096] 在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19。因此,在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab是特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab。

[0097] 因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且其中所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 、cynoCD3 ϵ)的N末端,例如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0098] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序

列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且抗CD19Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中每个所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 、cynoCD3 ϵ)的N末端,例如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实

施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0099] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3 scFv经由任选的接头连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性结合CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0100] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述

BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且抗CD19 Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中每个所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个抗CD3scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 、cynoCD3 ϵ) 的N末端,例如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0101] 在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID

N0:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID N0:6的氨基酸序列的HVR-L3。

[0102] 因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID N0:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID N0:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID N0:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID N0:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID N0:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID N0:6的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID N0:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID N0:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID N0:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID N0:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID N0:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID N0:6的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域直接或经由任选的第一接头连接,并且抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID N0:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID N0:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID N0:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID N0:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID N0:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID N0:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID N0:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,例如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列。在一些实施

方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0103] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列

的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中每个所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 、cynoCD3 ϵ)的N末端,例如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0104] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或

经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-

L3;其中每个所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0105] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;并且其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19

[0106] Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv包

含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗CD19

[0107] Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0108] 在一些实施方案中,提供了包含第一多肽和第二多肽的CD19 $\times$ CD3 BSAP,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,和/或所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了CD19 $\times$ CD3 BSAP,其包含:含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了CD19 $\times$ CD3 BSAP,其包含:含有SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了CD19 $\times$ CD3 BSAP,其包含:含有SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽。

[0109] 在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3。

[0110] 因此,在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:

含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv),其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3

scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0111] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含

有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中每个所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0112] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的

HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3 scFv连

接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0113] 在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;并且其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19

[0114] Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种BSAP,所述BSAP包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二

抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;其中每个所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或每个所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。

[0115] 在一些实施方案中,提供了包含第一多肽和第二多肽的CD19 $\times$ CD3 BSAP,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,和/或所述第二多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了CD19 $\times$ CD3 BSAP,其包含:含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了CD19 $\times$ CD3 BSAP,其包含:含有SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了CD19 $\times$ CD3 BSAP,其包含:含有SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的第二多肽。

[0116] 本发明还提供了包含本文所述的任何CD19 $\times$ CD3 BSAP的融合蛋白、CD19 $\times$ CD3 BSAP缀合物(例如小分子药物缀合物)、或表达本文所述的任何CD19 $\times$ CD3 BSAP的分离的细胞。

[0117] 抗CD3结合结构域

[0118] 本发明的BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)包含一个或两个特异性识别CD3(例如人CD3或食蟹猴CD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv)。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至抗肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至抗肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,BSAP包含两个抗CD3结合结构域(例如scFv),第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)Fab的VH的N末端,并且第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)Fab的VL的N末端。

[0119] 在一些实施方案中,本文所述的BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)与单独的抗肿瘤抗原

Fab相比具有增加的体内半衰期。在一些实施方案中,BSAP的半衰期为单独抗肿瘤抗原Fab的半衰期的至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍。

[0120] “CD3”在本领域中已知为具有六条链的多蛋白复合物(参见Abbas和Lichtman, 2003; Janeway等人, 第172和178页, 1999)。在哺乳动物中, T细胞受体(TCR)复合物包含一条CD3 δ 链、一条CD3 γ 链、两条CD3 ϵ 链、以及CD3 ζ 链的同二聚体。CD3 δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 链是免疫球蛋白超家族的含有单个免疫球蛋白结构域的高度相关细胞表面蛋白。CD3 δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 链的跨膜区带负电, 这是使得这些链与带正电的TCR链缔合的一种特征。CD3 δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 链的细胞内尾各自含有单个称为免疫受体酪氨酸激活基序或“ITAM”的保守基序, 而每条CD3 ζ 链具有三个所述保守基序。不受理论束缚, 认为ITAM对TCR复合物的信号传导能力是重要的。如本文所用, CD3可以来自各种动物物种, 包括人、灵长类动物、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。在一些实施方案中, CD3是人CD3 (“huCD3”)。在一些实施方案中, CD3是食蟹猴CD3 (“cynoCD3”)。

[0121] 在一些实施方案中, 所述BSAP的抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别单独的CD3链, 如CD3 δ 链、CD3 γ 链或CD3 ϵ 链。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性结合至由两个或更多个单独的CD3链形成的复合物(例如具有多于一条CD3 ϵ 链的复合物、具有CD3 γ 和CD3 ϵ 链的复合物、具有CD3 δ 和CD3 ϵ 链的复合物、或其他CD3链组合)。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性结合至CD3 ϵ 链(例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性结合至CD3 ϵ 的N末端。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性结合至CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。

[0122] 在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性结合至人和/或非人灵长类动物(如食蟹猴)CD3。对猴CD3具有交叉反应性的示例性抗人CD3抗体包括但不限于SP34小鼠单克隆抗体(参见例如Pressano, S. The EMBO J. 4:337-344, 1985; Alarcon, B. EMBO J. 10:903-912, 1991; Salmeron A. 等人, J. Immunol. 147:3047-52, 1991; Yoshino N. 等人, Exp. Anim 49:97-110, 2000; Conrad M L. 等人, Cytometry 71A:925-33, 2007; 和Yang等人, J. Immunol. 137:1097-1100:1986)。具有与猴CD3(如食蟹猴)有交叉反应性的抗CD3结合结构域(例如scFv)的BSAP可有助于在非人灵长类动物中进行毒性研究, 这可以为人类临床试验候选者提供更相关的安全性评估, 而不必在黑猩猩中进行毒性研究或使用替代分子。

[0123] 在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域(例如scFv)源自对非人灵长类动物不具有交叉反应性的抗CD3抗体。示例性抗CD3抗体包括Cris-7单克隆抗体(Reinherz, E.L. 等人(编), Leukocyte typing II, Springer Verlag, 纽约, (1986))、BC3单克隆抗体(Anasetti等人(1990) J. Exp. Med. 172:1691)、OKT3(Ortho multicenter Transplant Study Group(1985) N. Engl. J. Med. 313:337)及其衍生物(如OKT3 ala-ala(Herold等人(2003) J. Clin. Invest. 11:409))、威司利珠单抗(Carpenter等人(2002) Blood 99:2712)、和145-2C11单克隆抗体(Hirsch等人(1988) J. Immunol. 140:3766)。本文设想的另外的CD3结合分子包括UCHT-1(Beverley, P C和Callard, R.E. (1981) Eur. J. Immunol. 11:329-334)和W02004/106380、W02010/037838、W02008/119567、W02007/042261或W02010/0150918中描述的CD3结合分子。

[0124] 在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)是抗原结合片段,并且可以源自任何合适的抗CD3抗体。任何形式的抗原结合片段均可用于本发明。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域可选自:scFv、scFv-scFv、Fv、免疫球蛋白(Ig)VL结构域、Ig VH结构域、Ig VL结构域和VH结构域、Fab、Fab'、(Fab')₂、小分子抗体(微型抗体)、双功能抗体(双抗体)、骆驼科动物抗体VHH(骆驼科动物VHH)、dAb(结构域抗体)(如单结构域抗体(sdAb))、锚蛋白重复序列、和源自其他蛋白质支架的其他基因特异性结合结构域。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗原结合片段是人源化的。在一些实施方案中,所述抗原结合片段是嵌合的。在一些实施方案中,所述抗原结合片段源自小鼠、大鼠、猴或兔的单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗原结合片段源自完全人抗体,例如使用噬菌体展示、酵母展示或携带人Ig基因的转基因小鼠开发。

[0125] 在一些实施方案中,本发明的抗CD3结合结构域(例如scFv)以如下平衡结合常数(Kd)结合CD3: $\leq 1\mu\text{M}$, 如 $\leq 100\text{ nM}$, 优选 $\leq 10\text{ nM}$, 更优选 $\leq 1\text{ nM}$ 。例如,抗CD3结合结构域(例如scFv)的Kd值的范围为约 $\leq 1\text{ nM}$ 至约 1 pM 。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)以如下Kd结合人CD3: 约 $1 \times 10^{-9}\text{ M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{ M}$, 如 $2.35 \times 10^{-8}\text{ M}$ 。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)以如下Kd结合猴(例如食蟹猴)CD3: 约 $1 \times 10^{-9}\text{ M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{ M}$, 如 $1.29 \times 10^{-8}\text{ M}$ 。

[0126] 在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)是包含VH和VL的抗原结合片段。本领域已知的任何抗CD3抗体的VH和/或VL可用作本文所述的抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH和/或VL。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)包含特异性结合CD3的全长抗体的VH和VL的1、2、3、4、5个或全部6个HVR。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,所述VH包含一个、两个或三个来自SEQ ID NO:15的HVR,和/或抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,所述VL包含一个、两个或三个来自SEQ ID NO:16的HVR。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,所述VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约85%(如至少约86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少约85%(如至少约86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VH包含三个来自SEQ ID NO:15的HVR,其中不同于SEQ ID NO:15的氨基酸残基位于框架区(FR)中;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含三个来自SEQ ID NO:16的HVR,其中不同于SEQ ID NO:16的氨基酸残基位于FR中。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID

N0:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID N0:16的氨基酸序列。

[0127] SEQ ID N0:9(抗CD3 HVR-H1)

[0128] TYAMN

[0129] SEQ ID N0:10(抗CD3 HVR-H2)

[0130] RIRSKYNNYATYYADSVKD

[0131] SEQ ID N0:11(抗CD3 HVR-H3)

[0132] HGNFGNSYVSWFAY

[0133] SEQ ID N0:12(抗CD3 HVR-L1)

[0134] RSSTGAVTTSNYAN

[0135] SEQ ID N0:13(抗CD3 HVR-L2)

[0136] GTNKRAP

[0137] SEQ ID N0:14(抗CD3 HVR-L3)

[0138] ALWYSNLWV

[0139] SEQ ID N0:15(抗CD3 VH;加下划线的序列分别为HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)

[0140] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGMVTVSS

[0141] SEQ ID N0:16(抗CD3 VL;加下划线的序列分别为HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3)

[0142] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL
LGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0143] 在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是特异性结合CD3的scFv(本文也称为抗CD3 scFv)。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL经由连接肽(如包含甘氨酸和/或丝氨酸的柔性连接肽)彼此连接。下文“接头”章节中描述的任何肽接头可用作抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL直接彼此连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv是融合多肽,其包含构型:N'-VH-VL-C',其中L是任选的连接肽。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv是融合多肽,其包含构型:N'-VL-VH-C',其中L是任选的连接肽。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列。

[0144] SEQ ID N0:17(抗CD3 scFv;VH-L-VL,连接肽L序列呈加粗斜体)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGMVTVSS**GGGGSGGGGS**QAVVT
[0145] QEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPGTPARFSGSLLGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT
KLTVL

[0146] 抗肿瘤抗原Fab

[0147] 本文所述的BSAP内的抗肿瘤抗原Fab可特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)。

[0148] 在一些实施方案中,本文所述的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)与单独的抗CD3结合结构域(例如scFv)相比具有增加的体内半衰期。在一些实施方案中,BSAP的半衰期为单独抗CD3结合结构域(例如scFv)的半衰期的至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍。

[0149] 在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab特异性结合人和/或非人灵长类动物(如食蟹猴)肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)。本文所述的包含具有对猴(如食蟹猴)肿瘤抗原(例如CD19)的交叉反应性的抗肿瘤抗原Fab(例如抗CD19 Fab)的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)可有助于在非人灵长类动物中进行毒性研究,这可以为人类临床试验候选者提供更相关的安全性评估,而不必在黑猩猩中进行毒性研究或使用替代分子。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab源自对非人灵长类动物不具有交叉反应性的抗体。

[0150] 本文所述的抗肿瘤抗原Fab可以使用本领域已知的各种方法产生(参见例如美国专利号6,291,161;6,291,158)。Fab的来源包括来自各种物种的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述物种包括人、骆驼科动物(来自骆驼、单峰骆驼或美洲驼;Hamers-Casterman等人(1993) *Nature*, 363:446以及Nguyen等人(1998) *J. Mol. Biol.*, 275:413)、鲨鱼(Roux等人(1998) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 95:11804)、鱼(Nguyen等人(2002) *Immunogenetics*, 54:39)、啮齿动物、鸟类或羊。在一些实施方案中,Fab片段源自人抗体或人源化抗体。

[0151] 在一些实施方案中,抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab片段包含免疫球蛋白重链(HC)的一个恒定区(CH1)和一个可变区(VH)以及免疫球蛋白轻链(LC)的一个恒定区(CL)和一个可变区(VL)。在一些实施方案中,CH1和VH与VL和CL异二聚化,并通过重链恒定区与轻链恒定区之间的二硫键共价连接。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab具有基本结构NH₂-VL-CL-S-S-CH1-VH-NH₂(-S-S-是CL与CH1之间的二硫键)。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab的CH1和CL通过一个或多个二硫键连接。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab的CH1和CL通过至少一个二硫键(如至少约2、3、4、5个或更多个中的任一个)二硫键连接。在一些实施方案中,二硫键的数量为约2。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab内(例如CH1或CL内)的半胱氨酸残基被工程化以引入二硫键。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab的CH1和CL的C末端包含CPPC(SEQ ID NO:55)或CPPCS(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列,其可用作共价结合区以形成一个或多个分子间二硫键。

[0152] 在一些实施方案中,BSAP的抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab不包含二硫键。例如重链和轻链可以以如下方式工程化:使得在不需要二硫键的情况下稳定地相互作用。在一些实施方案中,重链或轻链可以被工程化为去除半胱氨酸残基,并且其中重链和轻链仍然稳定地相互作用并起Fab的作用。在一些实施方案中,进行突变以促进重链与轻链之间的稳定相互作用。例如,可以使用“杵臼结构”工程化策略促进Fab的重链与轻链之间的二聚化(参见例如1996 *Protein Engineering*, 9:617-621)。本文还考虑使用被设计用于特定目的的变体Fab片段,例如改变CH1和/或CL的恒定结构域中的氨基酸,以及去除二硫键或添加标签以便纯化等。

[0153] 在一些实施方案中,抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的CH1和/或CL的C末端可以与另外的融合蛋白连接。例如,在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab的CH1的C末端经由任选的接头连接至Fc单体(CH2-CH3)的N末端,以形成N'-VH-CH1-CH2-CH3-C'和N'-VL-CL-C'的双链结构。

[0154] 在一些实施方案中,抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab内的可变区和恒定区的构型可能

不同于在天然Fab中发现的。在一些实施方案中,可变区和恒定区的取向在一条链中可以是VH-CL,而在另一条链中可以是VL-CH1(参见例如Shaefer等人(2011),PNAS,108:111870-92)。

[0155] 在一些实施方案中,BSAP内的抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab源自单克隆抗体。合适的单克隆抗体可以是任何类型的,包括IgA、IgM、IgD、IgG、IgE及其亚型,如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一些实施方案中,轻链结构域可源自 κ 或 λ 链。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab是以重组方式设计的。

[0156] 在一些实施方案中,抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab包含人免疫球蛋白CH1。在一些实施方案中,人免疫球蛋白CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab包含人轻链 κ 恒定区。在一个实施方案中,人轻链 κ 恒定区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab包含人轻链 λ 恒定区。

[0157] SEQ ID NO:18(人CH1)

[0158] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

[0159] HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK

[0160] SSEQ ID NO:19(人 κ CL)

[0161] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

[0162] NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK

[0163] SFNRGE

[0164] 在一些实施方案中,抗肿瘤抗原Fab特异性识别肿瘤抗原。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是B细胞表面抗原,包括但不限于CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40或CD74等。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19,并且所述抗肿瘤抗原Fab是抗CD19 Fab。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab可特异性识别与癌症疗法相关的其他细胞表面抗原,包括但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、NKG2D、CD25、CD28、CD137、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、EGFR、Her2/neu、或ErbB3。

[0165] 在一些实施方案中,本文所述的抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab以如下平衡结合常数(Kd)结合肿瘤抗原: $\leq 1\mu\text{M}$,如 $\leq 100\text{ nM}$,优选 $\leq 10\text{ nM}$,更优选 $\leq 1\text{ nM}$ 。例如,本文所述的抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab具有从约 $\leq 1\text{ nM}$ 至约 1 pM 的Kd值。在一些实施方案中,抗CD19 Fab以如下Kd结合人CD19:约 $1 \times 10^{-9}\text{ M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{ M}$,如 $1.82 \times 10^{-8}\text{ M}$ 。在一些实施方案中,抗CD19 Fab以如下Kd结合猴(例如食蟹猴)CD19:约 $1 \times 10^{-9}\text{ M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{ M}$,如 $2.96 \times 10^{-8}\text{ M}$ 。

[0166] 本发明的抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab可以完全或部分地调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或以其他方式干扰广泛分布的肿瘤抗原(例如CD19)的功能活性。当与未被抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab结合时相比,在存在抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的情况下,肿瘤抗原(例如CD19)的功能活性降低至少约95%(如约96%、97%、98%、99%或100%中的任一个)时,认为抗肿瘤抗原Fab能够完全调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰肿瘤抗原的功能活性。当与未被抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab结合时相比,在存在抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的情况下,肿瘤抗原(例如CD19)的功能活性降低至少约50%(如约55%、60%、75%、80%、85%或90%中的任一个)时,认为抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab能够显著调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰肿瘤抗原(例如CD19)的功能活性。当与未被抗肿瘤抗原(例如CD19)

Fab结合时相比,在存在抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的情况下,肿瘤抗原(例如CD19)的功能活性降低少于约95%(如降低约10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%、或90%中的任一个)时,认为抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab能够部分地调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰肿瘤抗原(例如CD19)的功能活性。

[0167] 在一些实施方案中,本文所述的抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab包含特定序列或这些序列的某些变体。在一些实施方案中,变体序列中的氨基酸取代并不大幅降低抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与相应肿瘤抗原(例如CD19)结合的能力。还考虑了大幅改善抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与相应肿瘤抗原(例如CD19)的结合亲和力或其他特性的修饰,所述其他特性如特异性、免疫原性、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)、和/或与肿瘤抗原(例如CD19)变体的交叉反应性。

[0168] B淋巴细胞抗原CD19也称为CD19分子(分化簇19)、B淋巴细胞表面抗原B4、T细胞表面抗原Leu-12和CVID3。在人类中,CD19在除浆细胞外的所有B系细胞中和滤泡树突细胞中均有表达。CD19有两个主要作用:1)充当衔接蛋白将细胞质信号传导蛋白募集到细胞膜;以及2)在CD19/CD21复合物内起作用以降低B细胞受体信号传导通路的阈值。CD19在正常B淋巴细胞和恶性B淋巴细胞中均有表达,并且被认为是B细胞肿瘤相关抗原。例如,CD19可以充当B淋巴细胞发育的生物标记物,癌症诊断标记物,或如针对B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)的免疫疗法的靶标。B淋巴细胞抗原CD19也称为CD19分子(分化簇19)、B淋巴细胞表面抗原B4、T细胞表面抗原Leu-12和CVID3。在人类中,除浆细胞和滤泡树突细胞外,CD19在所有B系细胞中均有表达。CD19在人B细胞中发挥两个主要作用:1)充当衔接蛋白将细胞质信号传导蛋白募集到细胞膜;以及2)在CD19/CD21复合物内起作用以降低B细胞受体信号传导通路的阈值。由于CD19存在于所有B细胞中,它可以充当B淋巴细胞发育或淋巴瘤诊断的生物标记物,并且可以充当白血病免疫疗法的靶标。CD19在正常B淋巴细胞和恶性B淋巴细胞中均有表达,并且被认为是B细胞肿瘤相关抗原,例如是B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)的生物标记物。

[0169] 在一些实施方案中,抗CD19 Fab特异性结合存在于细胞表面上的CD19。在一些实施方案中,所述细胞是癌细胞。在一些实施方案中,所述癌细胞是在实体瘤中。在一些实施方案中,所述癌细胞是转移性癌细胞,如血液癌症,例如ALL、CLL、MCL、B细胞淋巴瘤等。

[0170] 在一些实施方案中,BSAP的抗肿瘤抗原Fab经由在抗肿瘤抗原Fab(即抗CD19 Fab)的VH与VL之间形成的抗原结合位点特异性结合CD19。所述抗原结合位点包含免疫球蛋白重链的至少一个(如1、2或3个)HVR和/或免疫球蛋白轻链的至少一个(如1、2或3个)HVR。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab包含特异结合CD19的全长抗体的VH和VL序列的1、2、3、4、5个或全部6个HVR。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab源自抗CD19单克隆抗体,例如B43、MEDI-551、CLB-CD19、4G7、SJ25-C1LT19、Leu-12、HD37或其他已知的抗人CD19单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗CD19Fab的1、2、3、4、5个或全部6个HVR源自已知的抗CD19单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH和/或VL源自已知的抗CD19单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab包含VH,其中所述VH包含一个、两个或三个来自SEQ ID NO:7的HVR,和/或所述抗CD19 Fab包含VL,其中所述VL包含一个、两个或三个来自SEQ ID NO:8或40的HVR。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab包含VH,所述VH包含三个来自SEQ ID

NO:7的HVR,和/或所述抗CD19 Fab包含VL,所述VL包含三个来自SEQ ID NO:8或40的HVR。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab包含VH,所述VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab包含VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab包含VH,所述VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab包含VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab包含VH,所述VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab包含VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19Fab的VH包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少约85% (如至少约86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含与SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列至少约85% (如至少约86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含与SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含三个来自SEQ ID NO:7的HVR,其中不同于SEQ ID NO:7的氨基酸残基位于框架区 (FR) 中;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含三个来自SEQ ID NO:8或40的HVR,其中不同于SEQ ID NO:8或40的氨基酸残基位于FR中。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且所述抗CD19Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

[0171] SEQ ID NO:7 (抗CD19 VH; 加下划线的序列分别为HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)

[0172] QVQLVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRAT
LTSDKSSSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGT^{TV}VSS

[0173] 抗CD19 HVR-H1:SYVMH (SEQ ID NO:1)

[0174] 抗CD19 HVR-H2:WIGYINPYNDGTY (SEQ ID NO:2)

[0175] 抗CD19 HVR-H3:GTYYYGSRVFDY (SEQ ID NO:3)

[0176] SEQ ID NO:8 (抗CD19 VL1.2; 加下划线的序列分别为HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3)

[0177] DVVMTQSPSSIPVTLGESVSISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQRRPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSG
SGSGTDFTLRISGVEPEDVGVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

[0178] 抗CD19 VL1.2 HVR-L1:RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4)

[0179] 抗CD19 VL1.2 HVR-L2:RMSNLNS (SEQ ID NO:5)

[0180] 抗CD19 VL1.2 HVR-L3:MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6)

[0181] SEQ ID NO:40 (抗CD19 VL1.1;加下划线的序列分别为HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3)

[0182] DVVMTQSPSSIPVTLGESVSISCRSSKSLNSNGNTYLYWFQQRPQGSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDVGVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLEIK

[0183] 抗CD19 VL1.1 HVR-L1:RSSKSLNSNGNTYLY (SEQ ID NO:37)

[0184] 抗CD19 VL1.1 HVR-L2:RMSNLAS (SEQ ID NO:38)

[0185] 抗CD19 VL1.1 HVR-L3:MQHLEYPLT (SEQ ID NO:39)

[0186] 接头

[0187] 本文所述的BSAP可以在抗肿瘤抗原 (例如CD19) Fab与抗CD3结合结构域 (例如scFv) 之间包含接头 (例如肽接头或化学偶联)。在一些实施方案中,抗CD3结合结构域是包含VH和VL的scFv,并且抗CD3 scFv的VH和VL经由“连接肽”连接。本文所述的任何接头 (例如连接肽、肽接头或化学偶联) 可用于要连接在一起的本文所述的任何BSAP结构/模块中,例如作为抗肿瘤抗原 (例如CD19) Fab的VH与CH1之间的接头和/或抗肿瘤抗原 (例如CD19) Fab的VL与CL之间的接头;作为抗CD3 scFv的前述VH与VL之间的连接肽;作为位于抗肿瘤抗原 (例如CD19) Fab与抗CD3结合结构域 (例如scFv) 之间的接头;或作为BSAP与另外的多肽之间的接头,例如作为位于抗肿瘤抗原 (例如CD19) Fab的CH1的C末端与另外的Fc片段CH2-CH3的N末端之间的接头。

[0188] 所述接头可以是任何长度的肽接头。在一些实施方案中,所述接头 (如肽接头或连接肽) 的长度为从约1个氨基酸至约10个氨基酸、从约21个氨基酸至约30个氨基酸、从约1个氨基酸至约20个氨基酸、从约1个氨基酸至约30个氨基酸、从约11个氨基酸至约30个氨基酸、从约2个氨基酸至约20个氨基酸、从约2个氨基酸至约19个氨基酸、从约3个氨基酸至约18个氨基酸、从约4个氨基酸至约17个氨基酸、从约4个氨基酸至约16个氨基酸、从约4个氨基酸至约15个氨基酸、从约5个氨基酸至约14个氨基酸、从约5个氨基酸至约13个氨基酸、从约6个氨基酸至约12个氨基酸、从约6个氨基酸至约11个氨基酸、从约6个氨基酸至约10个氨基酸、从约4个氨基酸至约9个氨基酸、从约4个氨基酸至约8个氨基酸、或从约5个氨基酸至约7个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头 (例如肽接头或连接肽) 的长度为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸中的任一个。在一些实施方案中,所述接头 (例如肽接头或连接肽) 由长度为从约2至约30 (例如约6至约12) 个氨基酸残基的氨基酸序列构成。在一些实施方案中,所述接头 (例如肽接头或连接肽) 的长度为6个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头 (例如肽接头或连接肽) 的长度为12个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头 (例如肽接头) 的N末端共价连接至抗CD3结合结构域 (例如scFv) 的C末端,并且接头 (例如肽接头) 的C末端共价连接至抗肿瘤抗原 (例如CD19) Fab的VH和/或VL的N末端。

[0189] 所述接头 (例如肽接头、连接肽) 可以具有天然存在的序列或非天然存在的序列。例如,源自仅重链抗体的铰链区的序列可用作接头 (例如肽接头、连接肽)。参见例如W01996/34103。在一些实施方案中,所述肽接头或连接肽是人IgG1或IgG4铰链。在一些实施方案中,所述肽接头或连接肽是突变的人IgG1或IgG4铰链。在一些实施方案中,所述接头 (例如肽接头、连接肽) 是柔性接头。示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物 (G)_n (SEQ ID NO:

41)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n(SEQ ID NO:42)、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:43)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:44)或(GGGGS)_n(SEQ ID NO:45),其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及本领域中已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可能能够充当组分之间的中性系链。甘氨酸接近的 Φ - Ψ 空间甚至比丙氨酸显著大,并且比侧链较长的残基受到的限制小得多(参见Scheraga, Rev.Computational Chem.11 173-142(1992))。示例性柔性接头包括但不限于Gly-Gly(SEQ ID NO:46)、Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID N 0:47)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID NO:48)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(S EQ ID NO:49)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:50)、Gly-Gly-Gly-Se r-Gly(SEQ ID NO:51)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:52)、Gly-Gl y-Ser-Gly-Gly-Ser(SEQ ID NO:20)、Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(SEQ ID NO:21)、Gly-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:22)、Gly-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:33)、GGGSGGGSGGGG S(SEQ ID NO:53)、GGGS(SEQ ID NO:54)等。在一些实施方案中,位于抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH和/或VL与抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头是SGGGGS(SEQ ID NO:21)、GRAGGGAGGGG(S EQ ID NO:22)或GRAGG(SEQ ID NO:33)。在一些实施方案中,位于抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽是GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:53)。普通熟练技术人员将认识到,BSAP的设计可以包括全部或部分柔性的接头(例如肽接头、连接肽),使得所述接头可以包括柔性接头以及赋予较低柔性结构以提供所需BSAP结构的一个或多个部分。

[0190] 在一些实施方案中,位于抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与抗CD3结合结构域(如scFv)之间的接头或位于抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽是稳定的接头(不能被蛋白酶,尤其是MMP切割)。

[0191] 在一些实施方案中,所述接头(例如肽接头、或连接肽)是可切割接头。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH/VL与抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头包含蛋白酶底物切割序列,例如MMP底物切割序列。可被MMP切割的底物序列已被广泛研究。例如熟知的PLGLAG(SEQ ID NO:34)的肽序列可被大多数MMP切割。在一些实施方案中,蛋白酶切割位点由MMP-2、MMP-9或其组合识别。

[0192] 在一些实施方案中,BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含结构:N'-抗CD3 VH-L1-抗CD3 VL-L2-抗CD19 VH-CH1-C',并且所述第二多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-CL-C'。在一些实施方案中,BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含结构:N'-抗CD3 VL-L1-抗CD3 VH-L2-抗CD19 VH-CH1-C',并且所述第二多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-CL-C'。在一些实施方案中,BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含结构:N'-抗CD19 VH-CH1-C',并且所述第二多肽包含结构:N'-抗CD3 VH-L1-抗CD3 VL-L2-抗CD19 VL-CL-C'。在一些实施方案中,BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含结构:N'-抗CD19 VH-CH1-C',并且所述第二多肽包含以下结构:N'-抗CD3 VL-L1-抗CD3 VH-L2-抗CD19 VL-CL-C'。在一些实施方案中,BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含结构:N'-抗CD3 VH-L1-抗CD3 VL-L2-抗CD19 VH-CH1-C',并且所述第二多肽包含结构:N'-抗CD3 VH-L1-抗CD3 VL-L2-抗CD19VL-CL-C'。在一些实施方案中,BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含结构:N'-抗CD3 VL-L1-抗CD3 VH-L2-抗CD19 VH-CH1-C',并且所述第二多肽包含以下结构:N'-抗CD3 VL-L1-抗CD3 VH-L2-

抗CD19 VL-CL-C'。在一些实施方案中,BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含结构:N'-抗CD3 VH-L1-抗CD3 VL-L2-抗CD19 VH-CH1-C',并且所述第二多肽包含结构:N'-抗CD3 VL-L1-抗CD3 VH-L2-抗CD19 VL-CL-C'。L1和L2是任选的接头(例如L1是连接肽),并且可以选自本文所述的任何接头形式。L1和L2可以是相同或不同的。

[0193] 因此,在一些实施方案中,CD19×CD3 BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约85% (如至少约86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约85% (如至少约86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一多肽由包含SEQ ID NO:30、32、36、60和61中任一个的核酸序列编码。在一些实施方案中,所述第二多肽由包含SEQ ID NO:29或31的核酸序列编码。

[0194] 在一些实施方案中,所述BSAP的第一多肽和/或第二多肽的C末端包含能够形成分子间二硫键的共价结合区CPPC(SEQ ID NO:55)或CPPCS(SEQ ID NO:56)。例如,在一些实施方案中,能够形成分子间二硫键的共价结合区位于抗肿瘤抗原Fab的CH1和CL的C末端。在一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽的N末端或C末端可包含组氨酸标签(HIS标签),如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列,以用于蛋白质纯化。例如,在一些实施方案中,抗CD3结合结构域(例如scFv)的N末端另外与组氨酸标签连接。在一些实施方案中,抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的CH1和/或CL的C末端另外与组氨酸标签连接。在一些实施方案中,为了更好地表达,BSAP的第一多肽和/或第二多肽的N末端另外与信号肽连接,所述信号肽如SEQ ID NO:25中所示的信号肽序列或由SEQ ID NO:26的核酸序列编码。

[0195] BSAP第一多肽氨基酸序列(SEQ ID NO:23;抗CD3 scFv(VH-连接肽-VL)-6aa接头-抗CD19 VH-CH1-CPPC-S;接头为粗体,连接肽为加粗斜体)

[0196]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTMTVTVSS**GGGGS****GGGGS****GGGGS**QAVVT
QEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT
KLTVL**SGGGS**QVQLVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWV
RQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSLR
SEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCPPCS

[0197] 编码抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL) -6aa接头-抗CD19 VH-CH1-CPPC-S的核酸序列 (SEQ ID NO:30)

[0198] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAACACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCG
ACGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACCGGTTACCATCTCCAGAG
ACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGTGAGA
CATGGGAACCTTCGGTAATAGCTACGTTTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGG
TGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGGTCCGGTGGCGGCGGATCTCAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTG
TGTCCCCAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTACTAGTAACTATGCCAACTGG
GTCCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCCAGGGTCTGATTGGTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTACCCCTGCCCG
GTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGTGCAGCCTGAGGACGAGGCTGAGTATT
ACTGCGCTCTATGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAAGTGGCGGTGGAGGA
TCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCCGAGCTAATCAAGCCTGGCGGCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTC
CGGCTACACCTTACCAGCTACGTGATGCACTGGGTGCGCCAGAAGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACA
TCAACCCCTACAACGATGGCACCAAGTACAACGAGAAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCCTGACCAGCGACAAGAGCAGC
AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCACCTACTA
CTACGGCAGCCGGGTGTTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCACGGTACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAT
CCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC
TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACA
GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTCCACCGTGCTCATAG

[0199] BSAP第一多肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:28;抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL) -6aa接头-
抗CD19 VH-CH1-CPPC-His标签;接头为粗体,连接肽为加粗斜体)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTMTVTVSS**GGGGSGGGSGGGGS**QAVVT
QEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT
[0200] **KLTVLGRAGGGQVQLVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWV**
RQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSLR
SEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCPPCGGGGSHHHH
HH

[0201] 编码抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL) -6aa接头-抗CD19 VH-CH1-CPPC-His标签的核酸 (SEQ ID NO:32)

[0202] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAACACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCG
ACGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACCGGTTACCATCTCCAGAG
ACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGTGAGA
CATGGGAACCTCGGTAATAGCTACGTTTCTGGTTTGTCTACTGGGGCCAAGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGG
TGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGGTCCGGTGGCGGCGGATCTCAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTG
TGTCCCCAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAACTATGCCAACTGG
GTCCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCCAGGGGTCTGATTGGTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTACCCCTGCCCC
GTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGTGCAGCCTGAGGACGAGGCTGAGTATT
ACTGCGCTCTATGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGGCGCGCCGGCGGT
GGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCCGAGCTAATCAAGCCTGGCGGCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTC
CGGCTACACCTTACACAGCTACGTGATGCACTGGGTGCGCCAGAAGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACA
TCAACCCCTACAACGATGGCACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCCTGACCAGCGACAAGAGCAGC
AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCACCTACTA
CTACGGCAGCCGGGTGTTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCGGTACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAT
CCGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC
TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACA
GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTCCACCGTGCAGGTGGCGGG
GGCTCCCATCATCATCATCATATTAG

[0203] BSAP第一多肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:58;抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL) -6aa接头-
抗CD19 VH-CH1-CPPC;接头为粗体,连接肽为加粗斜体)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTMTVTVSS**GGGGS****GGGGS****GGGGS**QAVVT
[0204] QEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT
KLTVL**GRAGGG**QVQLVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWV
RQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSLR
SEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCPPC

[0205] 编码抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL) -6aa接头-抗CD19 VH-CH1-CPPC的核酸 (SEQ ID NO:60)

[0206] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAACACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCG
ACGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACCGGTTACCATCTCCAGAG
ACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGTGAGA
CATGGGAACCTTCGGTAATAGCTACGTTTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGG
TGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGGTCCGGTGGCGGCGGATCTCAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTG
TGTCCCCAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACCTATGCCAACTGG
GTCCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCCAGGGGTCTGATTGGTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTACCCCTGCCCG
GTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGTGCAGCCTGAGGACGAGGCTGAGTATT
ACTGCGCTCTATGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGGCGCGCCGGCGGT
GGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCCGAGCTAATCAAGCCTGGCGGCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTC
CGGCTACACCTTACACAGCTACGTGATGCACTGGGTGCGCCAGAAGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACA
TCAACCCCTACAACGATGGCACCAAGTACAACGAGAAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCCTGACCAGCGACAAGAGCAGC
AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCACCTACTA
CTACGGCAGCCGGGTGTTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCACGGTACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAT
CCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC
TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACA
GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTCCACCGTGCTAG

[0207] BSAP第一多肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:35;抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL) -12aa接头-抗CD19 VH-CH1-CPPC-His标签;接头为粗体,连接肽为加粗斜体)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTMTVTVSS**GGGGSGGGSGGGGS**QAVVT
QEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT
[0208] **KLTVLGRAGGGGAGGGG**QVQLVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTS
YVMHWVRQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAY
MELSSLRSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCPPCGGG
GSHHHHHH

[0209] 编码抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL)-12aa接头-抗CD19 VH-CH1-CPPC-His标签的核
酸 (SEQ ID NO:36)

[0210] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAACACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCG
ACGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACCGGTTACCATCTCCAGAG
ACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGTGAGA
CATGGGAACCTCGGTAATAGCTACGTTTCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGG
TGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGGTCCGGTGGCGGCGGATCTCAGGCTGTGGTGA CT CAGGAGCCCTCACTGACTG
TGTCCCCAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACA ACTAGTA ACTATGCCAACTGG
GTCCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCCAGGGGTCTGATTGGTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTACCCCTGCCCC
GTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGTGCAGCCTGAGGACGAGGCTGAGTATT
ACTGCGCTCTATGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGGCGCGCCGGCGGA
GGTGGTGCAGGAGGCGGTGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCCGAGCTAATCAAGCCTGGCGGCAGCGTGAA
GATGAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACGTGATGCACTGGGTGCGCCAGAAGCCTGGACAGGGCC
TGGAATGGATCGGCTACATCAACCCCTACAACGATGGCACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCCTG
ACCAGCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGA ACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTG
TGCCAGAGGCACCTACTACTACGGCAGCCGGGTGTTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCGGTCACCGTCTCCTCAG
CTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA
CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGT
CCACCGTGCGGTGGCGGGGGCTCCCATCATCATCATCATTAG

[0211] BSAP第一多肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:59;抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL)-12aa接
头-抗CD19 VH-CH1-CPPC;接头为粗体,连接肽为加粗斜体)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTMTVTVSS**GGGGSGGGSGGGGSQ**AVVT
[0212] QEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT
KLTVL**GRAGGGGAGGGG**QVQLVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTS
YVMHWVRQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAY
MELSSLRSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCPPC

[0213] 编码抗CD3 scFv (VH-连接肽-VL) -12aa接头-抗CD19 VH-CH1-CPPC的核酸 (SEQ ID NO:61)

[0214] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAACACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCG
ACGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACCGGTTACCATCTCCAGAG
ACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGTGAGA
CATGGGAACCTTCGGTAATAGCTACGTTTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGG
TGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGGTCCGGTGGCGGCGGATCTCAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTG
TGTCCCCAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAC TAGTAACTATGCCAACTGG
GTCCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCCAGGGGTCTGATTGGTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTACCCCTGCCCG
GTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGTGCAGCCTGAGGACGAGGCTGAGTATT
ACTGCGCTCTATGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGGCGCGCCGGCGGA
GGTGGTGCAGGAGGCGGTGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCCGAGCTAATCAAGCCTGGCGGCAGCGTGAA
GATGAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACGTGATGCACTGGGTGCGCCAGAAGCCTGGACAGGGCC
TGGAATGGATCGGCTACATCAACCCCTACAACGATGGCACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCCTG
ACCAGCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTACGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTG
TGCCAGAGGCACCTACTACTACGGCAGCCGGGTGTTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
CTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTACAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA
CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGT
CCACCGTGCTAG

[0215] BSAP第二多肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:24;抗CD19 VL1.2-CL-CPPC-S) DVVMTQSPS
SIPVTLGESVSISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQRPQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPE
DVGYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECPPCS

[0216] 编码抗CD19 VL1.2-CL-CPPC-S的核酸 (SEQ ID NO:29)

[0217] GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCCAGCAGCATCCCCGTGACCCTGGGCGAGTCTGTGTCCATCAGCTGC
AGAAGCAGCAAGAGCCTGCAGAACGTCAACGGCAACACCTACCTGTACTGGTTCCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCC
CCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACCTGAACAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCG
ACTTCACCCTGAGAATCTCCGGCGTGGAACCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGCACCTGGAATACCCC
ATCACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTCCACCGTGCTCTAG

[0218] BSAP第二多肽氨基酸序列(SEQ ID NO:27;抗CD19 VL1.1-CL-CPPC) DVVMTQSPSSI
PVTLGESVSI SCRSSKSLNNGNTYLYWFQQRPQGSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
GVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECPPC

[0219] 编码抗CD19 VL1.1-CL-CPPC的核酸(SEQ ID NO:31)

[0220] GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCCAGCAGCATCCCCGTGACCCTGGGCGAGTCTGTGTCCATCAGCTGC
AGAAGCAGCAAGAGCCTGCTGAACAGCAACGGCAACACCTACCTGTACTGGTTCCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCC
CCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCG
ACTTCACCCTGAGAATCTCCGGCGTGGAACCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGCACCTGGAATACCCC
CTGACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTCCACCGTGCTAG

[0221] III. 制备方法

[0222] 本文所述的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)可以通过本领域中任何已知的蛋白质表达和纯化方法来制备。参见实施例1。编码本文所述的BSAP的DNA序列可以完全合成。在获得这样的序列后,将其克隆到合适的表达载体中,然后转移到合适的宿主细胞(例如CHO细胞)中。最后,培养转化的(例如转染的)宿主细胞,收获并纯化表达上清液,以获得本发明的BSAP。

[0223] 因此,本发明在一些方面还提供了编码本文所述的任何BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)的分离的核酸、包含编码BSAP的任何核酸的载体(例如表达载体)、以及包含携带编码BSAP的核酸的任何载体的宿主细胞(例如CHO细胞、细菌细胞)。

[0224] 在一些实施方案中,本申请提供了编码本文所述的任何一种BSAP的一种或多种多肽的分离的核酸。在一些实施方案中,所述分离的核酸包含SEQ ID NO:30、32、36、60或61的核酸序列。在一些实施方案中,所述分离的核酸包含SEQ ID NO:29或31的核酸序列。所述分离的核酸可以是DNA或RNA。

[0225] 在一些实施方案中,将所述分离的核酸插入载体,例如表达载体、病毒载体或克隆载体。为了表达核酸,可以将载体引入宿主细胞,以允许核酸在宿主细胞内表达。所述表达载体可含有各种用于控制表达的元件,包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序

列、选择性标记和信号序列。本领域普通技术人员可以酌情选择这些元件。例如,可以选择启动子序列以促进载体中多核苷酸的转录。合适的启动子序列包括而限于T7启动子、T3启动子、SP6启动子、 β 肌动蛋白启动子、EF1a启动子、CMV启动子和SV40启动子。可以选择增强子序列以增强核酸的转录。可以选择选择性标记以允许将插有载体的宿主细胞与那些未插有载体的宿主细胞区分选择,例如选择性标记可以是赋予抗生素抗性的基因。可以选择信号序列以允许表达的多肽被转运到宿主细胞之外。在一些实施方案中,所述分离的核酸还包含编码信号肽的核酸序列。在一些实施方案中,所述信号肽包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码所述信号肽的核酸包含SEQ ID NO:26的核酸序列。

[0226] SEQ ID NO:25(信号肽)

[0227] MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

[0228] SEQ ID NO:26(编码信号肽的核酸)

[0229] ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCTGTCAGTAACGACTGGTG

[0230] TCCACTCC

[0231] 在一些实施方案中,提供了包含上述任何载体的分离的宿主细胞。含有载体的宿主细胞可用于分离的核酸的表达或克隆。合适的宿主细胞可包括而限于原核细胞、真菌细胞、酵母细胞、或高等真核细胞(如哺乳动物细胞)。抗体和抗原结合片段在原核细胞(如大肠杆菌)中的表达是本领域良好确立的。有关综述,参见例如Pluckthun, A. *BioTechnology* 9:545-551(1991)。本领域技术人员也可在培养的真核细胞中获得表达,作为产生抗体或其抗原结合片段的一种选择,参见最近的综述,例如参考文献M.E. (1993) *Curr.Opinion Biotech.* 4:573-576; Trill J.J.等人(1995) *Curr.Opinion Biotech* 6:553-560。高等真核细胞,特别是源自多细胞生物的那些高等真核细胞可用于糖基化多肽的表达。合适的高等真核细胞包括而限于无脊椎动物细胞和昆虫细胞、以及脊椎动物细胞。

[0232] 可以使用本领域已知的任何合适方法将载体引入宿主细胞,所述方法包括但不限于DEAE-葡聚糖介导的递送,磷酸钙沉淀法,阳离子脂质介导的递送,脂质体介导的转染,电穿孔,微弹轰击,受体介导的基因递送,由聚赖氨酸、组蛋白、壳聚糖和肽介导的递送。转染和转化细胞以表达目的载体的标准方法在本领域中是熟知的。在一些实施方案中,所述宿主细胞包含编码第一多肽的第一载体和编码第二多肽的第二载体。在一些实施方案中,所述宿主细胞包含单个载体,所述单个载体包含编码第一多肽和第二多肽的分离的核酸。

[0233] 在一些实施方案中,本申请提供了表达本文所述的任何BSAP的方法,所述方法包括培养含有编码BSAP的载体的分离的宿主细胞,并且从细胞培养物中回收BSAP。将所述分离的宿主细胞在允许插入载体中的分离的核酸表达的条件下培养。用于表达多核苷酸的合适条件可以包括而限于合适的培养基、培养基中宿主细胞的合适密度、必需营养素的的存在、补充因子的存在、合适的温度和湿度、以及不存在微生物污染物。本领域普通技术人员可出于表达目的酌情选择合适的条件。

[0234] 在一些实施方案中,在宿主细胞中表达的多肽可形成二聚体并因此产生本文所述的BSAP。在一些实施方案中,在宿主细胞中表达的多肽可形成作为同二聚体的多肽复合物。在其中宿主细胞表达第一多核苷酸和第二多核苷酸的一些实施方案中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸可形成作为异二聚体的多肽复合物。

[0235] 在一些实施方案中,多肽复合物(如BSAP)可在宿主细胞内形成。例如,二聚体可以

在相关酶和/或辅因子的辅助下在宿主细胞内形成。在一些实施方案中,多肽复合物可分泌到细胞外。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽可分泌到宿主细胞外并在宿主细胞外部形成二聚体(如BSAP)。

[0236] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽可分开表达并被允许在合适的条件下二聚化形成BSAP。例如,所述第一多肽和所述第二多肽可在合适的缓冲液中组合,并允许第一蛋白单体和第二蛋白单体通过适当的相互作用如疏水性相互作用二聚化。在一些实施方案中,所述第一多肽和所述第二多肽可在合适的缓冲液中组合,所述缓冲液含有可促进所述第一多肽和所述第二多肽二聚化的酶和/或辅因子。在一些实施方案中,所述第一多肽和所述第二多肽可以在合适的媒介物中组合,并允许它们在合适的试剂和/或催化剂的存在下彼此反应。

[0237] 可以使用任何合适的方法收集所表达的一种或多种多肽和/或多肽复合物。一种或多种多肽和/或多肽复合物可在细胞内、周质空间中表达,或分泌到细胞外进入培养基中。如果所述多肽和/或多肽复合物在细胞内表达,则可将含有所述多肽和/或多肽复合物的宿主细胞裂解,并且可将所述多肽和/或多肽复合物通过离心或超滤去除不需要的碎片而从裂解物中分离。如果所述多肽和/或多肽复合物分泌到大肠杆菌的周质空间中,则可将细胞糊在试剂如乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯基甲基磺酰氟(PMSF)的存在下解冻约30 min,并且可通过离心除去细胞碎片(Carter等人,BioTechnology 10:163-167(1992))。如果所述多肽和/或多肽复合物分泌到培养基中,则可将细胞培养物的上清液使用可商购的蛋白质浓缩过滤器(例如Amincon或Millipore Pellicon超滤单元)收集和浓缩。可将蛋白酶抑制剂和/或抗生素包括在收集和浓缩步骤中,以抑制蛋白质降解和/或污染微生物的生长。

[0238] 可以通过合适的方法进一步纯化所表达的一种或多种多肽和/或多肽复合物,所述方法例如而限于亲和色谱、羟基磷灰石色谱、尺寸排阻色谱、凝胶电泳、透析、离子交换柱上的离子交换分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱、肝素琼脂糖色谱、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀(关于综述,参见Bonner,P.L.,Protein purification,由Taylor&Francis出版,2007;Janson,J.C.,等人,Protein purification:principles,high resolution methods and applications,由Wiley-VCH出版,1998)。参见实施例1。

[0239] 在一些实施方案中,所述多肽和/或多肽二聚体复合物可以通过亲和色谱来纯化。在一些实施方案中,蛋白A色谱或蛋白A/G(蛋白A和蛋白G的融合蛋白)色谱可用于纯化包含源自抗体CH2结构域和/或CH3结构域的组分的多肽和/或多肽复合物(Lindmark等人,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983));Zettlitt,K.A.,Antibody Engineering,部分V,531-535,2010)。在一些实施方案中,蛋白G色谱可用于纯化包含IgG γ 3重链的多肽和/或多肽复合物(Guss等人,EMBO J.5:1567-1575(1986))。在一些实施方案中,蛋白L色谱可用于纯化包含 κ 轻链的多肽和/或多肽复合物(Sudhir,P.,Antigen engineering protocols,26章,由Humana Press出版,1995;Nilson,B.H.K.等人,J.Biol.Chem.,267,2234-2239(1992))。亲和配体所附接的基质最常见是琼脂糖,但是可使用其他基质。机械稳定的基质如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯能获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。在所述BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)包含另外的CH3结构域的情况下,Bakerbond ABX树脂(J.T.Baker,菲利普斯堡,新泽西州)可用于纯化。

[0240] IV. 药物组合物、剂型、制品和试剂盒

[0241] 本申请还提供了包含本文所述的任一种BSAP(如CD19×CD3 BSAP)和任选的药理学上可接受的载体的药物组合物。

[0242] 所述药物组合物可适用于本文所述的各种施用方式,包括例如全身施用或局部施用。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于静脉施用。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于皮下施用。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于局部施用至肿瘤部位。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于瘤内注射。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于腹膜内注射。

[0243] 如本文所用,“载体”包括药理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们在所采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常,生理学上可接受的载体是水性的pH缓冲溶液。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括:缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0244] 应理解,可以将本发明的BSAP与配制成配制品(例如药物配制品)的合适载体、赋形剂和其他药剂一起施用,以改善转移、递送、耐受性等。许多适当的配制品可以获自所有药物化学家已知的配制品列表:Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版,Mack Publishing Company,伊斯顿,宾夕法尼亚州(1975)),特别是Blaug, Seymour的87章。这些配制品包括例如粉末、糊剂、软膏、凝胶、蜡、油、脂质、含有脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(如LipofectinTM)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(carbowax)(具有不同分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。任何前述混合物都可适于根据本发明的治疗和疗法,前提条件是配制品中的活性成分不因配制而失活且配制品与施用途径在生理学上相容且可耐受。关于与药物化学家熟知的配制品、赋形剂和载体相关的另外信息,还参见Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8(2000); Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60(2000); Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78(2000); Powell等人 "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311(1998) 和其中的引用。

[0245] 在一些实施方案中,所述药物组合物还可以通过添加合适的张力调节剂(如甘油)来制成使其与血液等渗。

[0246] 通常将有待用于体内施用的药物组合物配制为无菌的、基本上等渗的并且完全符

合美国食品和药物管理局的所有良好生产规范 (GMP) 规定。无菌性可以通过无菌过滤膜过滤容易地实现。在一些实施方案中,所述组合物不含病原体。对于注射,所述药物组合物可以处于液体溶液的形式,例如在生理学上相容的缓冲液如汉克氏溶液或林格氏溶液中。此外,药物组合物可以处于固体形式,并就在使用前重新溶解或悬浮。冻干组合物也被包括在内。

[0247] 在一些实施方案中,将所述药物组合物根据常规程序配制为适于静脉注射、腹膜内注射或玻璃体内注射的药物组合物。通常,注射用组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,所述组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂(如利多卡因)以缓解注射部位的疼痛。通常,成分分开或混合在一起以单位剂型提供,例如,作为在气密密封容器中的干燥的冻干粉或无水浓缩物,所述气密密封容器例如是指明活性剂的量的安瓿瓶或小药囊。在通过输注施用组合物时,可以用含有无菌药用级水或盐水的输注瓶进行配药。在通过注射施用组合物时,可以提供一安瓿瓶无菌注射用水或盐水,使得可以在施用前将成分混合。

[0248] 在一些实施方案中,BSAP组合物(例如CD19×CD3 BSAP或含有BSAP的药物组合物)适用于施用至人。在一些实施方案中,BSAP组合物(例如CD19×CD3 BSAP或含有BSAP的药物组合物)适用于施用至啮齿动物(例如小鼠、大鼠)或非人灵长类动物(例如食蟹猴)。在一些实施方案中,所述药物组合物被容纳于一次性使用的小瓶,如一次性使用的密封小瓶中。在一些实施方案中,所述药物组合物被容纳于多用途小瓶中。在一些实施方案中,所述药物组合物被散装地容纳于容器中。在一些实施方案中,将所述药物组合物低温保存。

[0249] 还提供了BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物的单位剂型。术语“单位剂型”是指适合作为个体的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有经计算与合适的药物载体、稀释剂或赋形剂结合使用可产生所需治疗效果的预定量的活性物质。这些单位剂型可以以单个或多个单位剂量储存在合适的包装中,并且也可以进一步灭菌和密封。

[0250] 本申请还提供了在合适的包装中包含本文所述的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)组合物(如药物组合物)的制品。本文所述的用于组合物(例如BSAP组合物)的合适包装在本领域中是已知的,并且包括例如小瓶(如密封小瓶)、容器、安瓿瓶、瓶子、广口瓶、柔性包装(例如密封的聚酯薄膜或塑料袋)等。可进一步将这些制品灭菌和/或密封。

[0251] 本申请还提供了包含本文所述的BSAP(例如CD19×CD3BSAP)组合物(如药物组合物)的试剂盒,并且还可以包含关于使用所述组合物的方法(如本文所述的用途)的一个或多个说明书。本文所述的试剂盒可以进一步包括从商业和用户角度所需的材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有用于实施本文所述任何方法的说明的包装说明书。

[0252] V. 治疗癌症的方法

[0253] 本申请还提供了治疗个体(如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的任何BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或包含任何BSAP和任选的药理学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,所述癌症选自急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞白血病(MCL)和B细胞淋巴瘤(BCL)。

[0254] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方

法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物), 所述BSAP (或其药物组合物) 包含: i) 特异性识别肿瘤抗原 (例如CD19, 如huCD19或cynoCD19) 的抗肿瘤抗原Fab, 其包含: (a) VH和CH1; 和 (b) VL和CL; 以及 ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv); 其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中, 提供了一种治疗个体 (例如人) 中的癌症的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物), 所述BSAP (或其药物组合物) 包含: i) 特异性识别肿瘤抗原 (例如CD19, 如huCD19或cynoCD19) 的抗肿瘤抗原Fab, 其包含: (a) VH和CH1; 和 (b) VL和CL; 以及 ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv); 其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3结合结构域直接或经由任选的接头连接; 其中所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VH的N末端。在一些实施方案中, 提供了一种治疗个体 (例如人) 中的癌症的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物), 所述BSAP (或其药物组合物) 包含: i) 特异性识别肿瘤抗原 (例如CD19, 如huCD19或cynoCD19) 的抗肿瘤抗原Fab, 其包含: (a) VH和CH1; 和 (b) VL和CL; 以及 ii) 两个特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv); 其中所述抗肿瘤抗原Fab和第一抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的第一接头连接, 并且所述抗肿瘤抗原Fab和第二抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的第二接头连接; 其中所述第一抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VH的N末端, 并且所述第二抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VL的N末端。在一些实施方案中, 所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。在一些实施方案中, 所述肿瘤抗原CD19。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ) 的N末端, 如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 包含VH, 其中所述抗CD3结合结构域的VH包含: 含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 包含VL, 其中所述抗CD3结合结构域的VL包含: 含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域的VH (例如scFv) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列, 和/或所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中, 所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中, 所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述抗肿瘤抗原Fab的CH1和CL通过二硫键 (如约1至约5个 (如约1、2、3、4或5个中的任一个) 二硫键, 例如约2个二硫键) 连接。在一些实施方案中, 所述抗肿瘤抗原Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列, 和/或所述抗肿瘤抗原Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,

位于所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab与所述抗CD3结合结构域(例如scFv)之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种:(1)杀伤癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤);(4)减小肿瘤大小;(5)减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结);(7)延长个体存活期;(8)延长到癌症进展的时间;(9)防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述BSAP(例如CD3×CD19 BSAP)或其药物组合物介导的杀伤癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一个的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的BSAP(例如CD19×CD3BSAP)或其药物组合物介导的减小肿瘤大小的方法可将肿瘤大小减小至少约10%(如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一个)。在一些实施方案中,由本文所述的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结)的方法可将转移抑制至少约10%(如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一个)。在一些实施方案中,由本文所述的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物介导的延长个体(例如人)存活期的方法可个体(例如人)的存活期延长至少约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、24个月或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,由本文所述的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物介导的延长到癌症进展的时间的方法可将到癌症进展的时间延长至少约1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,本文所述的BSAP(例如CD3×CD19 BSAP)或其药物组合物可以通过激活效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞)增加、增强、或刺激受试者中的免疫应答或功能。在一些实施方案中,相对于在施用本文所述的BSAP(例如CD3×CD19 BSAP)或其药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加或增强的启动、激活、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0255] 在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv,其中所述抗CD3 scFv包含任选地由连接肽连接的VH和VL。在一些实施方案中,所述连接肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[0256] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗

CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗肿瘤抗原Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原CD19。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种:(1)杀伤癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤);(4)减小肿瘤大小;(5)减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结);(7)延长个体存活期;(8)延长到癌症进展的时间;(9)防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。

[0257] 在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是抗CD3 scFv,其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0258] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和所述抗CD3scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别肿瘤抗原(例如CD19,如huCD19或cynoCD19)的抗肿瘤抗原Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗肿瘤抗原Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗肿瘤抗原Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中每个所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个抗CD3scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3

scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗肿瘤抗原(例如CD19)Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗肿瘤抗原Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74。在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种:(1)杀伤癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤);(4)减小肿瘤大小;(5)减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结);(7)延长个体存活期;(8)延长到癌症进展的时间;(9)防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。

[0259] 在一些实施方案中,所述肿瘤抗原是CD19,即所述BSAP是CD19 $\times$ CD3 BSAP。因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种治疗与CD19的表达相关或以CD19的表达为特征的疾病(如表达CD19的癌症,例如ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤)的方法。

[0260] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b)

VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种:(1)杀伤癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤);(4)减小肿瘤大小;(5)减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结);(7)延长个体存活期;(8)延长到癌症进展的时间;(9)防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL和B细胞淋巴瘤。

[0261] 在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。

[0262] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌

症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约

1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种:(1)杀伤癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤);(4)减小肿瘤大小;(5)减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结);(7)延长个体存活期;(8)延长到癌症进展的时间;(9)防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL和B细胞淋巴瘤。

[0263] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-

H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;其中每个所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述

抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1和CL通过二硫键(如约1至约5个(如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如约2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的CL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,位于所述抗CD19 Fab与所述抗CD3 scFv之间的接头和/或位于所述抗CD3 scFv的VH与VL之间的连接肽由长度为约2至约30个(例如约6至约12个)氨基酸残基的氨基酸序列构成,其中所述氨基酸残基选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸;例如所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任一个。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种:(1)杀伤癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤);(4)减小肿瘤大小;(5)减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结);(7)延长个体存活期;(8)延长到癌症进展的时间;(9)防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0264] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,和/或所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:含有SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:含有SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽。

[0265] 在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3。

[0266] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结

构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如

scFv) 包含VH, 其中所述抗CD3结合结构域的VH包含: 含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv) 包含VL, 其中所述抗CD3结合结构域的VL包含: 含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列, 和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv) 的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中, 所述抗CD3scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中, 所述抗CD3scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中, 所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个) 二硫键, 例如2个二硫键) 连接。在一些实施方案中, 将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中, 本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种: (1) 杀伤癌细胞; (2) 抑制癌细胞增殖; (3) 诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤); (4) 减小肿瘤大小; (5) 减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状; (6) 抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结); (7) 延长个体存活期; (8) 延长到癌症进展的时间; (9) 防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中, 所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0267] 在一些实施方案中, 提供了一种治疗个体(例如人) 中的癌症(例如CD19+癌症) 的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物), 所述BSAP(或其药物组合物) 包含: i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab, 其包含: (a) VH和CH1; 和(b) VL和CL; 以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3 scFv; 其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接; 其中所述抗CD19 Fab的VH包含: 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或所述抗CD19 Fab的VL包含: 含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3; 并且其中所述抗CD3 scFv包含VH, 其中所述抗CD3 scFv的VH包含: 含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或所述抗CD3 scFv包含VL, 其中所述抗CD3 scFv的VL包含: 含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中, 提供了一种治疗个体(例如人) 中的癌症(例如CD19+癌症) 的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物), 所述BSAP(或其药物组合物) 包含: i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab, 其包含: (a) VH和CH1; 和(b) VL和CL; 以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3 scFv; 其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接; 其中所述抗CD19 Fab的VH包含: 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或所述抗CD19 Fab的VL包含: 含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3; 其中所述抗

CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3 scFv直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3 scFv;其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3 scFv直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3 scFv直接或经由任选的第二接头连接;其中所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-L3;其中每个所述抗CD3 scFv包含VH,其中所述抗CD3 scFv的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或每个所述抗CD3 scFv包含VL,其中所述抗CD3 scFv的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;并且其中所述第一抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3 scFv连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv特异性识别CD3 ϵ (例如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3 scFv的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实

施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法可实现以下生物学效应中的一种或多种:(1)杀伤癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)诱导外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原的组织或肿瘤);(4)减小肿瘤大小;(5)减轻患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如转移至淋巴结);(7)延长个体存活期;(8)延长到癌症进展的时间;(9)防止、抑制癌症复发或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0268] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,和/或所述第二多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:含有SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(例如人)中的癌症(例如CD19+癌症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:含有SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列的第一多肽;和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的第二多肽。

[0269] 可以在辅助设置中实施本文提供的方法。在一些实施方案中,在新辅助设置中实施所述方法,即可在初级疗法/确定性疗法前进行所述方法。在一些实施方案中,所述方法用于治疗先前已被治疗的个体(例如人)。本文提供的任何治疗方法可用于治疗先前尚未被治疗的个体(例如人)。在一些实施方案中,所述方法用作一线疗法。在一些实施方案中,所述方法用作二线疗法。

[0270] 在一些实施方案中,提供了一种抑制个体(例如人)中的癌细胞增殖(例如CD19+癌症中的肿瘤生长)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种抑制个体(例如人)中的癌细胞增殖(例如CD19+癌症中的肿瘤生长)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合

结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种抑制个体(例如人)中的癌细胞增殖(例如CD19+癌症中的肿瘤生长)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种抑制个体(例如人)中的癌细胞增殖(例如CD19+癌症中的肿瘤生长)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,在BSAP(或其药物组合物)的存在下,癌细胞增殖率降低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24

或27的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个) 相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0271] 在一些实施方案中,提供了一种抑制个体 (例如人) 中的肿瘤转移 (例如转移至淋巴结) 的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物),所述BSAP (或其药物组合物) 包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种抑制个体 (例如人) 中的肿瘤转移 (例如转移至淋巴结) 的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物),所述BSAP (或其药物组合物) 包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种抑制个体 (例如人) 中的肿瘤转移 (例如转移至淋巴结) 的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物),所述BSAP (或其药物组合物) 包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,肿瘤转移被抑制至少约10% (如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个)。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和

含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0272] 在一些实施方案中,提供了一种减少(如根除)个体(例如人)中预先存在的肿瘤转移(如转移至淋巴结)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种减少(如根除)个体(例如人)中预先存在的肿瘤转移(如转移至淋巴结)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异

性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种减少(如根除)个体(例如人)中预先存在的肿瘤转移(如转移至淋巴结)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种减少(如根除)个体(例如人)中预先存在的肿瘤转移(如转移至淋巴结)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,转移减少至少约10%(如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个)。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸

序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95% (如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0273] 在一些实施方案中,提供了一种减小个体 (例如人) 中的肿瘤大小的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物),所述BSAP (或其药物组合物) 包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种减小个体 (例如人) 中的肿瘤大小的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物),所述BSAP (或其药物组合物) 包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种减小个体 (例如人) 中的肿瘤大小的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP (或其药物组合物),所述BSAP (或其药物组合物) 包含:i) 特异性识别CD19 (例如huCD19或cynoCD19) 的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3 (例如huCD3或cynoCD3) 的抗CD3结合结构域 (例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域 (例如scFv) 直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域 (例如scFv) 连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,肿瘤大小减小至少约10% (如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个)。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包

含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0274] 在一些实施方案中,提供了一种延长个体(例如人)中的到疾病进展的时间的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种延长个体(例如人)中的到疾病进展的时间的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如

scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种延长个体(例如人)中的到疾病进展的时间的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种延长个体(例如人)中的到疾病进展的时间的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述方法将到疾病进展的时间延长至少约1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周或12周或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95%(如至少

约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0275] 在一些实施方案中,提供了一种延长患有癌症的个体(例如人)中的存活期的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种延长患有癌症的个体(例如人)中的存活期的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种延长患有癌症的个体(例如人)中的存活期的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i) 特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii) 两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述方法将个体(例如人)的存活期延长至少约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月或24个月或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗

CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0276] 在一些实施方案中,提供了一种减轻患有癌症的个体(例如人)中的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种减轻患有癌症的个体(例如人)中的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结

构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种减轻患有癌症的个体(例如人)中的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种减轻患有癌症的个体(例如人)中的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a)VH和CH1;和(b)VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一

多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0277] 在一些实施方案中,提供了一种诱导在患有癌症的个体(例如人)中的外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原如CD19的组织或肿瘤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接。在一些实施方案中,提供了一种诱导在患有癌症的个体(例如人)中的外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原如CD19的组织或肿瘤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和所述抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的接头连接;并且其中所述抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种诱导在患有癌症的个体(例如人)中的外周T细胞重新分布(例如将T细胞募集至表达肿瘤抗原如CD19的组织或肿瘤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的BSAP(或其药物组合物),所述BSAP(或其药物组合物)包含:i)特异性识别CD19(例如huCD19或cynoCD19)的抗CD19 Fab,其包含:(a) VH和CH1;和(b) VL和CL;以及ii)两个特异性识别CD3(例如huCD3或cynoCD3)的抗CD3结合结构域(例如scFv);其中所述抗CD19 Fab和第一抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第一接头连接,并且所述抗CD19 Fab和第二抗CD3结合结构域(例如scFv)直接或经由任选的第二接头连接;并且其中所述第一抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VH的N末端,并且所述第二抗CD3结合结构域(例如scFv)连接至所述抗CD19 Fab的VL的N末端。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和/或

所述抗CD19 Fab的VL包含:含有SEQ ID NO:4或37的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:5或38的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:6或39的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和/或所述抗CD19 Fab的VL包含SEQ ID NO:8或40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)特异性识别CD3 ϵ (如huCD3 ϵ 或cynoCD3 ϵ)的N末端,如CD3 ϵ 的氨基酸残基1-27内的表位。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD3结合结构域的VH包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD3结合结构域的VL包含:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域的VH(例如scFv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和/或所述抗CD3结合结构域(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域是scFv。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv的VH和VL通过连接肽连接。在一些实施方案中,所述抗CD3 scFv包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头和/或连接肽选自SEQ ID NO:21、22、33和53中的任何一个。在一些实施方案中,所述抗CD19 Fab的CL和CH1通过二硫键(例如约1至约5个(例如约1、2、3、4或5个中的任一个)二硫键,例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含与SEQ ID NO:23、28、35、58和59中任一个的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含与SEQ ID NO:24或27的氨基酸序列至少约95%(如至少约96%、97%、98%或99%中的任一个)相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:35或59的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述BSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:28或58的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19 $\times$ CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,所述癌症选自ALL、CLL、MCL或B细胞淋巴瘤。

[0278] 本文所述的方法适合于治疗各种各样的癌症,包括实体癌和液体癌二者。所述方法可应用于所有阶段的癌症,包括早期癌症、非转移性癌症、原发性癌症、晚期癌症、局部晚期癌症、转移性癌症或处于缓解期的癌症。本文所述的方法可以在辅助环境或新辅助环境中,用作第一疗法、第二疗法、第三疗法、或与本领域中已知的其他类型的癌症疗法的组合疗法,所述其他类型的癌症疗法如化学疗法、手术、辐射、基因疗法、免疫疗法、骨髓移植、干细胞移植、靶向疗法、冷冻疗法、超声疗法、光动力疗法、射频消融等。在一些实施方案中,所述癌症曾是先前疗法难治的。

[0279] 可以通过本发明的方法治疗的实体癌的例子包括但不限于胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、非小细胞肺癌以外的肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、结肠癌、上皮癌、胃癌、

脾癌、皮肤癌、胶质母细胞瘤以外的脑癌、肾癌、甲状腺癌等。在一些实施方案中,所述个体患有淋巴瘤,如霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤(T或B细胞型)。

[0280] 在一些实施方案中,所述癌症是液体肿瘤,包括累及血液和/或骨髓的癌症。在一些实施方案中,所述个体患有血液障碍(或癌症),如白血病,例如急性髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、或毛细胞白血病(HCL)。在一些实施方案中,所述个体患有骨髓增生异常综合征(MDS)。在一些实施方案中,所述个体患有骨髓增生性障碍,如真性红细胞增多症(polycythemia vera)(也称为PV、PCV或真性红细胞增多症(polycythemia rubra vera,PRV))、原发性血小板增多症(ET)或骨髓纤维化。在一些实施方案中,所述个体患有由轻链疾病引起的淀粉样变性、华氏巨球蛋白血症(WM)、意义不明的单克隆丙球蛋白病(MGUS)或浆细胞白血病(PCL)。

[0281] 特别地,在一些实施方案中,所述癌症与CD19的表达相关或以CD19的表达为特征,所述癌症如表达CD19的癌症,如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)或B细胞淋巴瘤。

[0282] BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物的示例性施用途包括但不限于静脉、腔内、瘤内、动脉内、肌内、皮下、肠胃外、经粘膜、透皮、眼部、局部、腹膜内、颅内、胸膜内和表皮途径,或递送到已知含有癌细胞的淋巴腺、体间隙、器官或组织中。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物静脉施用。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物通过输注施用。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物皮下施用。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物通过注射施用。

[0283] 在一些实施方案中,将本文所述的BSAP(例如CD19×CD3BSAP)或其药物组合物通过静脉输注施用。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物经不超过约24小时、20小时、15小时、10小时、8小时、6小时、3小时、2小时、1小时、30分钟或更短时间中的任一个的时间段向个体(例如人)输注。在一些实施方案中,将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物经约30分钟至约1小时、约1小时至约2小时、约2小时至约4小时、约4小时至约6小时、约6小时至约8小时、约8小时至约10小时、约10小时至约12小时、约12小时至约18小时、约18小时至约24小时、约30分钟至约2小时、约2小时至约5小时、约5小时至约10小时、约10小时至约20小时、约30分钟至约10小时、或约30分钟至约20小时中的任一个的时间段向个体输注。可以将本文所述的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物以任何合适的速率向个体输注。在一些实施方案中,可以将BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物以大于约0.01μg/kg/hr、0.02μg/kg/hr、0.05μg/kg/hr、0.1μg/kg/hr、0.2μg/kg/hr、0.5μg/kg/hr、0.6μg/kg/hr、0.7μg/kg/hr、0.8μg/kg/hr、0.9μg/kg/hr、1μg/kg/hr、1.5μg/kg/hr、2μg/kg/hr、3μg/kg/hr、4μg/kg/hr、5μg/kg/hr、10μg/kg/hr、15μg/kg/hr、20μg/kg/hr、25μg/kg/hr、50μg/kg/hr、75μg/kg/hr、100μg/kg/hr或更高速率中的任一个的速率输注。

[0284] 向个体(例如人)施用的BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物的给药方案可根据特定BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)组合物(如药物组合物)、施用方法以及正在治疗的癌症的特定类型和阶段而变化。在一些实施方案中,BSAP(例如CD19×CD3 BSAP)或其药物组合物的所述有效量低于诱导毒理学效应(即,超过临床上可接受的毒性水平的效应)的水

平,或处于当将组合物施用至个体时潜在副作用可被控制或耐受的水平。

[0285] 在一些实施方案中,BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物的有效量低于在中枢神经系统中诱导不良作用的水平。例如,在抗体疗法中观察到的不良作用是发生输注相关的副作用,如细胞因子释放综合征(“CRS”),其重度的病例称为“细胞因子风暴”。当“细胞因子风暴”被诱导时,健康个体的免疫系统被激活并释放大量促炎性细胞因子,如INF- γ 、CCL2、IIL-10、IL-6等。它是一种潜在的致命免疫反应,通常由细胞因子与免疫细胞之间的正反馈环路组成,其中各种细胞因子的水平高度升高。与CRS相关的其他不良副作用是疲劳、呕吐、心动过速、高血压、背痛,但也包括中枢神经系统反应(CNS反应),如癫痫、脑病、脑水肿、无菌性脑膜炎和头痛。在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物以不诱导细胞因子释放综合征(如细胞因子风暴)的剂量施用。在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物以不诱导一种或多种选自IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF和INF- γ 的细胞因子显著释放的剂量施用。在一些实施方案中,细胞因子的显著释放是细胞因子经至少约1小时、2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、18小时、24小时或更长时间中的任一个的历程的持续释放。在一些实施方案中,细胞因子的显著释放是浓度为至少约1、5、10、20、50、100、200、500、1000或更多pg/mL中的任一个的血清或血液细胞因子水平。在不受任何理论束缚的情况下,本文所述的BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物需要与靶肿瘤细胞上的肿瘤抗原(例如CD19)结合,以便募集和激活T细胞。这样的需求可以在不存在预期靶肿瘤细胞的情况下大大减少不需要的细胞因子风暴以及不需要的T细胞激活。

[0286] 在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物以不超过约0.01 μ g/kg、0.05 μ g/kg、0.1 μ g/kg、0.5 μ g/kg、1 μ g/kg、2 μ g/kg、5 μ g/kg、10 μ g/kg、15 μ g/kg、20 μ g/kg、25 μ g/kg、30 μ g/kg、50 μ g/kg、100 μ g/kg、150 μ g/kg、200 μ g/kg、250 μ g/kg、300 μ g/kg、400 μ g/kg、500 μ g/kg、600 μ g/kg、700 μ g/kg、800 μ g/kg、900 μ g/kg、或1 mg/kg中的任一个的剂量施用。

[0287] 可以将有效量的BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物以单剂量或多剂量施用。对于包括以多剂量施用BSAP (例如CD19×CD3BSAP) 或其药物组合物的方法来说,示例性给药频率包括但不限于每日、每日不间断、每周、每周不间断、三周中的两周、四周中的三周、每三周一次、每两周一次、每月、每六个月、每年等。在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物约每2周、每3周、每4周、每6周或每8周施用一次。在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物以至少约每周1×、2×、3×、4×、5×、6×、或7×(即每日)中的任一个频率施用。在一些实施方案中,每次施用之间的间隔小于约3年、2年、12个月、11个月、10个月、9个月、8个月、7个月、6个月、5个月、4个月、3个月、2个月、1个月、4周、3周、2周、1周、6天、5天、4天、3天、2天或1天中的任一个。在一些实施方案中,每次施用之间的间隔大于约1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、2年或3年中的任一个。在一些实施方案中,在给药时间表中没有间断。

[0288] 可以将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物的施用延长一个延长的时间段,如从约1天至约一周,从约一周至约一个月,从约一个月至约一年,从约一年至约若干年。在一些实施方案中,将BSAP (例如CD19×CD3 BSAP) 或其药物组合物在至少约1天、2天、3

天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、5周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年或更长时间中的任一个的时间段内施用。

[0289] 实施例

[0290] 下文的实施例和上文的示例性实施方案意图仅是本发明的示例,并且因此不应认为其以任何方式限制本发明。以下实施例和详细描述是以说明而不是限制的方式来提供。对于其中没有描述实验方法细节的实施方案,此类方法是根据常规条件如Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)描述的或按制造商建议的那些常规条件来进行的。

[0291] 本发明中提及的所有参考文献通过引用并入本文,就如同这些参考文献中的每一个都单独通过引用并入一样。尽管描述涉及特定实施方案,但本领域技术人员将清楚的是可以改变这些特定细节来实践本发明。因此,本发明不应被解释为限于本文阐述的实施方案。

[0292] 实施例1. 示例性双特异性抗原结合蛋白的表达和纯化

[0293] 双特异性抗原结合蛋白(BSAP)是使用标准方案来表达。将编码BSAP的第一多肽和第二多肽的DNA片段克隆到基于pBOS的载体中,以产生表达所述第一多肽和所述第二多肽的构建体。所述构建体还含有编码信号肽的序列,以促进第一多肽和第二多肽蛋白的分泌。

[0294] 表1示出了示例性CD19×CD3 BSAP的氨基酸序列及编码所述氨基酸序列的核酸序列。图1A描绘了这些示例性CD19×CD3 BSAP的结构。本文展示的示例性CD19×CD3 BSAP包含经由接头连接至抗CD19 Fab的VH的N末端的抗CD3 scFv。

[0295] 表1. 示例性CD19×CD3双特异性抗原结合蛋白

蛋白质代码	第一多肽的氨基酸序列	第二多肽的氨基酸序列	编码第一多肽的核酸序列	编码第二多肽的核酸序列	接头
ITAB2003	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:33 (GRAGGG)
[0296] ITAB2005	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:33 (GRAGGG)
ITAB2006	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:22 (GRAGGGG AGGGG)
ITAB2009	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:21 (SGGGGS)

[0297] 以CD19×CD3 BSAP ITAB2003为例,将编码ITAB2003的第一多肽的DNA片段(核酸序列SEQ ID NO:32)和编码ITAB2003的第二多肽的DNA片段(核酸序列SEQ ID NO:31)分别克隆到载体pcDNA中,然后亚克隆到基于pBOS的载体中,并且编码ITAB2003的第一多肽和第二多肽的DNA片段还各自包含Kozak序列和信号肽序列(氨基酸序列SEQ ID NO:25,核酸序列SEQ ID NO:26),由此产生表达CD19×CD3 BSAP ITAB2003的第一多肽和第二多肽的构建体。类似地构建其他示例性CD19×CD3 BSAP。测序结果表明基因插入正确。将这些构建体转

化到大肠杆菌中以获得转染级质粒DNA。使HEK293细胞在EXPI293™表达培养基(Invitrogen)中生长。为了转染,将含有质粒DNA(编码BSAP的第一多肽和第二多肽的DNA构建体)和25 kD聚乙烯亚胺(PEI;DNA/线性25 kD PEI重量比为1:3)的10 mL培养基添加至90 mL细胞培养物中。可替代地,将约30μg DNA混合物(编码BSAP的第一多肽和第二多肽的DNA构建体)使用ExpiFectamine 293转染试剂盒(Invitrogen)根据制造商的说明书转染到HEK293细胞中。将转染的细胞在CO₂培养箱(37℃,5%CO₂,125 rpm)中培养约6天,然后收集上清液。

[0298] 将细胞培养上清液用IgG-CH1亲和色谱(Thermo Fisher Scientific)纯化以获得目标蛋白。将细胞培养上清液通过0.22μm无菌膜过滤,加载到用150 mM NaCl和10 mM磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.5)平衡的IgG-CH1亲和基质上,并用150 mM NaCl和50 mM NaAc缓冲液(pH 3.5)洗脱。将洗脱物采用2 M Tris洗脱调节至pH 7.2,并用截留分子量为10 kD的Vivaspin离心浓缩器(Sartorius)浓缩。将纯化的蛋白质保存在4℃。

[0299] 实施例2.CD19×CD3 BSAP的结合亲和力的测定

[0300] 抗原结合亲和力

[0301] 使用具有抗人IgG Fc Capture(AHC)生物传感器的Octet QK®测量示例性CD19×CD3 BSAP ITAB2009内的抗CD19 Fab和抗CD3 scFv与相应的人(“Hu”)和食蟹猴(“Cyno”)抗原的结合亲和力。人CD3抗原构建体(CD3εAA 1-27.Fc)和食蟹猴CD3抗原构建体(cynoCD3εAA 1-27.Fc)各自自由与人IgG Fc连接的CD3ε氨基酸残基1-27的肽组成。抗原构建体的表达描述于US 8,846,042中。将CD3或CD19抗原构建体(食蟹猴/恒河猴CD19蛋白(Fc标签),Sino Biological.公司;重组人CD19 Fc嵌合体,R&D Systems,Inc.)用稀释缓冲液(PBS)稀释至0.02 mg/mL,并且然后固定在抗人Fc捕获(AHC)生物传感器上。在黑色微板中将CD19×CD3 BSAP ITAB2009稀释至不同浓度,然后与固定化的相应抗原构建体反应。还设立了仅含PBS的对照孔。将检测结果用ForteBio数据分析软件进行分析。

[0302] 如表2所示,CD19×CD3 BSAP ITAB2009展现出与人和食蟹猴CD19和CD3抗原构建体二者良好的体外结合亲和力,证实了CD19×CD3BSAP在人和食蟹猴中的交叉反应性。

[0303] 表2.CD19×CD3 BSAP ITAB2009与CD19和CD3抗原的体外结合亲和力

[0304]	结合结构域	抗原构建体	Kd (M)
	抗CD19 Fab	huCD19.Fc	1.82×10^{-8}
		cynoCD19.Fc	2.96×10^{-8}
	抗CD3 结合结构域(scFv)	CD3εAA 1-27.Fc	2.35×10^{-8}
		cyno CD3εAA 1-27.Fc	1.29×10^{-8}

[0305] 细胞结合亲和力

[0306] 进行以下结合测定以确定示例性CD19×CD3 BSAP分别与人外周血单核细胞(huPBMC)和食蟹猴cynoPBMC中的T细胞和B细胞的结合亲和力。

[0307] 人PBMC制备:将来自健康成人的白细胞浓缩样品用PBS缓冲液(Gibco)稀释,通过密度梯度离心(Ficoll-Paque,GE Healthcare)离心获得PBMC。将细胞收集并重悬浮于含有10%FBS的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0308] CynoPBMC制备:将来自食蟹猴的全血样品用PBS缓冲液(Gibco)稀释,通过使用90%的Ficoll-Paque分离缓冲液(通过用PBS稀释Ficoll-Paque获得,Ficoll-Paque,GE

Healthcare)的密度梯度离心进行离心以获得PBMC,用PBS洗涤两次,然后在室温下以1000 g离心10 min。将细胞收集并重悬浮于含有10%FBS的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0309] 将约 3.6×10^5 个PBMC(huPBMC或cynoPBMC)/孔添加至96孔板中。将CD19×CD3 BSAP ITAB2009使用FACS缓冲液(具有1%FBS的PBS)稀释至不同浓度,然后根据实验设计添加至96孔板中,并在室温孵育45 min。还设立了不含ITAB2009的对照组(1%FBS/PBS+PBMC)。将细胞用FACS缓冲液洗涤一次,重悬浮于50μL FACS缓冲液中,补充抗体PE小鼠抗人CD20(BD Pharmingen™)、FITC小鼠抗人CD4(BD Pharmingen™)和APC小鼠抗人Ig,κ轻链(BD Pharmingen™),并在室温孵育45 min。最后添加200μL FACS缓冲液,并使用ACCURI®C6细胞仪(BD Biosciences)分析样品。

[0310] 结合率绘于y轴上,并且药物浓度绘于x轴上。使用4参数逻辑斯谛模型拟合曲线以测定EC50。检测结果示于表3和图2A-2B中。

[0311] 表3.CD19×CD3 BSAP ITAB2009结合PBMC的EC50 (ng/mL)

[0312]	结构域	抗CD3结合结构域(scFv)		抗CD19 Fab	
		人T细胞	食蟹猴T细胞	人B细胞	食蟹猴B细胞
	EC50(ng/mL)	204	115	35	1900

[0313] 结果表明,CD19×CD3 BSAP ITAB2009展现出与人和食蟹猴PBMC二者中的T细胞和B细胞的良好结合亲和力。

[0314] 总之,示例性CD19×CD3 BSAP展现出对来自人和食蟹猴二者的抗原的体外交叉反应性。CD19×CD3 BSAP的交叉反应性有益于将来自食蟹猴毒性研究的结果外推到人类临床研究中。

[0315] 实施例3.CD19×CD3 BSAP介导的PBMC针对自体B细胞的细胞毒性的体外活性

[0316] 根据实施例2所述的方法制备人和食蟹猴PBMC,并将它们重悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0317] 将约 3×10^5 个PBMC的200μL(每孔)添加至96孔板的每个孔中,并且根据实验设计将稀释至不同浓度的CD19×CD3 BSAP ITAB2003、ITAB2005和ITAB2006添加至96孔板中。同时设立不含药物的对照孔(仅PBMC)。将混合物孵育于37℃、5%CO₂约18-24小时。然后将细胞收获并与抗体FITC小鼠抗人CD20(BD Pharmingen™)在室温下孵育30分钟。添加2μg/mL的碘化丙啶(Sigma)并染色15分钟。使用ACCURI C6(BD Bioscience)进行分析。

[0318] 碘化丙啶(PI)是一种常用的核荧光染料。PI不能穿透完整的细胞膜,因此不能对细胞膜完整的活细胞进行染色;当死细胞失去膜完整性时,PI可以进入细胞内与DNA结合。因此PI染色可用于鉴定死细胞。CD20阳性指示活B细胞,而CD20和PI二者均阳性的细胞指示死B细胞。使用以下公式计算CD19×CD3 BSAP介导的细胞毒性:死亡率=[1-(样品孔存活B细胞/样品孔总B细胞)/(对照孔存活B细胞/对照孔总B细胞)]×100%。

[0319] 死亡率绘于y轴上,并且药物浓度绘于x轴上。使用4参数逻辑斯谛模型拟合曲线以测定EC50。测定结果示于表4和图3A-3B中。

[0320] 表4.CD19×CD3 BSAP介导的PBMC针对自体B细胞的细胞毒性的EC50值 (ng/mL)

[0321]	蛋白质代码	食蟹猴PBMC	人PBMC
	ITAB2003	>2088	2.1

ITAB2005	33.5	0.3
ITAB2006	18.5	0.2

[0322] 结果证实,CD19×CD3 BSAP可介导食蟹猴PBMC或人PBMC杀伤自体B细胞。在所测试的BSAP中,ITAB2006(接头由SEQ ID NO:22GRAGGGGAGGGG组成,接头长度为12个氨基酸残基)介导的食蟹猴PBMC针对自体B细胞的细胞杀伤活性与ITAB2005(接头由SEQ ID NO:33 GAGGG组成,接头长度为6个氨基酸残基)介导的细胞杀伤活性相似。参见图3A。类似地,ITAB2006介导的人PBMC针对自体B细胞的杀伤活性与ITAB2005介导的相似(图3B)。值得注意的是,ITAB2005和ITAB2006二者在介导PBMC针对自体B细胞的细胞毒性方面与ITAB2003介导的相比具有显著提高的生物学活性。对于食蟹猴PBMC来说,ITAB2005或ITAB2006介导的细胞杀伤活性是ITAB2003介导的细胞杀伤活性的至少约62倍,并且对于人PBMC来说,是ITAB2003介导的细胞杀伤活性的至少约7倍。

[0323] 实施例4.CD19×CD3 BSAP介导的人PBMC针对肿瘤细胞的细胞毒性(细胞毒性测定)

[0324] 根据实施例2所述的方法制备人PBMC,并将它们重悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0325] 将Raji细胞(靶细胞,伯基特淋巴瘤细胞系,CD19+)洗涤并离心,用DiOC18(3)(3,3'-双十八烷基氧碳花菁高氯酸盐,Life technologies)染色15分钟,并重悬浮于含有10%FBS的RPMI-1640培养基(Gibco)中。使用DiOC18(3)对靶细胞膜进行染色。将100μL 3×10⁴个/孔的Raji细胞和100μL 3×10⁵个/孔的人PBMC添加至96孔板的每个孔中。然后将测试CD19×CD3BSAP(例如ITAB2003、ITAB2009)根据实验设计以不同浓度添加至细胞混合物中。设立不含药物的孔(PBMC+Raji靶细胞)、仅含Raji靶细胞的孔和仅含PBMC细胞的孔作为对照。在37℃和5%CO₂下进行约48小时的孵育。然后将细胞通过碘化丙啶(PI,Sigma)染色以标记死细胞。还设立了未染色的对照孔。使用ACCURI C6细胞仪(BD Bioscience)进行分析。

[0326] DiOC18(3)阳性细胞代表活Raji细胞,并且DiOC18(3)和碘化丙啶均呈阳性的细胞代表死Raji细胞。使用以下公式计算CD19×CD3 BSAP介导的肿瘤细胞毒性:死亡率=[1-(样品孔存活Raji细胞/样品孔总Raji细胞)/(对照孔存活Raji细胞/对照孔总Raji细胞)]×100%

[0327] 死亡率绘于y轴上,并且药物浓度绘于x轴上。使用4参数逻辑斯谛模型拟合曲线以测定EC50。测定结果示于图4中。

[0328] 如图4所示,示例性CD19×CD3 BSAP可介导人PBMC杀伤Raji肿瘤细胞。ITB2009的EC50是0.04 ng/mL。ITB2003的EC50是0.49 ng/mL。结果证实,ITAB2009在介导人PBMC杀伤肿瘤细胞(例如Raji)方面具有显著增强的活性,并且其杀伤活性是ITAB2003介导的杀伤活性的约12倍。

[0329] 还使用相似的方法测定了CD19×CD3 BSAP ITAB2009介导的人PBMC针对肿瘤细胞Daudi(伯基特淋巴瘤细胞系,CD19+)和Reh(ALL细胞系,CD19+)的杀伤活性。杀伤率绘于y轴上,并且药物浓度绘于x轴上。使用4参数逻辑斯谛模型拟合曲线以测定EC50。测定结果示于表5中。这些结果表明,CD19×CD3 BSAP(例如ITAB2009)介导T细胞针对淋巴瘤和急性成淋巴细胞性白血病(ALL)二者的体外细胞毒性。

[0330] 表5.CD19×CD3 BSAP介导的人PBMC针对肿瘤细胞的细胞毒性的EC50值

[0331]	细胞系名称	代表性癌症类型	EC50 (ng/mL)
	Raji	人伯基特淋巴瘤细胞	0.04
	Daudi	人伯基特淋巴瘤细胞	0.06
	Reh	人急性成淋巴细胞性白血病细胞	0.24

[0332] 实施例5. 在免疫重建小鼠模型中CD19×CD3 BSAP在杀伤皮下人淋巴瘤肿瘤异种移植物方面的功效测定

[0333] 为了检查示例性CD19×CD3 BSAP对抑制人肿瘤异种移植物生长的作用,对具有用人淋巴细胞重建并植入了人B细胞淋巴瘤肿瘤细胞(Raji)的免疫系统的免疫缺陷小鼠进行体内药物功效测定。注射利妥昔单抗(抗CD20 Ab, **Maetro®**, 上海罗氏制药有限公司(Shanghai Roche Pharmaceutical Co., Ltd.))作为阳性对照治疗B细胞淋巴瘤。

[0334] 雌性免疫缺陷小鼠NOD SCID(NOD.Cg-Prkdc^{scid}II2rg^{tm1Sug}/Jic Cr1)购自北京维通利华实验动物技术有限公司(Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Ltd.),并在SPF级动物设施中饲养。

[0335] 首先对小鼠腹膜内注射白消安(Sigma)以根除骨髓细胞。第三天,收集体外培养的Raji细胞(伯基特淋巴瘤细胞系),在冰上预冷的无血清培养基中彻底混合并重悬浮,并皮下接种到NOD小鼠右背侧(每只动物接种约 2.0×10^6 个肿瘤细胞)。接种日定义为D0。4天后,将健康人捐献的白细胞浓缩样品收集,通过密度梯度离心(Ficoll-Paque, GE Healthcare)进行离心以获得PBMC,重悬浮于在冰上预冷的无血清培养基中,并且腹膜内接种到NOG小鼠中(每只动物接种约 3.0×10^6 个PBMC)。在肿瘤体积达到100-350mm³时(D14),将40只动物基于肿瘤体积分成5组(每组8只动物),为媒介物对照组、50μg/kg ITAB2009治疗组、5μg/kg ITAB2009治疗组、0.5μg/kg ITAB2009治疗组、和10 mg/kg利妥昔单抗阳性对照组。

[0336] 将待测试的CD19×CD3 BSAP ITAB2009使用无菌过滤媒介物缓冲液(PBS+0.05% Tween-80)稀释至所需浓度,并以0.1 mL体积/10 g体重(分别对应于50μg/kg、5μg/kg、和0.5μg/kg的剂量)每日对小鼠腹膜内施用。对媒介物对照组中的动物施用相同体积的媒介物。将阳性对照药物利妥昔单抗使用无菌过滤媒介物(PBS+0.05% Tween-80)稀释至所需浓度,并且以0.1 mL体积/10 g体重(对应于10 mg/kg的剂量)每周腹膜内施用至小鼠,共4次。

[0337] 每周两次评估动物的体重和肿瘤体积。根据如下公式计算肿瘤体积:肿瘤体积(mm³)=长度(mm)×宽度(mm)×宽度(mm)×0.5。肿瘤生长抑制率(TGI%)用于评价药物功效。 $TGI\% = [1 - (avT_i - avT_0) / (avC_i - avC_0)] \times 100$,其中avT_i-avT₀是对于治疗组,第i天的平均肿瘤大小减去首次给药当天的平均肿瘤大小,并且avC_i-0是对于媒介物对照组,第i天的平均肿瘤大小减去首次给药当天的平均肿瘤大小。

[0338] 如图5所示,在媒介物对照组中,Raji肿瘤细胞在皮下接种于已经用人外周血单核细胞进行免疫重建的NOG小鼠后正常生长。在媒介物对照组中,在接种后D29,肿瘤平均体积达到 3947.66 ± 560.72 mm³。如图5所示,将不同剂量的CD19×BSAP ITAB2009连续施用15天,从而以剂量依赖性方式抑制NOG小鼠中人B细胞淋巴瘤细胞Raji肿瘤异种移植物的生长。在第29天,ITAB2009 0.5μg/kg治疗组、5μg/kg治疗组、以及50μg/kg治疗组的肿瘤生长抑制(TGI)分别是34.53% (p=0.5791)、77.21% (p=0.2339)、以及95.07% (p=0.0077);在50μg/kg治疗组中8只动物中有1只已完成肿瘤消退而无肿瘤负荷。在利妥昔单抗10 mg/kg组中,每周施用利妥昔单抗部分地抑制了Raji肿瘤生长(TGI=44.17%, p=0.9983,

D29),但与媒介物对照组相比无统计学显著性差异。CD19×CD3 BSAP ITAB2009 5μg/kg治疗组和50μg/kg治疗组展现的治疗功效显著优于利妥昔单抗10 mg/kg治疗组。这些结果证实CD19×CD3 BSAP可介导体内免疫细胞杀伤B细胞淋巴瘤,并以剂量依赖性方式显著抑制肿瘤生长。

[0339] 实施例6.CD19×CD3 BSAP对静脉注射了人原代T细胞和Reh白血病细胞的小鼠存活模型(免疫重建模型)的功效测定

[0340] 为了检查示例性CD19×CD3 BSAP对异种移植肿瘤的生长抑制作用,针对BSAP的体内延长白血病存活期的功效对静脉注射了人前体B细胞(preB)急性成淋巴细胞性白血病(ALL)Reh细胞和人原代T细胞的免疫缺陷NOD/SCID小鼠进行评价。

[0341] 雌性免疫缺陷小鼠NOD/SCID(NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NcrCr1)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,并在SPF级动物设施中饲养。

[0342] 健康人原代T(Pri-T)细胞的培养:将人PBMC如实施例2所述制备,并以 $1.5-2.5 \times 10^6$ /mL的细胞密度重悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI-1640培养基(Gibco)中。将PBMC接种到用小鼠IgG2a抗人CD3抗体(5μg/mL)(BioLegend, Inc.)和小鼠IgG1抗人CD28抗体(1μg/mL)(BioLegend, Inc.)包被的培养瓶中,并在37℃、5%CO₂培养箱中培养。

[0343] 将Reh细胞在含有10%FBS(Gibco)的RPMI-1640培养基(Gibco)中在37℃、5%CO₂培养箱中培养。

[0344] 在NOD/SCID小鼠达到22-24 g时,向每只小鼠的尾静脉中注射 1.0×10^7 个Reh细胞(定义为D0)。在D3,用体外培养的 4.0×10^6 个健康人原代T细胞经由尾静脉接种每只小鼠。将动物基于其体重随机分为两组:分别为媒介物对照组(PBST, n=13)和CD19×CD3 BSAP ITAB2009治疗组(n=12)。接种人原代T细胞两小时后,通过腹膜内注射溶剂PBST(媒介物对照组)或ITAB2009(ITAB2009治疗组)来施用于动物。将ITAB2009以每天50μg/kg的剂量施用连续3天;然后将剂量增加至每天100μg/kg,持续连续3天(每次治疗共注射6天的ITAB2009)。使用源自同一供体的人原代T细胞将上述原代T细胞接种和6天的ITAB2009治疗周期重复3次(即人原代T细胞接种日期为D9、D15、和D21,并且总的ITAB2009给药期为24天);在最后三次施用区段期间,每只小鼠接种的人原代T细胞的量为 1.0×10^7 个。

[0345] 每日监测动物行为,并且记录小鼠体重。如果动物体重下降超过15%,则停止施用BSAP。在动物展现虚弱、显著体重减轻、后肢麻痹或恶病质时,即认为是白血病症状的开始,然后对动物实施安乐死并进行样品收集。收集样品包括:1)实验结束时,从颌下静脉收集外周血,并用EDTA.2K处理以抗凝,然后以按体积计1:1的稀释度添加PBS;2)收集小鼠脾脏,并用PBS溶液冲洗一次。将洗涤的脾脏研磨以获得脾细胞,然后将脾细胞通过细胞筛过滤以获得单细胞悬浮液,并用PBS冲洗一次;3)取小鼠后肢股骨,然后去除附着的肌肉及结缔组织。将股骨的两端切断。使用1 mL注射器用PBS溶液洗涤骨髓,收集细胞,并通过细胞筛过滤以获得单细胞悬浮液,然后用PBS冲洗一次;4)将收集的细胞用PE小鼠抗人CD19抗体(Abeam)在室温下染色1小时,PE小鼠IgG1κ同种型对照抗体(BD Biosciences)用作对照。添加红细胞裂解液,并在室温下静置15分钟。以200×g离心10分钟,小心丢弃上清液。然后将细胞沉淀物用FACS测定缓冲液(含有1%FBS的PBS)重悬浮,然后用于荧光激活细胞分选(FACS)分析,以计算人CD19+肿瘤细胞在总细胞中的比例。

[0346] 生成小鼠卡普兰-迈耶存活曲线,并计算各组的中值存活期。通过对数秩检验来计

算P值,当 $p < 0.05$ 时认为有统计学显著性;并且使用对数秩计算危险比和95%置信区间(95%CI)。

[0347] 如上文所述,用Reh细胞和4次的源自同一健康志愿者的原代T细胞经由尾静脉接种NOD/SCID小鼠。如图6所示,媒介物对照组内的小鼠逐渐发展由白血病细胞侵入骨髓中枢神经系统所致的白血病症状,包括显著体重减轻和后肢瘫痪;媒介物对照组小鼠的中值存活时间为35天。 $CD19 \times CD3$ BSAP ITAB2009治疗显著延缓疾病进展,并显著延长小鼠存活期(中值存活期为53.5天,对数秩分析 $p < 0.0001$)。在终点(D70),ITAB2009治疗组内仍有三只小鼠存活。ITAB2009治疗组的危险比为0.2294,并且95%CI为0.087至0.603。

[0348] 实验结束时,如上文所述收集小鼠血液样品、脾细胞、和骨髓细胞,并通过FACS测量人CD19阳性肿瘤细胞的比例。实验结果示于表6中。

[0349] 表6. 在Reh白血病异种移植小鼠模型中的存活以及在外周血、脾脏和骨髓中人CD19阳性肿瘤细胞的比例

	媒介物对照组, n=13					ITAB2009治疗组, n=12				
	动物 编号	动物 存活 期(天)	外周血 中的 CD19+ 肿瘤(%)	脾细 胞中 的 CD19 +肿 瘤 (%)	骨髓 细胞 中的 CD19 +肿 瘤 (%)	动物 编 号	动物 存活 期(天)	外周血 中的 CD19+ 肿瘤(%)	脾细 胞中 的 CD19 +肿 瘤 (%)	骨髓 细胞 中的 CD19 +肿 瘤 (%)
[0350]	1	29	10.2	0	35	14	57	0	1.1	0.1
	2	29	2.8	0	56.5	15	48	N/A	N/A	N/A
	3	39	15.2	0	52.1	16	39	7.3	0	15.4
	4	35	0.7	0	39.1	17	50	1.1	15.5	47.5
	5	35	5.3	0	33	18	70*	0	0	21.1
	6	50	N/A	19.3	86	19	45	2.1	1.9	1.3
	7	39	29.7	0	59.8	20	70*	0	0	13.5
	8	30	5.7	0	45.8	21	57	0	3.1	3.9
	9	30	1.2	0	40.8	22	59	0.4	0.4	0.4
	10	35	29.5	0	45.4	23	70*	0	0	0.5
	11	35	2.9	0	18.6	24	45	N/A	N/A	N/A
	12	34	22.1	0	50.6	25	50	0.2	15.5	6.7
	13	38	17.9	0	53.6					

[0351] *在终点(D70)存活的动物

[0352] 这些结果证实:在媒介物对照组中,在所有小鼠的外周血中均检测到CD19阳性细胞,占总白细胞的0.7%至29.7%;在仅一只小鼠的脾脏中检测到CD19阳性细胞;并且在所有小鼠的骨髓中均检测到CD19阳性细胞,占总细胞的18.6%至86%。

[0353] 在 $CD19 \times CD3$ BSAP ITAB2009治疗组中,在5只小鼠的外周血中检测到人CD19阳性细胞,占总白细胞的0.2%至7.3%;在6只小鼠的脾脏中检测到人CD19阳性细胞,占总细胞的0.4%至15.5%;在所有小鼠的骨髓中均检测到人CD19阳性细胞,占总细胞的0.1%至47.5%。这些CD19+比率均低于媒介物对照组中的比率。因此,CD19 $\times$ CD3 BSAP可显著降低CD19阳性细胞的数量和分数,证实了其显著的治疗功效。

[0354] 本实验证实,经由尾静脉接种了CD19阳性人急性成淋巴细胞性白血病Reh细胞的NOD/SCID小鼠可发展白血病症状,并且可充当人ALL肿瘤异种移植模型。在人原代T细胞

作为效应细胞存在的情况下,以不同剂量施用的CD19×CD3 BSAP ITAB2009显著延长了肿瘤异种移植小鼠的存活期(媒介物对照组和ITAB2009治疗组的中值存活期:35天与53.5天, $p<0.0001$,危险比0.2294,95%CI[0.087至0.603])。这些结果表明,本文所述的CD19×CD3 BSAP可介导免疫细胞杀伤CD19+肿瘤细胞(如急性成淋巴细胞性白血病细胞),显著抑制肿瘤细胞生长,并延长患者存活期。

[0355] 实施例7.在食蟹猴中CD19×CD3 BSAP的临床前研究

[0356] 进行毒理学研究以评价示例性CD19×CD3 BSAP在食蟹猴中的体内作用。将40只食蟹猴随机分为4组($n=10$ /组,5F/5M):媒介物对照组、ITAB2009 3 μ g/kg治疗组、ITAB2009 10 μ g/kg治疗组和ITAB2009 30 μ g/kg治疗组。将ITAB2009用0.002% Tween 20/5%葡萄糖溶液(w/v)的载体稀释,并通过2小时静脉输注施用,每周3次,持续连续4周,共13剂,随后为4周恢复期。对于每次施用,治疗组分别接受3 μ g/kg、10 μ g/kg、和30 μ g/kg ITAB2009。与治疗组的给药时间表相似,媒介物对照组通过2小时静脉输注仅接受载体。首次施用日定义为第1天。对每组三只雄性和3只雌性在最后一次输注的次日实施安乐死,并且对其余动物在恢复4周后实施安乐死。对每只安乐死动物的组织和器官进行组织病理学检查。

[0357] 对动物的临床观察结果、体重、行为、食物摄入、和粪便等进行监测。进行功能观察组合试验(functional observational battery,FOB)以评价动物的行为和神经功能。使用FACS(BD FACSCalibur)分析不同时间点的CD20+B淋巴细胞亚型。通过人IL-6 ELISA试剂盒分析血清IL-6水平。使用流式微珠阵列试剂盒(BD PHARMINGENTM)和FACS(BD FACSCalibur)对血清样品的生化参数以及包括IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF- α 和IFN- γ 在内的细胞因子水平进行分析。

[0358] 在研究期间,没有观察到任何一组猴子的死亡。在输注区域没有观察到刺激性或溃烂。用ITAB2009治疗的食蟹猴没有一只出现CNS症状的任何病征。

[0359] 如图7所示,在治疗组中,CD20+B淋巴细胞的绝对计数在首次静脉施用ITAB2009后第3天开始呈剂量依赖性降低。在4周的恢复期期间,在治疗组中降低的B淋巴细胞数量恢复至基线水平。在重复给药期间持续的B淋巴细胞耗尽证实了ITAB2009的药理学作用。

[0360] 如图8A-8D所示,在治疗组中,在首次静脉施用ITAB2009后,观察到血清ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天冬氨酸转氨酶)、CK(肌酸磷酸激酶)和LDH(乳酸脱氢酶)水平的短暂和剂量依赖性诱导。然而,在相同时间点,在各治疗组与媒介物对照组之间没有统计学显著性差异。这些生化参数的血清水平在第9天后朝基线水平下降。组织病理学检查未观察到动物中相应器官的病理学变化。

[0361] 对于所有治疗组,在首次静脉施用ITAB2009后的第1天,在大多数食蟹猴中观察到IL-6水平的短暂升高。ITAB2009 10 μ g/kg治疗组中的一只食蟹猴经历了最高的IL-6诱导(第1天为4151 pg/mL)。所有治疗组的血清IL-6浓度在第8天恢复至基线水平。在第1天在10 μ g/kg和30 μ g/kg治疗组中也观察到血清IL-2(≤ 145.8 pg/mL)和TNF- α (≤ 1336.8 pg/mL)浓度的短暂升高,然后在第8天逐渐下降至基线水平。在第1天在30 μ g/kg治疗组中,血清IL-5浓度略有升高(≤ 2.3 pg/mL)。在所有治疗组中,血清IL-4和IFN- γ 浓度在施用ITAB2009后均无显著变化。没有明显的与升高的细胞因子水平相关的临床观察结果。

[0362] 组织病理学检查显示与ITAB2009相关的显微病理学变化限于10 μ g/kg和30 μ g/kg治疗组在最后一次输注(第29天)后的脾脏。显微镜下可见脾脏生发中心细胞数量轻度至中

度减少。在其他指定器官中未观察到与测试品相关的病理学变化。恢复4周后,10 μ g/kg和30 μ g/kg治疗组中脾脏的生发中心细胞数量完全恢复。

[0363] 这些结果证实,示例性CD19 $\times$ CD3 BSAP在食蟹猴中具有良好的安全性和耐受性特征。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 亿一生物技术有限公司
[0003]	<120> 双特异性抗原结合蛋白及其用途
[0004]	<130> 72062-20009.41
[0005]	<140> 尚未分配
[0006]	<141> 与此一起
[0007]	<150> CN201811041588.X
[0008]	<151> 2018-09-07
[0009]	<160> 61
[0010]	<170> 用于Windows 4.0版的FastSEQ
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 5
[0013]	<212> PRT
[0014]	<213> 人工序列
[0015]	<220>
[0016]	<223> 合成构建体
[0017]	<400> 1
[0018]	Ser Tyr Val Met His
[0019]	1 5
[0020]	<210> 2
[0021]	<211> 14
[0022]	<212> PRT
[0023]	<213> 人工序列
[0024]	<220>
[0025]	<223> 合成构建体
[0026]	<400> 2
[0027]	Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr
[0028]	1 5 10
[0029]	<210> 3
[0030]	<211> 12
[0031]	<212> PRT
[0032]	<213> 人工序列
[0033]	<220>
[0034]	<223> 合成构建体
[0035]	<400> 3
[0036]	Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr
[0037]	1 5 10
[0038]	<210> 4
[0039]	<211> 16
[0040]	<212> PRT
[0041]	<213> 人工序列

[0042]	<220>
[0043]	<223> 合成构建体
[0044]	<400> 4
[0045]	Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
[0046]	1 5 10 15
[0047]	<210> 5
[0048]	<211> 7
[0049]	<212> PRT
[0050]	<213> 人工序列
[0051]	<220>
[0052]	<223> 合成构建体
[0053]	<400> 5
[0054]	Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser
[0055]	1 5
[0056]	<210> 6
[0057]	<211> 9
[0058]	<212> PRT
[0059]	<213> 人工序列
[0060]	<220>
[0061]	<223> 合成构建体
[0062]	<400> 6
[0063]	Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Ile Thr
[0064]	1 5
[0065]	<210> 7
[0066]	<211> 121
[0067]	<212> PRT
[0068]	<213> 人工序列
[0069]	<220>
[0070]	<223> 合成构建体
[0071]	<400> 7
[0072]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly
[0073]	1 5 10 15
[0074]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0075]	20 25 30
[0076]	Val Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0077]	35 40 45
[0078]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0079]	50 55 60
[0080]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0081]	65 70 75 80
[0082]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0083]	85 90 95

[0084]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
[0085]	100 105 110
[0086]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0087]	115 120
[0088]	<210> 8
[0089]	<211> 112
[0090]	<212> PRT
[0091]	<213> 人工序列
[0092]	<220>
[0093]	<223> 合成构建体
[0094]	<400> 8
[0095]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly
[0096]	1 5 10 15
[0097]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
[0098]	20 25 30
[0099]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0100]	35 40 45
[0101]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
[0102]	50 55 60
[0103]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
[0104]	65 70 75 80
[0105]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
[0106]	85 90 95
[0107]	Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0108]	100 105 110
[0109]	<210> 9
[0110]	<211> 5
[0111]	<212> PRT
[0112]	<213> 人工序列
[0113]	<220>
[0114]	<223> 合成构建体
[0115]	<400> 9
[0116]	Thr Tyr Ala Met Asn
[0117]	1 5
[0118]	<210> 10
[0119]	<211> 19
[0120]	<212> PRT
[0121]	<213> 人工序列
[0122]	<220>
[0123]	<223> 合成构建体
[0124]	<400> 10
[0125]	Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

[0126]	1	5	10	15
[0127]	Val Lys Asp			
[0128]	<210> 11			
[0129]	<211> 14			
[0130]	<212> PRT			
[0131]	<213> 人工序列			
[0132]	<220>			
[0133]	<223> 合成构建体			
[0134]	<400> 11			
[0135]	His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr			
[0136]	1	5	10	
[0137]	<210> 12			
[0138]	<211> 14			
[0139]	<212> PRT			
[0140]	<213> 人工序列			
[0141]	<220>			
[0142]	<223> 合成构建体			
[0143]	<400> 12			
[0144]	Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn			
[0145]	1	5	10	
[0146]	<210> 13			
[0147]	<211> 7			
[0148]	<212> PRT			
[0149]	<213> 人工序列			
[0150]	<220>			
[0151]	<223> 合成构建体			
[0152]	<400> 13			
[0153]	Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro			
[0154]	1	5		
[0155]	<210> 14			
[0156]	<211> 9			
[0157]	<212> PRT			
[0158]	<213> 人工序列			
[0159]	<220>			
[0160]	<223> 合成构建体			
[0161]	<400> 14			
[0162]	Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val			
[0163]	1	5		
[0164]	<210> 15			
[0165]	<211> 125			
[0166]	<212> PRT			
[0167]	<213> 人工序列			

[0168]	<220>
[0169]	<223> 合成构建体
[0170]	<400> 15
[0171]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0172]	1 5 10 15
[0173]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0174]	20 25 30
[0175]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0176]	35 40 45
[0177]	Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0178]	50 55 60
[0179]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0180]	65 70 75 80
[0181]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0182]	85 90 95
[0183]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0184]	100 105 110
[0185]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[0186]	115 120 125
[0187]	<210> 16
[0188]	<211> 109
[0189]	<212> PRT
[0190]	<213> 人工序列
[0191]	<220>
[0192]	<223> 合成构建体
[0193]	<400> 16
[0194]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0195]	1 5 10 15
[0196]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0197]	20 25 30
[0198]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[0199]	35 40 45
[0200]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
[0201]	50 55 60
[0202]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
[0203]	65 70 75 80
[0204]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0205]	85 90 95
[0206]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0207]	100 105
[0208]	<210> 17
[0209]	<211> 249

[0210]	<212>	PRT
[0211]	<213>	人工序列
[0212]	<220>	
[0213]	<223>	合成构建体
[0214]	<400>	17
[0215]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0216]	1	5 10 15
[0217]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr	
[0218]	20	25 30
[0219]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0220]	35	40 45
[0221]	Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp	
[0222]	50	55 60
[0223]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	
[0224]	65	70 75 80
[0225]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[0226]	85	90 95
[0227]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe	
[0228]	100	105 110
[0229]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly	
[0230]	115	120 125
[0231]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val	
[0232]	130	135 140
[0233]	Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu	
[0234]	145	150 155 160
[0235]	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn	
[0236]	165	170 175
[0237]	Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly	
[0238]	180	185 190
[0239]	Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu	
[0240]	195	200 205
[0241]	Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp	
[0242]	210	215 220
[0243]	Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe	
[0244]	225	230 235 240
[0245]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0246]	245	
[0247]	<210>	18
[0248]	<211>	102
[0249]	<212>	PRT
[0250]	<213>	人工序列
[0251]	<220>	

[0252]	<223> 合成构建体															
[0253]	<400> 18															
[0254]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
[0255]	1				5					10					15	
[0256]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
[0257]				20					25					30		
[0258]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[0259]				35				40					45			
[0260]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[0261]		50					55					60				
[0262]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[0263]	65					70				75					80	
[0264]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[0265]				85					90						95	
[0266]	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser										
[0267]				100												
[0268]	<210> 19															
[0269]	<211> 106															
[0270]	<212> PRT															
[0271]	<213> 人工序列															
[0272]	<220>															
[0273]	<223> 合成构建体															
[0274]	<400> 19															
[0275]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
[0276]	1				5					10					15	
[0277]	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
[0278]				20					25					30		
[0279]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
[0280]			35					40					45			
[0281]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
[0282]		50					55					60				
[0283]	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
[0284]	65					70				75					80	
[0285]	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
[0286]				85					90						95	
[0287]	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu						
[0288]				100					105							
[0289]	<210> 20															
[0290]	<211> 6															
[0291]	<212> PRT															
[0292]	<213> 人工序列															
[0293]	<220>															

[0294]	<223> 合成构建体
[0295]	<400> 20
[0296]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser
[0297]	1 5
[0298]	<210> 21
[0299]	<211> 6
[0300]	<212> PRT
[0301]	<213> 人工序列
[0302]	<220>
[0303]	<223> 合成构建体
[0304]	<400> 21
[0305]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0306]	1 5
[0307]	<210> 22
[0308]	<211> 12
[0309]	<212> PRT
[0310]	<213> 人工序列
[0311]	<220>
[0312]	<223> 合成构建体
[0313]	<400> 22
[0314]	Gly Arg Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
[0315]	1 5 10
[0316]	<210> 23
[0317]	<211> 483
[0318]	<212> PRT
[0319]	<213> 人工序列
[0320]	<220>
[0321]	<223> 合成构建体
[0322]	<400> 23
[0323]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0324]	1 5 10 15
[0325]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0326]	20 25 30
[0327]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0328]	35 40 45
[0329]	Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0330]	50 55 60
[0331]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0332]	65 70 75 80
[0333]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0334]	85 90 95
[0335]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0336]	100	105	110
[0337]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
[0338]	115	120	125
[0339]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val		
[0340]	130	135	140
[0341]	Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu		
[0342]	145	150	155
[0343]	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn		
[0344]	165	170	175
[0345]	Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly		
[0346]	180	185	190
[0347]	Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu		
[0348]	195	200	205
[0349]	Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp		
[0350]	210	215	220
[0351]	Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe		
[0352]	225	230	235
[0353]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln		
[0354]	245	250	255
[0355]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser		
[0356]	260	265	270
[0357]	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val		
[0358]	275	280	285
[0359]	Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
[0360]	290	295	300
[0361]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[0362]	305	310	315
[0363]	Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met		
[0364]	325	330	335
[0365]	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0366]	340	345	350
[0367]	Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[0368]	355	360	365
[0369]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
[0370]	370	375	380
[0371]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
[0372]	385	390	395
[0373]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
[0374]	405	410	415
[0375]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
[0376]	420	425	430
[0377]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		

[0378]	435	440	445
[0379]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
[0380]	450	455	460
[0381]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Pro		
[0382]	465	470	475
[0383]	Pro Cys Ser		480
[0384]	<210> 24		
[0385]	<211> 223		
[0386]	<212> PRT		
[0387]	<213> 人工序列		
[0388]	<220>		
[0389]	<223> 合成构建体		
[0390]	<400> 24		
[0391]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly		
[0392]	1	5	10
[0393]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val		15
[0394]	20	25	30
[0395]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0396]	35	40	45
[0397]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro		
[0398]	50	55	60
[0399]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile		
[0400]	65	70	75
[0401]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His		80
[0402]	85	90	95
[0403]	Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0404]	100	105	110
[0405]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0406]	115	120	125
[0407]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0408]	130	135	140
[0409]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0410]	145	150	155
[0411]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		160
[0412]	165	170	175
[0413]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0414]	180	185	190
[0415]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[0416]	195	200	205
[0417]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Pro Pro Cys Ser		
[0418]	210	215	220
[0419]	<210> 25		

[0420]	<211>	19
[0421]	<212>	PRT
[0422]	<213>	人工序列
[0423]	<220>	
[0424]	<223>	合成构建体
[0425]	<400>	25
[0426]		Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
[0427]		1 5 10 15
[0428]		Val His Ser
[0429]	<210>	26
[0430]	<211>	57
[0431]	<212>	DNA
[0432]	<213>	人工序列
[0433]	<220>	
[0434]	<223>	合成构建体
[0435]	<400>	26
[0436]		atggaatgga gctgggtc ttttcttcttc ctgtcagtaa cgactgggtgt ccaactcc 57
[0437]	<210>	27
[0438]	<211>	222
[0439]	<212>	PRT
[0440]	<213>	人工序列
[0441]	<220>	
[0442]	<223>	合成构建体
[0443]	<400>	27
[0444]		Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly
[0445]		1 5 10 15
[0446]		Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
[0447]		20 25 30
[0448]		Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0449]		35 40 45
[0450]		Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
[0451]		50 55 60
[0452]		Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
[0453]		65 70 75 80
[0454]		Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
[0455]		85 90 95
[0456]		Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0457]		100 105 110
[0458]		Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0459]		115 120 125
[0460]		Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0461]		130 135 140

[0462]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
[0463]	145					150				155					160	
[0464]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
[0465]					165					170					175	
[0466]	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
[0467]				180					185						190	
[0468]	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
[0469]			195					200					205			
[0470]	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys		
[0471]		210					215					220				
[0472]	<210> 28															
[0473]	<211> 493															
[0474]	<212> PRT															
[0475]	<213> 人工序列															
[0476]	<220>															
[0477]	<223> 合成构建体															
[0478]	<400> 28															
[0479]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0480]	1			5					10					15		
[0481]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Thr	Tyr
[0482]			20					25					30			
[0483]	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[0484]		35					40					45				
[0485]	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
[0486]		50				55				60						
[0487]	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr
[0488]	65				70				75					80		
[0489]	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
[0490]				85				90					95			
[0491]	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
[0492]			100				105						110			
[0493]	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
[0494]		115					120						125			
[0495]	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val
[0496]		130					135					140				
[0497]	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu
[0498]	145				150					155					160	
[0499]	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn
[0500]				165						170					175	
[0501]	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly
[0502]			180					185					190			
[0503]	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu

[0504]	195	200	205
[0505]	Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp		
[0506]	210	215	220
[0507]	Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe		
[0508]	225	230	235
[0509]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Ala Gly Gly Gly Gln		
[0510]	245	250	255
[0511]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser		
[0512]	260	265	270
[0513]	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val		
[0514]	275	280	285
[0515]	Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
[0516]	290	295	300
[0517]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[0518]	305	310	315
[0519]	Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met		
[0520]	325	330	335
[0521]	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0522]	340	345	350
[0523]	Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[0524]	355	360	365
[0525]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
[0526]	370	375	380
[0527]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
[0528]	385	390	395
[0529]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
[0530]	405	410	415
[0531]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
[0532]	420	425	430
[0533]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
[0534]	435	440	445
[0535]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
[0536]	450	455	460
[0537]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Pro		
[0538]	465	470	475
[0539]	Pro Cys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His		
[0540]	485	490	
[0541]	<210> 29		
[0542]	<211> 672		
[0543]	<212> DNA		
[0544]	<213> 人工序列		
[0545]	<220>		

[0546]	<223> 合成构建体
[0547]	<400> 29
[0548]	gatgttgtga tgactcagtc tcccagcagc atccccgtga ccttgggcca gtctgtgtcc 60
[0549]	atcagctgca gaagcagcaa gagcctgcag aacgtcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
[0550]	ttccagcagc ggcttggcca gtctccccag ctgtctgatct accgatgag caacctgaac 180
[0551]	agcggcgtgc ccgatagatt ttctggctct ggcagcggca ccgacttcac cctgagaatc 240
[0552]	tccggcgtgg aaccgagga cgtgggcgtg tactactgta tgcagcacct ggaatacccc 300
[0553]	atcaccttcg gagccggcac caagctggag atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
[0554]	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
[0555]	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 480
[0556]	tccggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
[0557]	agcagacccc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
[0558]	gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgtcca 660
[0559]	ccgtgctcct ag 672
[0560]	<210> 30
[0561]	<211> 1452
[0562]	<212> DNA
[0563]	<213> 人工序列
[0564]	<220>
[0565]	<223> 合成构建体
[0566]	<400> 30
[0567]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
[0568]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct 120
[0569]	ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
[0570]	tattatgccg attcagtga agaccggctc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
[0571]	ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatata ctgtgtgaga 300
[0572]	catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg 360
[0573]	gtcacctctc cttcaggtgg cgggtggcagc ggccgtgggt ggtccgggtg cggcggatct 420
[0574]	caggtctgtg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagc agtcaactctc 480
[0575]	acctgtcgtc caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaaactg ggtccagcag 540
[0576]	aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtgtgtacca acaagcagc tccaggtacc 600
[0577]	cctgcccggc tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgtg 660
[0578]	cagcctgagg acgagctga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 720
[0579]	ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaagt ggcggtggag gatctcaggt gcagctgggtg 780
[0580]	cagtctggcc ccgagctaat caagcctggc ggcagcgtga agatgagctg caaggcctcc 840
[0581]	ggctacacct tcaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgcc agaagcctgg acagggcctg 900
[0582]	gaatggatcg gctacatcaa cccctacaac gatggcacca agtacaacga gaagtccaag 960
[0583]	ggcagagcca cctgaccag cgacaagagc agcagcaccg cctacatgga actgagcagc 1020
[0584]	ctgcggagcg aggacagcg cgtgtactat tgtgccagag gcacctacta ctacggcagc 1080
[0585]	cgggtgttcg actactgggg acagggcacc acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 1140
[0586]	ggcccatccg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 1200
[0587]	ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc 1260

[0588]	gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	1320
[0589]	ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac	1380
[0590]	gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtcca	1440
[0591]	ccgtgctcat ag	1452
[0592]	<210>	31
[0593]	<211>	669
[0594]	<212>	DNA
[0595]	<213>	人工序列
[0596]	<220>	
[0597]	<223>	合成构建体
[0598]	<400>	31
[0599]	gatgttgtga tgactcagtc tcccagcagc atccccgtga ccctgggcca gtctgtgtcc	60
[0600]	atcagctgca gaagcagcaa gaggctgtg aacagcaacg gcaacaccta cctgtactgg	120
[0601]	ttccagcagc ggcttgcca gtctcccag ctgctgatct accgatgag caacctggcc	180
[0602]	agcggcgtgc ccgatagatt ttctggctct ggcagcggca ccgacttcac cctgagaatc	240
[0603]	tccggcgtgg aaccgagga cgtgggcgtg tactactgta tgcagcacct ggaatacccc	300
[0604]	ctgaccttcg gagccggcac caagctggag atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc	360
[0605]	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
[0606]	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa	480
[0607]	tgggtaact cccaggagag tgacacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc	540
[0608]	agcagacccc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa	600
[0609]	gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgtcca	660
[0610]	ccgtgctag	669
[0611]	<210>	32
[0612]	<211>	1482
[0613]	<212>	DNA
[0614]	<213>	人工序列
[0615]	<220>	
[0616]	<223>	合成构建体
[0617]	<400>	32
[0618]	gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
[0619]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct	120
[0620]	ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca	180
[0621]	tattatgccg attcagtga agaccggttc accatctcca gagacgattc caagaacacg	240
[0622]	ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgtgaga	300
[0623]	catgggaact tcgtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg	360
[0624]	gtcaccgtct cttcaggtgg cggtagcagc ggccgtgggt ggtccgggtg cgccggatct	420
[0625]	caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagc agtcactctc	480
[0626]	acctgtcgt caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaaactg ggtccagcag	540
[0627]	aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtggtacca acaagcagc tccaggtacc	600
[0628]	cctgcccggg tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgtg	660
[0629]	cagcctgagg acgaggctga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc	720

[0630]	ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggg cgcgccggcg gtggacaggt gcagctggtg	780
[0631]	cagtctggcc ccgagctaata caagcctggc ggcagcgtga agatgagctg caaggcctcc	840
[0632]	ggctacacct tcaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgcc agaagcctgg acagggcctg	900
[0633]	gaatggatcg gctacatcaa cccctacaac gatggcacca agtacaacga gaagttcaag	960
[0634]	ggcagagcca ccctgaccag cgacaagagc agcagcaccg cctacatgga actgagcagc	1020
[0635]	ctgcggagcg aggacagcgc cgtgtactat tgtgccagag gcacctacta ctacggcagc	1080
[0636]	cgggtgttcg actactgggg acagggcacc acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag	1140
[0637]	ggccccatcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcgcc	1200
[0638]	ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc	1260
[0639]	gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	1320
[0640]	ctcagcagcg tggtagcctg gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac	1380
[0641]	gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtcca	1440
[0642]	ccgtgcggtg gcgggggctc ccatcatcat catcatcatt ag	1482
[0643]	<210>	33
[0644]	<211>	6
[0645]	<212>	PRT
[0646]	<213>	人工序列
[0647]	<220>	
[0648]	<223>	合成构建体
[0649]	<400>	33
[0650]	Gly Arg Ala Gly Gly Gly	
[0651]	1	5
[0652]	<210>	34
[0653]	<211>	6
[0654]	<212>	PRT
[0655]	<213>	人工序列
[0656]	<220>	
[0657]	<223>	合成构建体
[0658]	<400>	34
[0659]	Pro Leu Gly Leu Ala Gly	
[0660]	1	5
[0661]	<210>	35
[0662]	<211>	499
[0663]	<212>	PRT
[0664]	<213>	人工序列
[0665]	<220>	
[0666]	<223>	合成构建体
[0667]	<400>	35
[0668]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0669]	1	5 10 15
[0670]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr	
[0671]	20	25 30

[0672]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0673]	35 40 45
[0674]	Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0675]	50 55 60
[0676]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0677]	65 70 75 80
[0678]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0679]	85 90 95
[0680]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0681]	100 105 110
[0682]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
[0683]	115 120 125
[0684]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val
[0685]	130 135 140
[0686]	Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu
[0687]	145 150 155 160
[0688]	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
[0689]	165 170 175
[0690]	Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly
[0691]	180 185 190
[0692]	Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu
[0693]	195 200 205
[0694]	Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp
[0695]	210 215 220
[0696]	Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe
[0697]	225 230 235 240
[0698]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Ala Gly Gly Gly Gly
[0699]	245 250 255
[0700]	Ala Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
[0701]	260 265 270
[0702]	Ile Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
[0703]	275 280 285
[0704]	Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln
[0705]	290 295 300
[0706]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys
[0707]	305 310 315 320
[0708]	Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser
[0709]	325 330 335
[0710]	Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser
[0711]	340 345 350
[0712]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val
[0713]	355 360 365

[0714]	Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
[0715]	370	380
[0716]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	
[0717]	385	400
[0718]	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro	
[0719]	405	415
[0720]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val	
[0721]	420	430
[0722]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser	
[0723]	435	445
[0724]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	
[0725]	450	460
[0726]	Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val	
[0727]	465	480
[0728]	Glu Pro Lys Ser Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Gly Ser His His His	
[0729]	485	495
[0730]	His His His	
[0731]	<210> 36	
[0732]	<211> 1500	
[0733]	<212> DNA	
[0734]	<213> 人工序列	
[0735]	<220>	
[0736]	<223> 合成构建体	
[0737]	<400> 36	
[0738]	gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
[0739]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct	120
[0740]	ccaggggaagg ggctggagtg ggtcgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca	180
[0741]	tattatgccg attcagtgaag agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg	240
[0742]	ctgtatctgc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgtgaga	300
[0743]	catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg	360
[0744]	gtcaccgtct cttcaggtgg cgggtggcagc ggcgggtggtg ggtccgggtg cggcggatct	420
[0745]	caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagc agtcactctc	480
[0746]	acctgtcgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccagcag	540
[0747]	aaacctggac aagcaccag ggtctgatt ggtggtacca acaagcagc tccaggtacc	600
[0748]	cctgcccggg tctcaggtc cctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgtg	660
[0749]	cagcctgagg acgaggtga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc	720
[0750]	ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggg cgccggcg gaggtggtgc aggaggcggg	780
[0751]	ggacaggtgc agctggtgca gtctggcccc gagctaacta agcctggcgg cagcgtgaag	840
[0752]	atgagctgca aggcctcgg ctacaccttc accagctacg tgatgcactg ggtgcgccag	900
[0753]	aagcctggac agggcctgga atggatcggc tacatcaacc cctacaacga tggcaccaag	960
[0754]	tacaacgaga agttcaaggg cagagccacc ctgaccagcg acaagagcag cagcaccgcc	1020
[0755]	tacatggaac tgagcagcct gcggagcag gagcgcggc tgtactattg tgccagaggc	1080

[0756] acctactact acggcagccg ggtgttcgac tactggggac agggcaccac ggtcaccgtc 1140
 [0757] tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 1200
 [0758] tctgggggca cagcgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 1260
 [0759] gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttccccgc tgtcctacag 1320
 [0760] tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 1380
 [0761] cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 1440
 [0762] gagcccaaatt cttgtccacc gtgcgggtggc gggggctccc atcatcatca tcatcattag 1500
 [0763] <210> 37
 [0764] <211> 16
 [0765] <212> PRT
 [0766] <213> 人工序列
 [0767] <220>
 [0768] <223> 合成构建体
 [0769] <400> 37
 [0770] Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 [0771] 1 5 10 15
 [0772] <210> 38
 [0773] <211> 7
 [0774] <212> PRT
 [0775] <213> 人工序列
 [0776] <220>
 [0777] <223> 合成构建体
 [0778] <400> 38
 [0779] Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 [0780] 1 5
 [0781] <210> 39
 [0782] <211> 9
 [0783] <212> PRT
 [0784] <213> 人工序列
 [0785] <220>
 [0786] <223> 合成构建体
 [0787] <400> 39
 [0788] Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 [0789] 1 5
 [0790] <210> 40
 [0791] <211> 112
 [0792] <212> PRT
 [0793] <213> 人工序列
 [0794] <220>
 [0795] <223> 合成构建体
 [0796] <400> 40
 [0797] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly

[0798]	1	5	10	15
[0799]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser			
[0800]	20	25	30	
[0801]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
[0802]	35	40	45	
[0803]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro			
[0804]	50	55	60	
[0805]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile			
[0806]	65	70	75	80
[0807]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His			
[0808]	85	90	95	
[0809]	Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0810]	100	105	110	
[0811]	<210> 41			
[0812]	<211> 1			
[0813]	<212> PRT			
[0814]	<213> 人工序列			
[0815]	<220>			
[0816]	<223> 合成构建体			
[0817]	<220>			
[0818]	<221> 变体			
[0819]	<222> 1			
[0820]	<223> 可以以至少一个或多个的重复序列存在			
[0821]	<400> 41			
[0822]	Gly			
[0823]	1			
[0824]	<210> 42			
[0825]	<211> 2			
[0826]	<212> PRT			
[0827]	<213> 人工序列			
[0828]	<220>			
[0829]	<223> 合成构建体			
[0830]	<220>			
[0831]	<221> 变体			
[0832]	<222> (1) .. (2)			
[0833]	<223> 可以以至少一个或多个的重复序列存在			
[0834]	<400> 42			
[0835]	Gly Ser			
[0836]	1			
[0837]	<210> 43			
[0838]	<211> 5			
[0839]	<212> PRT			

[0840]	<213> 人工序列
[0841]	<220>
[0842]	<223> 合成构建体
[0843]	<220>
[0844]	<221> 变体
[0845]	<222> (1) .. (5)
[0846]	<223> 可以以至少一个或多个的重复序列存在
[0847]	<400> 43
[0848]	Gly Ser Gly Gly Ser
[0849]	1 5
[0850]	<210> 44
[0851]	<211> 4
[0852]	<212> PRT
[0853]	<213> 人工序列
[0854]	<220>
[0855]	<223> 合成构建体
[0856]	<220>
[0857]	<221> 变体
[0858]	<222> (1) .. (4)
[0859]	<223> 可以以至少一个或多个的重复序列存在
[0860]	<400> 44
[0861]	Gly Gly Gly Ser
[0862]	1
[0863]	<210> 45
[0864]	<211> 5
[0865]	<212> PRT
[0866]	<213> 人工序列
[0867]	<220>
[0868]	<223> 合成构建体
[0869]	<220>
[0870]	<221> 变体
[0871]	<222> (1) .. (5)
[0872]	<223> 可以以至少一个或多个的重复序列存在
[0873]	<400> 45
[0874]	Gly Gly Gly Gly Ser
[0875]	1 5
[0876]	<210> 46
[0877]	<211> 2
[0878]	<212> PRT
[0879]	<213> 人工序列
[0880]	<220>
[0881]	<223> 合成构建体

[0882] <400> 46
[0883] Gly Gly
[0884] 1
[0885] <210> 47
[0886] <211> 4
[0887] <212> PRT
[0888] <213> 人工序列
[0889] <220>
[0890] <223> 合成构建体
[0891] <400> 47
[0892] Gly Gly Ser Gly
[0893] 1
[0894] <210> 48
[0895] <211> 5
[0896] <212> PRT
[0897] <213> 人工序列
[0898] <220>
[0899] <223> 合成构建体
[0900] <400> 48
[0901] Gly Gly Ser Gly Gly
[0902] 1 5
[0903] <210> 49
[0904] <211> 5
[0905] <212> PRT
[0906] <213> 人工序列
[0907] <220>
[0908] <223> 合成构建体
[0909] <400> 49
[0910] Gly Ser Gly Ser Gly
[0911] 1 5
[0912] <210> 50
[0913] <211> 5
[0914] <212> PRT
[0915] <213> 人工序列
[0916] <220>
[0917] <223> 合成构建体
[0918] <400> 50
[0919] Gly Ser Gly Gly Gly
[0920] 1 5
[0921] <210> 51
[0922] <211> 5
[0923] <212> PRT

[0924]	<213>	人工序列
[0925]	<220>	
[0926]	<223>	合成构建体
[0927]	<400>	51
[0928]	Gly Gly Gly Ser Gly	
[0929]	1	5
[0930]	<210>	52
[0931]	<211>	5
[0932]	<212>	PRT
[0933]	<213>	人工序列
[0934]	<220>	
[0935]	<223>	合成构建体
[0936]	<400>	52
[0937]	Gly Ser Ser Ser Gly	
[0938]	1	5
[0939]	<210>	53
[0940]	<211>	15
[0941]	<212>	PRT
[0942]	<213>	人工序列
[0943]	<220>	
[0944]	<223>	合成构建体
[0945]	<400>	53
[0946]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
[0947]	1	5 10 15
[0948]	<210>	54
[0949]	<211>	5
[0950]	<212>	PRT
[0951]	<213>	人工序列
[0952]	<220>	
[0953]	<223>	合成构建体
[0954]	<400>	54
[0955]	Gly Gly Gly Gly Ser	
[0956]	1	5
[0957]	<210>	55
[0958]	<211>	4
[0959]	<212>	PRT
[0960]	<213>	人工序列
[0961]	<220>	
[0962]	<223>	合成构建体
[0963]	<400>	55
[0964]	Cys Pro Pro Cys	
[0965]	1	

119

[1008]	130	135	140
[1009]	Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu		
[1010]	145	150	155
[1011]	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn		
[1012]		165	170
[1013]	Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly		
[1014]		180	185
[1015]	Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu		
[1016]		195	200
[1017]	Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp		
[1018]	210	215	220
[1019]	Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe		
[1020]	225	230	235
[1021]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Ala Gly Gly Gly Gln		
[1022]		245	250
[1023]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser		
[1024]		260	265
[1025]	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val		
[1026]		275	280
[1027]	Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
[1028]	290	295	300
[1029]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[1030]	305	310	315
[1031]	Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met		
[1032]		325	330
[1033]	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[1034]		340	345
[1035]	Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[1036]		355	360
[1037]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
[1038]	370	375	380
[1039]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
[1040]	385	390	395
[1041]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
[1042]		405	410
[1043]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
[1044]		420	425
[1045]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
[1046]		435	440
[1047]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
[1048]	450	455	460
[1049]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Pro		

[1050]	465	470	475	480
[1051]	Pro Cys			
[1052]	<210> 59			
[1053]	<211> 488			
[1054]	<212> PRT			
[1055]	<213> 人工序列			
[1056]	<220>			
[1057]	<223> 合成构建体			
[1058]	<400> 59			
[1059]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[1060]	1	5	10	15
[1061]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr			
[1062]		20	25	30
[1063]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[1064]		35	40	45
[1065]	Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp			
[1066]		50	55	60
[1067]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr			
[1068]	65	70	75	80
[1069]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
[1070]		85	90	95
[1071]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe			
[1072]		100	105	110
[1073]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly			
[1074]		115	120	125
[1075]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val			
[1076]		130	135	140
[1077]	Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu			
[1078]	145	150	155	160
[1079]	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn			
[1080]		165	170	175
[1081]	Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly			
[1082]		180	185	190
[1083]	Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu			
[1084]		195	200	205
[1085]	Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp			
[1086]		210	215	220
[1087]	Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe			
[1088]	225	230	235	240
[1089]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Ala Gly Gly Gly Gly			
[1090]		245	250	255
[1091]	Ala Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu			

[1092]	260	265	270
[1093]	Ile Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
[1094]	275	280	285
[1095]	Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln		
[1096]	290	295	300
[1097]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys		
[1098]	305	310	315
[1099]	Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser		
[1100]	325	330	335
[1101]	Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser		
[1102]	340	345	350
[1103]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val		
[1104]	355	360	365
[1105]	Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
[1106]	370	375	380
[1107]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
[1108]	385	390	395
[1109]	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
[1110]	405	410	415
[1111]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
[1112]	420	425	430
[1113]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
[1114]	435	440	445
[1115]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
[1116]	450	455	460
[1117]	Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val		
[1118]	465	470	475
[1119]	Glu Pro Lys Ser Cys Pro Pro Cys		
[1120]	485		
[1121]	<210> 60		
[1122]	<211> 1449		
[1123]	<212> DNA		
[1124]	<213> 人工序列		
[1125]	<220>		
[1126]	<223> 合成构建体		
[1127]	<400> 60		
[1128]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60		
[1129]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac acctacgcca tgaactgggt ccgccagget 120		
[1130]	ccaggaagg ggctggagtg ggtcgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180		
[1131]	tattatgccg attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240		
[1132]	ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatatta ctgtgtgaga 300		
[1133]	catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgett actggggcca aggacaatg 360		

[1134]	gtcaccgtct cttcaggtgg cgggtggcagc ggcggtggtg ggtccggtgg cggcggatct	420
[1135]	caggtctgtg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc	480
[1136]	acctgtcgt caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccagcag	540
[1137]	aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtggtacca acaagcgagc tccaggtacc	600
[1138]	cctgcccgg tctcaggtc ctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgtg	660
[1139]	cagcctgagg acgaggtga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc	720
[1140]	ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggg cgcgccggcg gtggacaggt gcagctggtg	780
[1141]	cagtctggcc ccgagctaat caagcctggc ggcagcgtga agatgagctg caaggcctcc	840
[1142]	ggctacacct tcaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgcc agaagcctgg acaggcctg	900
[1143]	gaatggatcg gctacatcaa cccctacaac gatggacca agtacaacga gaagttcaag	960
[1144]	ggcagagcca ccctgaccag cgacaagagc agcagaccg cctacatgga actgagcagc	1020
[1145]	ctgcggagcg aggacagcg cgtgtactat tgtgccagag gcacctacta ctacggcagc	1080
[1146]	cgggtgttcg actactggg acagggcacc acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag	1140
[1147]	ggcccatccg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	1200
[1148]	ctgggtgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc	1260
[1149]	gccctgacca gcggcgtga cacttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	1320
[1150]	ctcagcagcg tggtagcgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac	1380
[1151]	gtgaatcaca agcccagca caccaaggtg gacaagagag ttgagccaa atcttgtcca	1440
[1152]	ccgtgctag	1449
[1153]	<210>	61
[1154]	<211>	1467
[1155]	<212>	DNA
[1156]	<213>	人工序列
[1157]	<220>	
[1158]	<223>	合成构建体
[1159]	<400>	61
[1160]	gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
[1161]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct	120
[1162]	ccaggaagg ggctggagtg ggtcgacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca	180
[1163]	tattatgccg attcagtga agaccggttc accatctcca gagacgattc caagaacacg	240
[1164]	ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgtgaga	300
[1165]	catgggaact tcgtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca aggacaaatg	360
[1166]	gtcaccgtct cttcaggtgg cgggtggcagc ggcggtggtg ggtccggtgg cggcggatct	420
[1167]	caggtctgtg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc	480
[1168]	acctgtcgt caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccagcag	540
[1169]	aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtggtacca acaagcgagc tccaggtacc	600
[1170]	cctgcccgg tctcaggtc ctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgtg	660
[1171]	cagcctgagg acgaggtga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc	720
[1172]	ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggg cgcgccggcg gaggtggtgc aggaggcgtg	780
[1173]	ggacaggtgc agctggtgca gtctggcccc gagctaatac agcctggcgg cagcgtgaag	840
[1174]	atgagctgca aggcctccgg ctacaccttc accagctacg tgatgcactg ggtgcgccag	900
[1175]	aagcctggac agggcctgga atggatcggc tacatcaacc cctacaacga tggcaccaag	960

[1176]	tacaacgaga agttcaaggg cagagccacc ctgaccagcg acaagagcag cagcaccgcc	1020
[1177]	tacatggaac tgagcagcct gcggagcgag gacagcgccg tgtactattg tgccagaggc	1080
[1178]	acctactact acggcagccg ggtgttcgac tactggggac agggcaccac ggtcaccgtc	1140
[1179]	tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc	1200
[1180]	tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	1260
[1181]	gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag	1320
[1182]	tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	1380
[1183]	cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt	1440
[1184]	gagcccaaat cttgtccacc gtgctag	1467

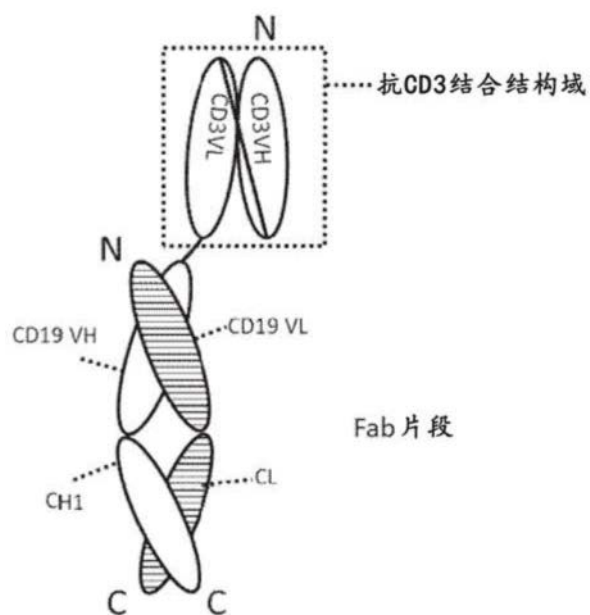


FIG.1A

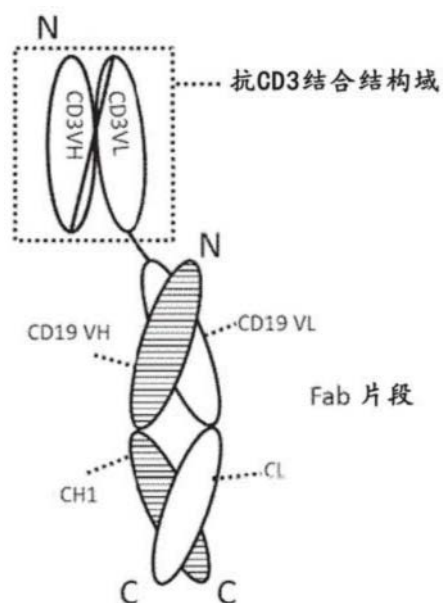


FIG.1B

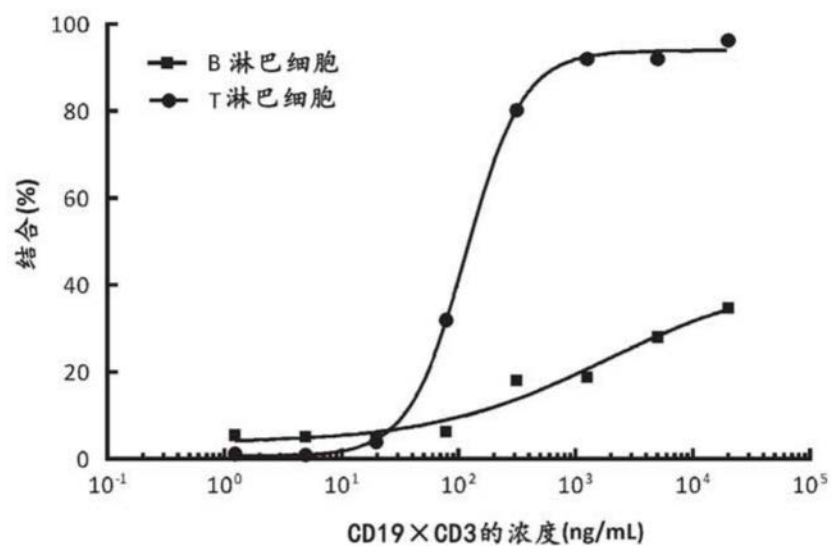


FIG. 2A

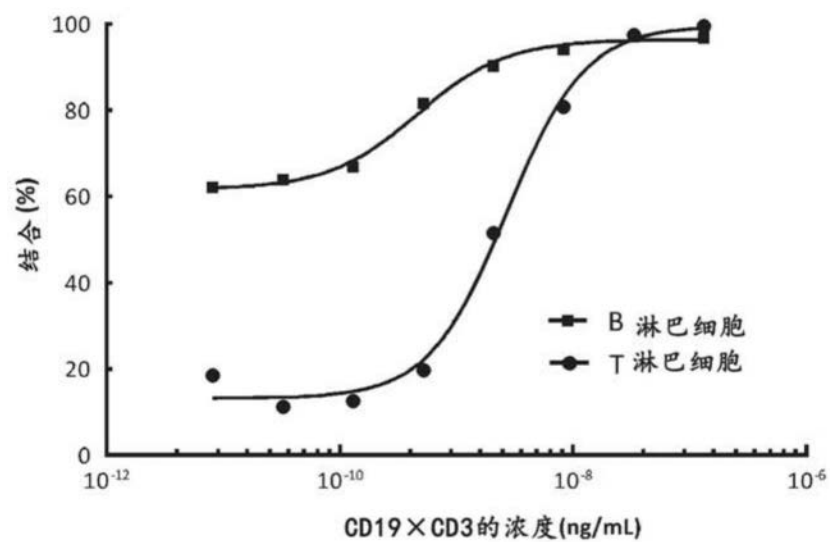


FIG. 2B

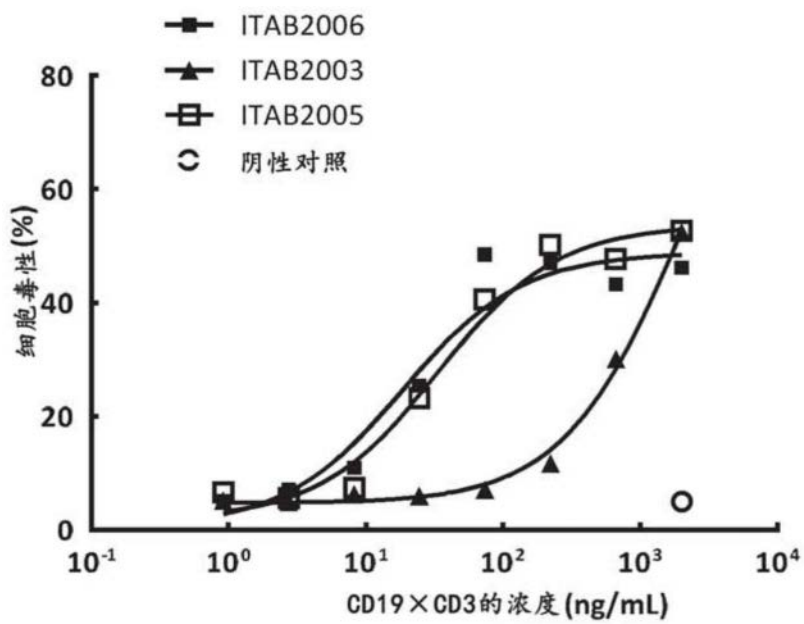


FIG. 3A

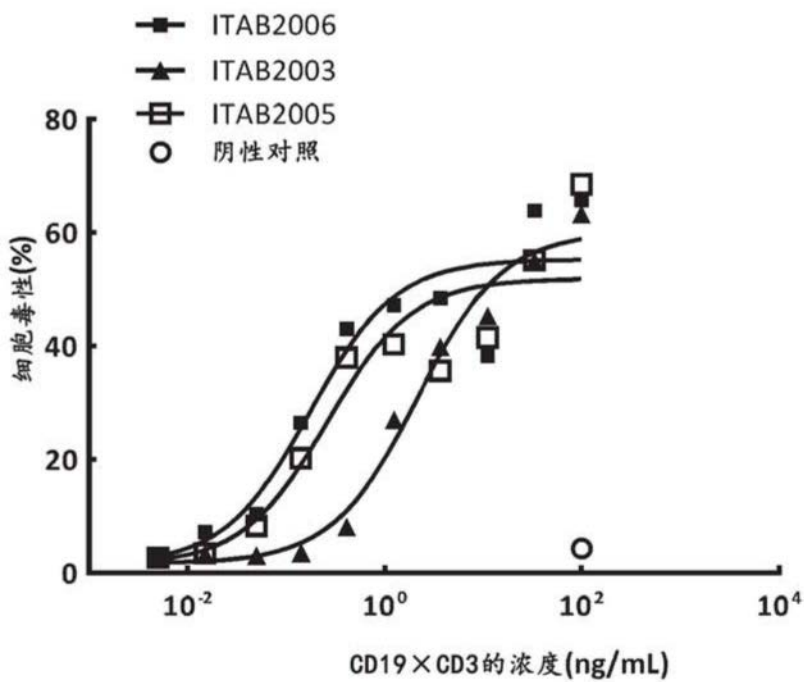


FIG. 3B

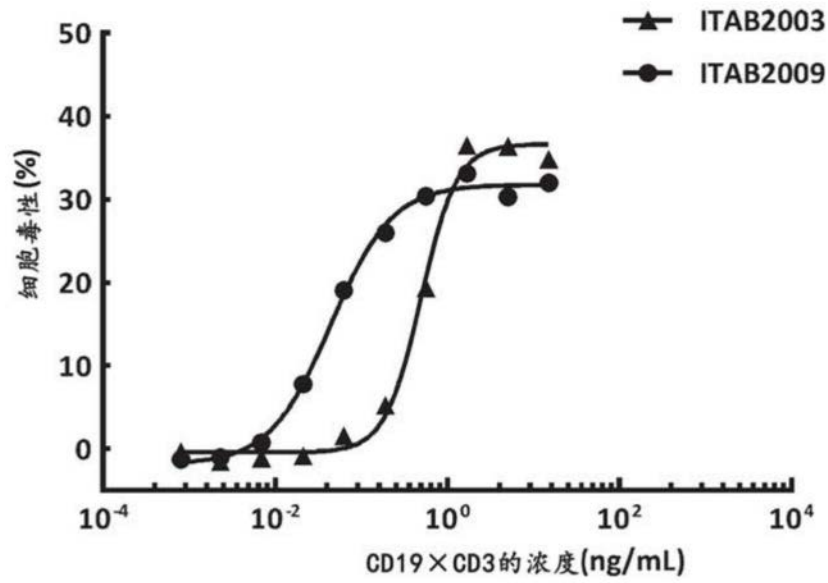


FIG.4

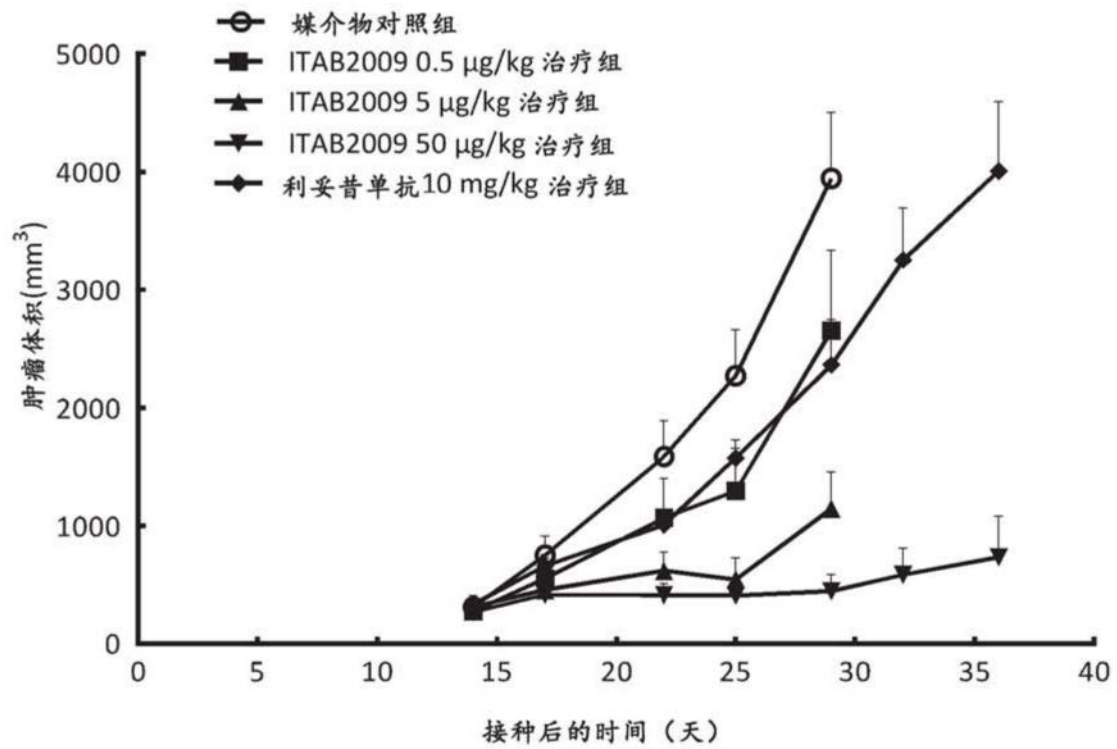


FIG.5

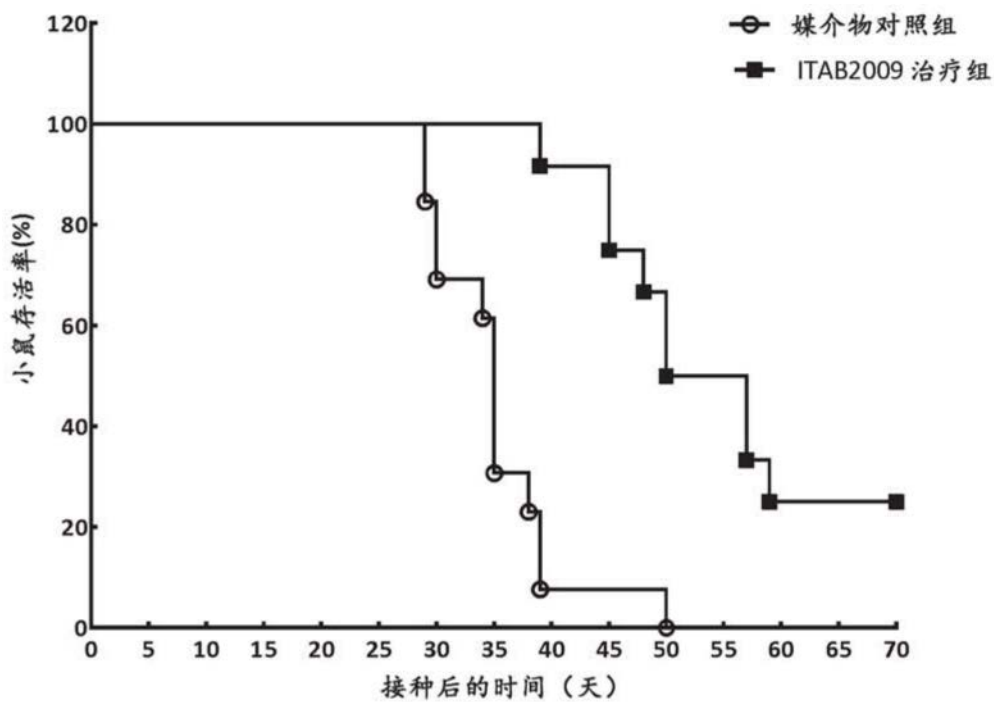


FIG. 6

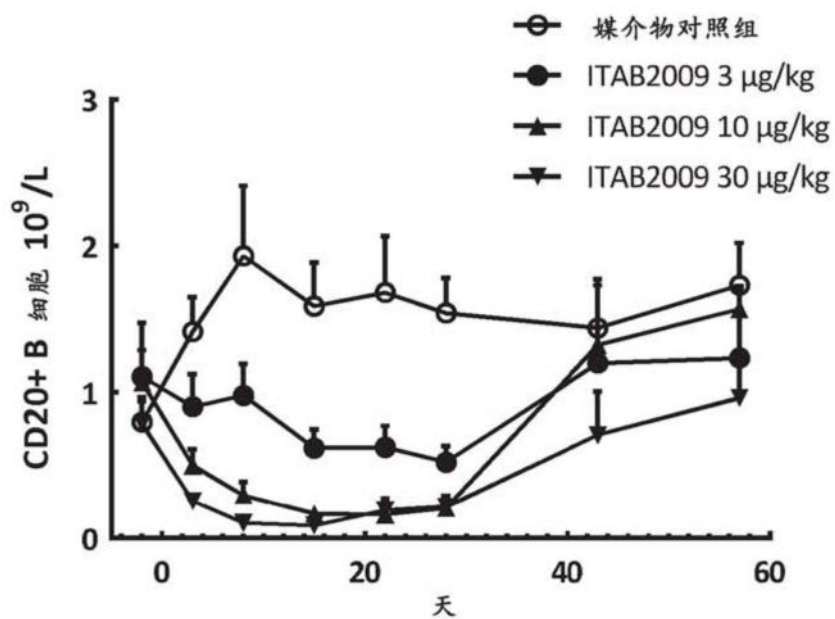


FIG. 7

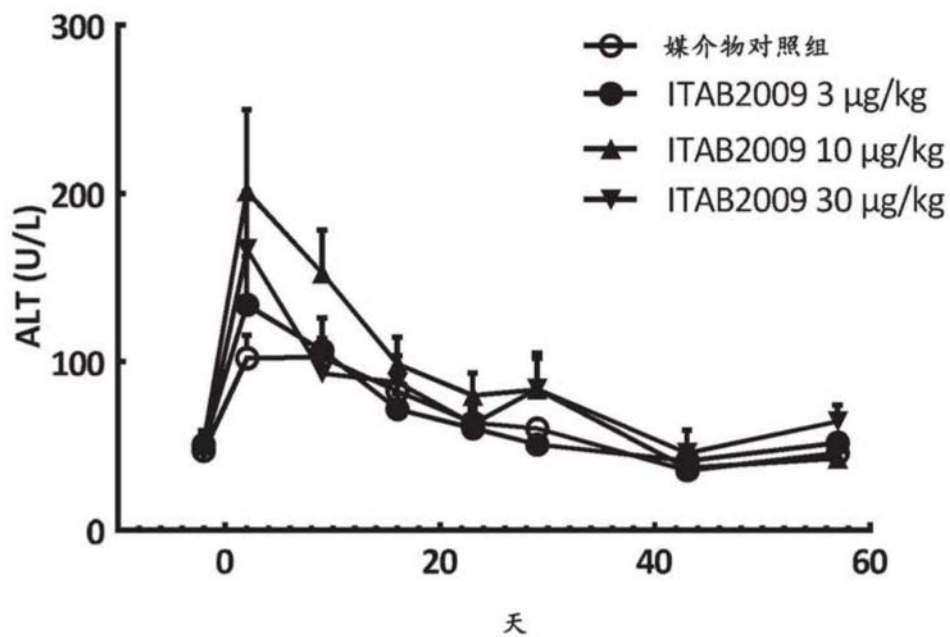


FIG. 8A

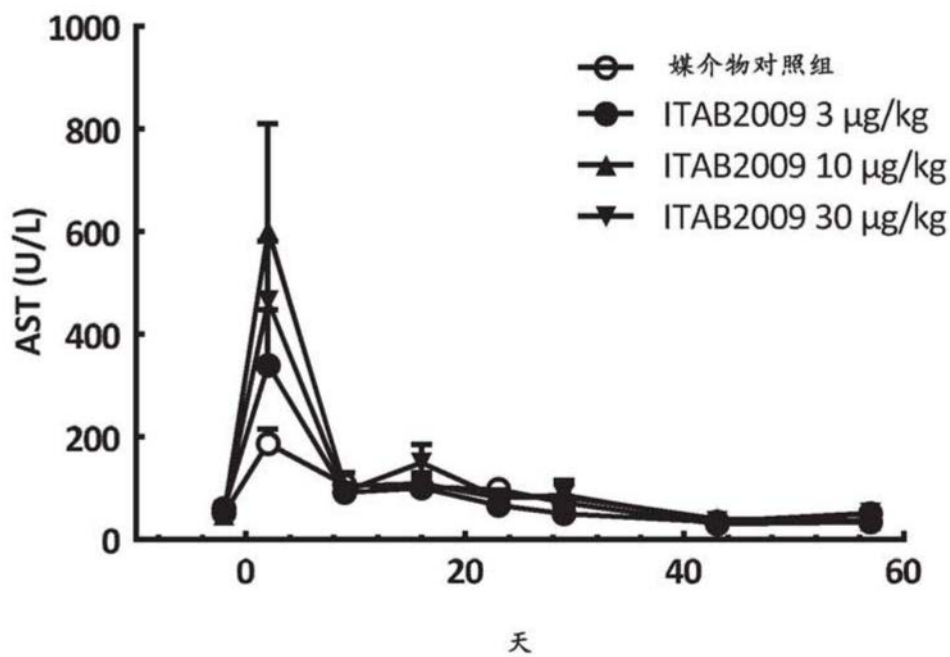


FIG. 8B

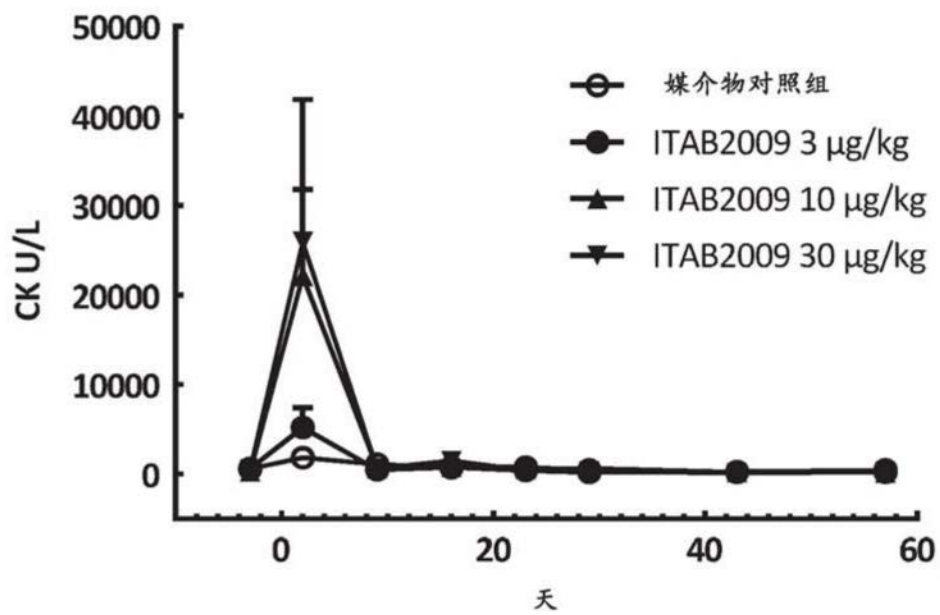


FIG.8C

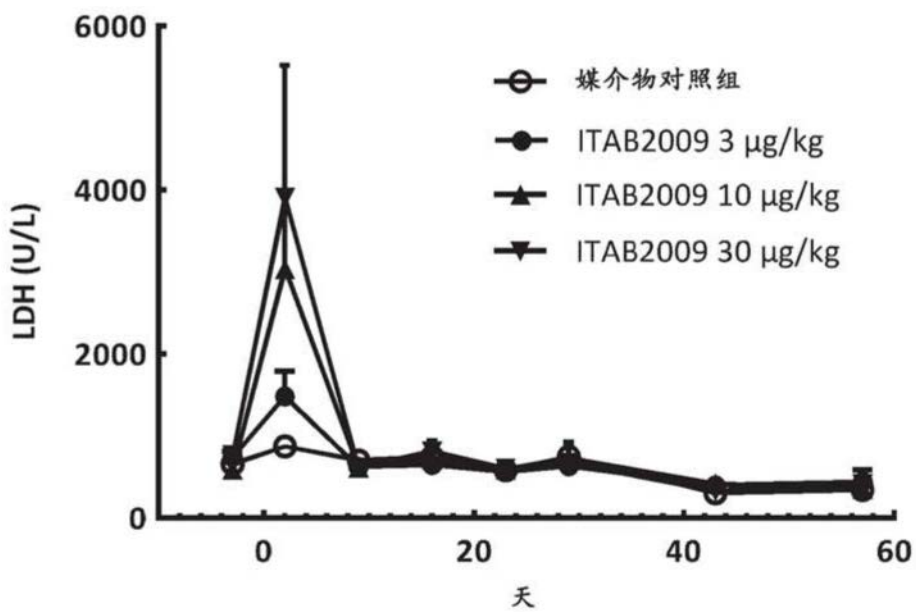


FIG.8D