



(10) 授权公告号 CN 113906054 B

(45) 授权公告日 2024.11.05

(21) 申请号 201980091645.1

(22) 申请日 2019.12.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113906054 A

(43) 申请公布日 2022.01.07

(66) 本国优先权数据
PCT/CN2018/123108 2018.12.24 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/127433 2019.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/135335 EN 2020.07.02

(73) 专利权人 埃泰美德(香港)有限公司
地址 中国香港铜锣湾

(72) 发明人 黄智华 沈武忠 饶以群 崔玉敏
严孝强

(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

(51) Int.Cl.
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105378068 A, 2016.03.02
CN 108026177 A, 2018.05.11
WO 2017157305 A1, 2017.09.21

审查员 靳春鹏

权利要求书4页 说明书92页
序列表30页 附图6页

(54) 发明名称

能够结合CD19和CD3的多特异性抗原结合蛋白及其用途

(57) 摘要

提供了特异性结合CD3和CD19的多特异性抗原结合蛋白(MSAP)。还提供了所述MSAP用于制备药物组合物的用途、治疗癌症的方法、以及包括所述MSAP的药盒。

1. 一种双特异性抗原结合蛋白,所述双特异性抗原结合蛋白包含:

(I) 特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:

(a) 免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区(CH1);和

(b) Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL);

其中所述抗CD3 Fab片段的VH包含如SEQ ID NO:9的氨基酸序列所示的重链高变区H1(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 Fab片段的VL包含如SEQ ID NO:12的氨基酸序列所示的重链高变区L1(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;

(II) 特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含VH,所述VH包含重链高变区H1(HVR-H1)、HVR-H2和HVR-H3,所述HVR-H1如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示,所述HVR-H2如SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示,所述HVR-H3如SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示;并且其中所述抗CD19 scFv包含VL,所述VL包含轻链高变区L1(HVR-L1)、HVR-L2和HVR-L3,所述HVR-L1如SEQ ID NO:47的氨基酸序列所示,所述HVR-L2如SEQ ID NO:48的氨基酸序列所示,所述HVR-L3如SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列所示;和

(III) 任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头,

其中:

i) 所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的VH的N末端;或

ii) 所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的VL的N末端;或

iii) 所述双特异性抗原结合蛋白包含第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的VL的N末端。

2. 如权利要求1所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,且所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的CH1的C末端和CL的C末端各自还包含SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:46的序列。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接。

8. 如权利要求7所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由1至5个二硫键连接。

9. 如权利要求8所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所

述CL由2个二硫键连接。

10. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的重链多肽;和/或其中所述抗CD3 Fab片段包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链多肽。

11. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19 scFv的所述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 scFv的所述VL包含如SEQ ID NO:47的氨基酸序列所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:48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。

12. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19 scFv的所述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 scFv的所述VL包含如SEQ ID NO:47的氨基酸序列所示的HVR-L1、如SEQ ID NO:48的氨基酸序列所示的HVR-L2、和如SEQ ID NO:49的氨基酸序列所示的HVR-L3。

13. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19 scFv的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列。

14. 如权利要求13所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19 scFv的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

15. 如权利要求13所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19 scFv的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

16. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。

17. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述双特异性抗原结合蛋白包含第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv。

18. 如权利要求17所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一抗CD19 scFv和所述第二抗CD19 scFv具有相同氨基酸序列。

19. 如权利要求17所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一抗CD19 scFv和所述第二抗CD19 scFv具有不同氨基酸序列。

20. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述接头包含2至30个氨基酸残基。

21. 如权利要求20所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述接头包含2至15个氨基酸残基。

22. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述接头包含选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。

23. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组。

24. 如权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述双特异性抗原结合蛋白包含第一多肽和第二多肽,其中:

a) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;

b) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;

c) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;

d) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;

e) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;或者

f) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

25. 如权利要求24所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

26. 如权利要求24所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

27. 如权利要求24所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

28. 如权利要求24所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

29. 如权利要求24所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

30. 如权利要求24所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

31. 如权利要求24所述的双特异性抗原结合蛋白,所述双特异性抗原结合蛋白还包括融合至第一多肽和/或第二多肽的N-末端的信号肽。

32. 如权利要求31所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述信号肽包含SEQ ID NO:25的序列。

33. 一种经分离核酸,所述经分离核酸编码权利要求1-32中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白。

34. 如权利要求33所述的经分离核酸,其中所述经分离核酸包含SEQ ID NO:55或56的序列。

35. 一种载体,所述载体包含权利要求33或34所述的经分离核酸。

36. 如权利要求35所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

37. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求33或34所述的经分离核酸,或权利要求35或36所述的载体。

38. 一种制备双特异性抗原结合蛋白的方法,该方法包括:

i) 在适于编码的双特异性抗原结合蛋白表达的条件下培养包含权利要求33或34所述的经分离核酸或权利要求35或36所述的载体的宿主细胞,或培养权利要求37所述的宿主细胞;以及

ii) 从细胞培养物回收表达的双特异性抗原结合蛋白。

39. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-32中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白以及任选的药理学上可接受的载体。

40. 有效量的根据权利要求1-32中任一项所述的双特异性抗原结合蛋白或权利要求39所述的药物组合物在制备用于治疗个体中的CD19阳性癌症的药物中的用途,其中所述CD19阳性癌症选自自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、慢性髓源性白血病(CML)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、以及伯基特氏淋巴瘤。

41. 如权利要求40所述的用途,其中所述药物用于静脉内施用。

42. 如权利要求40或41所述的用途,其中所述个体是人。

43. 如权利要求40或41所述的用途,其中

i) 所述CD19阳性癌症是CML,其中所述CML包括CML的母细胞性危象或与CML相关的埃布森致癌基因;

ii) 所述CD19阳性癌症是CLL,其中所述CLL包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化;和/或

iii) 所述CD19阳性癌症是NHL,其中所述NHL包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)。

44. 如权利要求40或41所述的用途,其中所述CD19阳性癌症是伯基特氏淋巴瘤。

能够结合CD19和CD3的多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12月24日提交的国际专利申请第PCT/CN2018/123108号的优先权权益,所述国际专利申请的内容通过引用以它的整体并入本文。

[0003] 基于ASCII文本文件的序列表的提交

[0004] 基于ASCII文本文件的以下提交文件的内容通过引用以它的整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名称:720622001641SEQLIST.TXT,记录日期:2019年12月11日,大小:54KB)。

技术领域

[0005] 本发明涉及特异性结合CD3和CD19的多特异性抗原结合蛋白(MSAP)。本文还提供了包含所述MSAP的药物组合物、使用所述MSAP治疗癌症的方法、以及包括所述MSAP的药盒。

背景技术

[0006] 在肿瘤组织中,一些抗原是过度表达的,突变的,或选择性突变的。因此,靶向癌细胞的表面上的特定抗原的抗体可被用作癌症治疗剂。B淋巴细胞抗原CD19也被称为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淋巴细胞与恶性B淋巴细胞两者中表达,并且被视为一种B细胞肿瘤相关抗原。它可被用作B淋巴细胞发育、淋巴瘤诊断的生物标志物,以及白血病免疫疗法的靶标。

[0007] CD3,包含三个不同多肽链(ϵ 、 δ 和 γ 链),是一种由T细胞表达的抗原。三个CD3多肽链与T细胞受体(TCR)和 ζ 链缔合以形成TCR复合物,所述TCR复合物具有使T细胞中的信号传导级联活化的功能。当前,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是被核准供人类治疗使用的首个单克隆抗体,并且在临床上作为免疫调节剂用于治疗同种异体移植排斥。

[0008] 尽管已显示双特异性抗体在有效杀灭癌细胞方面具有潜力,但这些分子的严重不利影响,包括全身性免疫活化、免疫原性(抗药物抗体效应);以及通常不良的可制造性已极大限制了这个类型的药物的广泛应用。举例来说,CD19 \times CD3双特异性scFv-scFv(单链可变片段)融合蛋白(博纳吐单抗(Blinatumomab))的一个缺点是这个药物由于它的半衰期短暂以及与皮下施用不相容而需要每日静脉内(i.v.)施用;然而,在临床试验期间仍然发生了神经影响诸如定向障碍、错乱、言语和语言损害、震颤或惊厥(Bargou等人Science 321(5891):974-797,2008)。

[0009] 双特异性抗体的当前形式的缺点对于它们以良好功效和安全性广泛应用于治疗癌症患者来说仍然是极大挑战。因此,本领域中急需开发具有改善的功效、稳定性、安全性和可制造性的新型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CD19的多特异性抗原结合蛋白(MSAP,诸如双特异

性抗原结合蛋白,“BSAP”)、包含所述MSAP的药物组合物、以及使用所述MSAP治疗癌症的方法。

[0011] 在本发明的一个方面,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区(CH1);和(b)Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL);任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段的接头。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。

[0012] 在根据以上所述的任何MSAP(诸如BSAP)的一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端,诸如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链高变区H1(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;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链高变区L1(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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由二硫键连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键诸如约2个二硫键连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。

[0013] 在根据以上所述的任何MSAP(诸如BSAP)的一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述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;并且/或者抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的VL包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0014] 在根据以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 的一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP) 包含第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv具有不同氨基酸序列。

[0015] 在根据以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 的一些实施方案中,接头包含约2至约30个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基 (诸如约2至约15个氨基酸残基)。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组,诸如是SEQ ID NO:44。

[0016] 在根据以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 的一些实施方案中,MSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP (例如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:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP (例如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:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0017] 在根据以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 的一些实施方案中,MSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP (例如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:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP (例如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:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0018] 在根据以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 的一些实施方案中,MSAP (诸如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:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP (例如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:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP (例如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:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0019] 还提供了编码以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 的经分离核酸分子、携带所述经分离核酸分子的表达载体、包含所述表达载体的经分离宿主细胞、以及产生以上所述的任何MSAP的方法,所述方法包括培养所述经分离宿主细胞以及从细胞培养物回收MSAP。

[0020] 本文还提供了包含以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 的用途、组合物 (诸如药物组合物)、药盒和制品。在一些实施方案中,提供了一种包含以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 以及任选的药学上可接受的载体的组合物 (诸如药物组合物)。

[0021] 本文还提供了以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 制备用于治疗癌症的药剂的用途。在一些实施方案中,提供了一种治疗有需要的个体中的癌症 (例如DLBCL或ALL) 的方法,所

述方法包括向所述个体施用有效量的以上所述的任何MSAP (诸如BSAP) 或其组合物 (诸如药物组合物)。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP) 或组合物 (诸如药物组合物) 以静脉内方式施用。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病 (AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森 (Abelson) 致癌基因 (Bcr-ABL易位) 的慢性髓源性白血病 (CML)、骨髓增生异常综合征 (MDS)、急性B淋巴细胞性白血病 (B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征 (Richter's syndrome) 或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛细胞白血病 (HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤 (BPDCN)、包括套膜细胞白血病 (MCL) 和小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 的非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphomas, NHL)、霍奇金氏淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma)、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)。在一些实施方案中,癌症是DLBCL。在一些实施方案中,癌症是ALL。

[0022] 本发明的这些以及其他方面和优势将根据随后具体实施方式和随附权利要求而变得显而易见。应了解,本文所述的各种实施方案的一种、一些或全部性质可加以组合以形成本发明的其他实施方案。

[0023] 本文提及的所有出版物、专利、专利申请和公布的专利申请的公开内容都据此通过引用以它们整体并入本文。

附图说明

[0024] 图1A描绘一示例性CD19×CD3 MSAP ITAB2009的结构。图1B描绘一示例性CD19×CD3 MSAP ITAB2007的结构。

[0025] 图2描绘CD19×CD3 MSAP (ITAB2009或ITAB2007) 介导的针对自体B细胞的人PBMC细胞毒性。不添加CD19×CD3 MSAP的仅与人PBMC混合的B细胞充当对照。

[0026] 图3描绘CD19×CD3 MSAP (ITAB2009或ITAB2007) 介导的针对Daudi肿瘤细胞的人PBMC细胞毒性。不添加CD19×CD3 MSAP的仅与人PBMC混合的Daudi肿瘤细胞充当对照。

[0027] 图4描绘不同细胞的如由抗CD19染色信号反映的CD19表达水平。

[0028] 图5A-图5B描绘在Pfeiffer细胞 (图5A) 或Daudi细胞 (图5B) 存在下,CD19×CD3 MSAP (ITAB2009或ITAB2007) 介导的T细胞活化。不添加CD19×CD3 MSAP的与Pfeiffer细胞或Daudi细胞混合的T细胞充当对照。

[0029] 图6描绘CD19×CD3 MSAP (ITAB2009或ITAB2007) 介导的针对Reh细胞的人Pri-T细胞细胞毒性。

[0030] 图7描绘在用人PBMC接种的免疫重建NOG小鼠中,ITAB2007 CD19×CD3 MSAP针对皮下Raji异种移植肿瘤的生长抑制作用。媒介物注射液 (PBST) 充当对照。结果指示ITAB2007以浓度依赖性方式抑制了经huPBMC移入小鼠中的Raji异种移植肿瘤生长。

[0031] 图8描绘具有用人原代T细胞重建的免疫系统,并且处于用CD19×CD3 MSAP或媒介物对照治疗下的经Reh接种小鼠的存活率。

具体实施方式

[0032] 本发明提供了一种包含特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段和特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 的多特异性抗原结合蛋白 (MSAP) (在下文中被称为“CD3×

CD19 MSAP”)。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。在一些实施方案中,两个抗CD19scFv是相同的。本发明还提供了使用本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)治疗癌症,特别是针对血液恶性肿瘤的方法。

[0033] 当前抗癌双特异性抗体遭受若干缺点,诸如不良可制造性、聚集、短暂半衰期、严重不利影响(诸如全身性免疫活化、免疫原性(抗药物抗体应答)、长久输注时间、以及不能保持在肿瘤组织中,所述缺点对这些抗癌双特异性抗体以良好功效和安全性广泛应用于癌症治疗提出了极大挑战。举例来说,博纳吐单抗(BLINCYTO[®],抗CD3/抗CD19双特异性scFv-scFv)于2014年在美国被核准作为费城染色体(Philadelphia chromosome)阴性复发或难治性急性淋巴母细胞性白血病(ALL)的第二线治疗剂。然而,由于它的半衰期短暂以及与皮下施用不相容,博纳吐单抗需要每日静脉内(i.v.)施用;然而,在临床试验期间仍然发生了神经影响诸如定向障碍、错乱、言语和语言损害、震颤或惊厥(Bargou等人Science 321(5891):974-797,2008)。

[0034] 在充分探究之后,本申请的发明人出乎意料地发现了一种CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)形式,所述形式是在抗CD3 Fab片段的N末端融合抗CD19抗原结合片段(例如scFv)。发现相较于本领域中已知的其他多特异性蛋白质,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)具有若干优势。首先,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)具有增强的针对癌细胞,尤其是针对低CD19表达性肿瘤诸如B细胞淋巴瘤和急性淋巴细胞性白血病(ALL)的细胞毒性活性。其次,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)与非人灵长类动物诸如食蟹猴交叉反应,此可有助于采用非人灵长类动物(例如食蟹猴)进行毒理学研究以有益于人类临床研究预测。第三,本文所述的CD3×CD19MSAP(诸如BSAP)具有延长的半衰期,可使得能够达成较低给药频率和较短输注时间,从而对患者提供更大便利。

[0035] 因此,在一个方面,本发明提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区(CH1);和(b)Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL);II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任意的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头。在另一方面,本发明提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区(CH1);和(b)Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL);其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任意的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头。

[0036] 还提供了包含本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的药物组合物和药盒、以及使用所述药物组合物和药盒治疗癌症的方法。

[0037] I. 定义

[0038] 除非明确地相反指示,否则本发明的实施将采用在本领域的技能的范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法,所述方法中的许多出于说明的目的在以下加以描述。此类技术在文献中得到充分说明。参见例如Current Protocols

in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, New York, N.Y. (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, 第I和II卷 (D.Glover编); Oligonucleotide Synthesis (N.Gait编, 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.Hames和S.Higgins编, 1985); Transcription and Translation (B.Hames和S.Higgins编, 1984); Animal Cell Culture (R.Freshney编, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) 以及其他类似参考文献。

[0039] 如本文所用, 术语“治疗”是指旨在在临床病变的过程期间改变所治疗的个体或细胞的天然过程的临床干预。合乎需要的治疗作用包括降低疾病进展的速率, 改善或缓和疾病状态, 以及缓解或改善预后。举例来说, 如果一种或多种与癌症相关的症状得到缓和或消除, 包括但不限于降低癌性细胞的增殖 (或破坏癌性细胞), 减少由疾病所致的症状, 增加罹患疾病者的生活品质, 降低为治疗疾病所需的其他药物治疗的剂量, 以及/或者延长个体的存活期, 那么个体被成功“治疗”。

[0040] 如本文所用, “有效量”是指剂或药物的有效治疗受试者中的疾病或病症的量。在癌症的情况下, 剂的有效量可降低癌细胞的数目; 降低肿瘤尺寸; 抑制 (即在一定程度上减缓, 并且优选是终止) 癌细胞浸润至外周器官中; 抑制 (即在一定程度上减缓, 并且优选是终止) 肿瘤转移; 在一定程度上抑制肿瘤生长; 并且/或者在一定程度上减轻与癌症相关的症状中的一者或多者。如在临床情形下所了解, 药物、化合物或药物组合物的有效量可或可不与另一药物、化合物或药物组合物联合实现。因此, 可在施用一种或多种治疗剂的情形下考虑“有效量”, 并且如果与一种或多种其他剂联合, 可实现或实现了合乎需要的结果, 那么单一剂可被视为以有效量给与。

[0041] 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, 个体是人。

[0042] 术语“抗体”在最广泛意义上使用, 并且明确涵盖单克隆抗体 (包括全长单克隆抗体)、多特异性抗体 (例如双特异性抗体) 和抗体片段, 只要它们展现所需生物活性或功能即可。如本文所用, 术语“免疫球蛋白” (Ig) 和“抗体”可互换使用。

[0043] 术语“天然抗体”、“全长抗体”、“完整抗体”和“完全抗体”在本文中可互换使用以指代呈它的大致上完整形式, 而非如下定义的抗体片段的抗体。所述术语特别是指具有含有Fc区的重链的抗体。天然抗体通常是具有约150,000道尔顿 (Dalton), 由两个相同轻 (L) 链和两个相同重 (H) 链组成的异四聚糖蛋白。每个轻链通过一个共价二硫键连接于重链, 而在不同免疫球蛋白同种型的重链之间, 二硫键的数目有变化。每个重链和轻链还具有规律间隔的链内二硫桥。每个重链在一端具有可变结构域 (V_H), 继之以许多恒定结构域。每个轻链具有在一端的可变结构域 (V_L) 和在它的另一端的恒定结构域; 轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准, 而轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。特定氨基酸残基被认为形成轻链可变结构域与重链可变结构域之间的界面。

[0044] 术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的相对于免疫球蛋白的含有抗原结合位点的其他部分即可变结构域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(总称为CH)和轻链的CHL(或CL)结构域。

[0045] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指所述抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可被称为“VH”。轻链的可变结构域可被称为“VL”。这些结构域通常是抗体的最可变部分,并且含有抗原结合位点。

[0046] 术语“可变”是指以下事实:可变结构域的某些部分在抗体之间在序列方面广泛不同,并且被用于每种特定抗体对它的特定抗原的结合和特异性中。然而,可变性并非均匀分布在抗体的整个可变结构域中。在轻链可变结构域与重链可变结构域两者中,它均集中在三个称为高变区(HVR,也被称为CDR)的区段中。可变结构域的更高度保守部分被称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含主要采用 β 片层构型,由三个HVR连接的四个FR区,所述HVR形成连接 β 片层结构,并且在一些情况下形成 β 片层结构的一部分的环。每个链中的HVR通过FR区紧密邻近固持在一起,并且与来自另一链的HVR一起促进形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定结构域不直接涉及于抗体与抗原的结合中,但展现各种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0047] 来自任何哺乳动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”都可基于它们的恒定结构域的氨基酸序列而被指定为称为kappa(“ κ ”)和lambda(“ λ ”)的两种明确不同类型中的一者。

[0048] 如本文所用的术语IgG“同种型”或“子类”意指免疫球蛋白的根据它们的恒定区的化学和抗原特征来定义的任何子类。

[0049] 视抗体(免疫球蛋白)的重链的恒定结构域的氨基酸序列而定,抗体(免疫球蛋白)可被指定为不同类别。存在五种主要类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的若干可进一步分成子类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于免疫球蛋白的不同类别的重链恒定结构域分别被称为 α 、 γ 、 ϵ 、 δ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是熟知的,并且一般地描述于例如Abbas等人Cellular and Mol. Immunology,第4版(W.B.Saunders,Co.,2000)中。抗体可为通过所述抗体与一个或多个其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合形成的较大融合分子的一部分。

[0050] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选地包含所述完整抗体的抗原结合区。在一些实施方案中,本文所述的抗体片段是抗原结合片段。抗体片段或抗原结合片段的实例包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段(诸如单链可变片段scFv);微型双功能抗体;线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0051] 木瓜蛋白酶消化抗体会产生两个相同抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有单一抗原结合位点;以及残余“Fc”片段,其名称反映它能够易于结晶。胃蛋白酶处理会产生具有两个抗原结合位点,并且仍然能够交联抗原的 $F(ab')_2$ 片段。

[0052] “Fv”是含有完全抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中,双链Fv种类由呈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由柔性肽接头共价连接以致轻链和重链可缔合成与在双链Fv种类中的结构类似的“二聚”结构。就是在这个构型下,每个可变结构域的三个HVR相互作用以在VH-VL二聚体的表面上界定抗原结合位点。共同地,六个HVR对抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单一可变结构域(或仅包含三个对抗原

具有特异性的HVR的半个Fv)也能够识别和结合抗原,但亲和力低于整个结合位点。

[0053] Fab片段具有两个多肽链,含有重链可变结构域和轻链可变结构域(VH、VL),并且还含有轻链的恒定结构域(CL)和重链的第一恒定结构域(CH1)。我们在本文中将“Fd”称为Fab片段的重链多肽部分,其包含VH和CH1结构域。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加有少许残基,包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH是在本文中对Fab'的标号,其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离巯醇基团。F(ab')₂抗体片段最初以在它们之间具有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段形式产生。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0054] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH结构域和VL结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。通常,scFv多肽还包含在VH结构域与VL结构域之间的多肽接头,所述多肽接头使得scFv能够形成为抗原结合所需的结构。对于对scFv的综述,参见例如Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer Berlin Heidelberg, 1994. 269-315。

[0055] “Fc”片段包含两个重链的通过二硫键固持在一起的羧基末端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定,所述Fc区还是由见于某些类型的细胞上的Fc受体(FcR)识别的部分。

[0056] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从大致上同质抗体群体获得的抗体,例如构成所述群体的单个抗体是相同的,例外之处是可少量存在的可能突变,例如天然存在的突变。因此,修饰语“单克隆”将抗体的特性指示为不是无关联抗体的混合物。在一些实施方案中,此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通过包括从多个多肽序列选择单一靶标结合多肽序列的过程来获得。举例来说,选择过程可为从诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的汇合物的多个克隆选择独特克隆。应了解可进一步改变所选靶标结合序列例如以改善对靶标的亲和力,使靶标结合序列人源化,改善它在细胞培养中的产量,降低它的体内免疫原性,创建多特异性抗体等,并且包含经改变靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。不同于通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体对抗原上的单一决定簇。除它们的特异性之外,单克隆抗体制剂还因为它们通常未受其他免疫球蛋白污染而是有利的。

[0057] 修饰语“单克隆”将抗体的特性指示为从大致上同质抗体群体获得,并且不应解释为需要通过任何特定方法来产生抗体。举例来说,待根据本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术制备,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(参见例如美国专利第4,816,567号)、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))、以及用于在具有人免疫球蛋白基因座的

部分或全部或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中产生人抗体或人样抗体的技术(参见例如WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 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);美国专利第5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016号;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))。

[0058] 本文单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源,而一个或多个链的其余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源;以及此类抗体的片段,只要它们展现所需生物活性即可(参见例如美国专利第4,816,567号;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于通过例如用目标抗原使猕猴免疫所产生的抗体。

[0059] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有源于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(接受体抗体),其中来自接受体的HVR的残基被来自非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的HVR的具有所需特异性、亲和力和/或能力的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被相应非人残基替换。此外,人源化抗体可包含不见于接受体抗体中或供体抗体中的残基。可进行这些修饰以进一步改进抗体性能。一般来说,人源化抗体将包含大致上全部至少一个,并且通常是两个可变结构域,其中全部或大致上全部高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或大致上全部FR是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的至少一部分恒定区。对于其他细节,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)。也参见例如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);以及美国专利第6,982,321和7,087,409号。

[0060] “人抗体”是具有对应于由人产生以及/或者已使用如本文公开的用于制备人抗体的任何技术制备的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的抗体。人抗体的这个定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可使用本领域中已知的各种技术包括噬菌体展示文库来产生人抗体。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581(1991)。还可用于制备人单克隆抗体的是Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,77(1985);Boerner等人,J.Immunol.147(1):86-95(1991)中所述的方法。也参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)。可通过将抗原施用至转基因动物来制备人抗体,所述转基因动物已被修饰来应答于抗原激发产生此类抗体,但其内源性基因座已被失能,

例如经免疫异种小鼠(关于XENOMOUSE™技术,参见例如美国专利第6,075,181和6,150,584号)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,也参见例如Li等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:3557-3562(2006)。

[0061] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”当在本文中使用时是指抗体可变结构域的在序列方面高变并且/或者形成结构确定的环的区域。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显示六个HVR的最大多样性,并且特别是H3被认为在对抗体赋予精细特异性方面起独特作用。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, Totowa, N.J., 2003)。实际上,天然存在的仅由重链组成的骆驼科动物抗体在不存在轻链下具有功能性和稳定性。参见例如Hamers-Casterman等人, Nature 363:446-448(1993);Sheriff等人, Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。HVR也被称为“CDR”或“互补决定区”。

[0062] 免疫球蛋白可变区的结构和位置可通过参考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(现时在因特网(immuno.bme.nwu.edu)上可用)来确定。

[0063] “框架”或“FR”残基是除如本文定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0064] 如本文所用的术语“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。任何适合化学键都可用于创建直接连接,包括但不限于共价键诸如肽键和二硫键,或非共价键诸如氢键、疏水键、离子键或范德华键(van der Waals bond)。

[0065] 如本文所用的“共价键”是指共有两个或多个电子的两个原子之间的稳定键。共价键的实例包括但不限于肽键和二硫键。如本文所用,“肽键”是指在氨基酸的羧基与邻近氨基酸的胺基团之间形成的共价键。如本文所用的“二硫键”是指在两个硫原子之间形成的共价键,诸如通过一个或多个二硫键达成重链片段CH1和轻链片段CL的组合。通过连接两个片段中的硫醇基团,可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,一个或多个二硫键可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。二硫键可通过氧化两个硫醇基团形成。在一些实施方案中,共价连接是通过共价键直接连接的。在一些实施方案中,共价连接是通过肽键或二硫键直接连接的。

[0066] 如本文所用,术语“结合”、“特异性结合”或“对……具有特异性”是指靶标与抗体之间的可测量和可重现相互作用诸如结合,此在包括生物分子的分子的异质群体存在下,确定所述靶标的存在。举例来说,结合或特异性结合靶标(其可为表位)的抗体是相比于它结合其他靶标,以更大亲和力、亲合力,更易于以及/或者以更久持续时间结合这个靶标的抗体。在一个实施方案中,抗体与无关靶标结合的程度小于所述抗体与靶标结合的约10%,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量。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在来自不同物种的蛋白质之间保守的表位。在另一实施方案中,特异性结合可包括但不要求排他性结合。

[0067] 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”定义为在将序列对准以及必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比,并且不将任

何保守性取代考虑为序列同一性的一部分之后,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以属于本领域中的技能的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™ (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数,包括为历经所比较序列的全长实现最大对准所需的任何算法。

[0068] 氨基酸取代可包括但不限于多肽中的一个氨基酸被另一氨基酸替换。示例性取代显示于表A中。可将氨基酸取代引入至目标抗体中,并且关于所需活性例如维持/改善的抗原结合性、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC来筛选产物。

[0069] 表A

[0070]

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
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

[0071] 可根据共同侧链性质将氨基酸分组:(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)影响链定向的残基:Gly、Pro;和(6)芳族:Trp、Tyr、Phe。非保守性取代将必然伴有将这些类别中的一者的成员更换成另一类别。

[0072] 如本文所用,“多特异性抗原结合蛋白”(MSAP)是指具有共价连接于一个或多个抗原结合片段的Fab片段的蛋白质,相较于所述Fab片段,所述抗原结合片段具有不同特征。特征可为生物特征,诸如体外或体内活性。特征还可为简单化学或物理性质,诸如与靶标分子的结合、催化反应等。Fab片段和一个或多个抗原结合片段可通过单一肽键直接连接,或通过肽接头连接,但以同框方式彼此连接。术语“多特异性抗原结合蛋白”和“MSAP”在本文中

可互换使用以指代具有多表位特异性的抗原结合蛋白。

[0073] 如与抗体或抗原结合蛋白联合使用的术语“多特异性”（诸如多特异性抗原结合蛋白,MSAP）是指抗体或抗原结合蛋白具有多表位特异性（即能够特异性结合一种生物分子上的两个、三个或更多个不同表位,或能够特异性结合两种、三种或更多种不同生物分子上的表位）。除非另外指示,否则在多特异性抗体或MSAP名称中列出由多特异性抗体或MSAP结合的抗原所采用的顺序是任意的。也就是说,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与CD19（例如不同CD19表位）两者的多特异性抗体（诸如MSAP）。在一些实施方案中,MSAP是BSAP。

[0074] 如与抗体或抗原结合蛋白联合使用的术语“双特异性”（诸如双特异性抗原结合蛋白,BSAP）是指抗体或抗原结合蛋白能够特异性结合一种生物分子上的两个不同表位,或能够特异性结合两种不同生物分子上的表位。除非另外指示,否则在双特异性抗体或BSAP名称中列出由双特异性抗体或BSAP结合的抗原所采用的顺序是任意的。也就是说,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与CD19两者的双特异性抗体（诸如BSAP）。在一些实施方案中,BSAP是二价的。在一些实施方案中,BSAP是多价的（例如三价的）。

[0075] 如本文所用,多肽的“C末端”是指所述多肽的供给它的胺基团以与它的邻近氨基酸残基的羧基形成肽键的末个氨基酸残基。多肽的如本文所用的“N末端”是指所述多肽的供给它的羧基以与它的邻近氨基酸残基的胺基团形成肽键的第一氨基酸。

[0076] 如本文所用的术语“载体”是指能够使它与其连接的另一核酸繁殖的核酸分子。所述术语包括呈自我复制性核酸结构形式的载体以及并入至它已被引入至其中的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导它们所操作性地连接的核酸的表达。此类载体在本文中被称为“表达载体”。

[0077] 术语“细胞”包括原代主题细胞和它的子代。

[0078] 术语“细胞因子风暴”,也被称为“细胞因子级联”或“高细胞因子血症”,是一种潜在致命性免疫反应,通常由细胞因子与免疫细胞之间的正反馈环路组成,伴有各种细胞因子（例如INF- γ 、IL-10、IL-6、CCL2等）的水平高度升高。

[0079] 应了解本文所述的本发明的实施方案包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”实施方案。

[0080] 在本文中提及“约”某一值或参数包括（并且描述）涉及那个值或参数本身的变化形式。举例来说,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0081] 如本文所用,提及“非”某一值或参数通常意指并且描述“不同于”某一值或参数。举例来说,方法不用于治疗X类型的癌症意指方法用于治疗不同于X的类型的癌症。

[0082] 本文所用的术语“约X-Y”与“约X至约Y”具有相同含义。

[0083] 除非上下文另外明确规定,否则如本文中以及随附权利要求中所用,单数形式“一个(种)”、“或”和“这个(种)”包括复数个(种)指示物。

[0084] II. CD3×CD19多特异性抗原结合蛋白(CD3×CD19 MSAP)

[0085] 本发明提供了一种多特异性抗原结合蛋白(MSAP),所述多特异性抗原结合蛋白包含通过任选的接头融合在一起的特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段(在下文中被称为“抗CD3 Fab片段”)和特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv)(在下文中被称为“抗CD19

抗原结合片段”,例如抗CD19 scFv),在下文中被称为“CD3×CD19 MSAP”。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含(a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区(CH1);和(b)Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含(a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区(CH1);和(b)Ig轻链可变区(VL)和Ig轻链恒定区(CL);其中抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP是三价的和三特异性的,即两个抗CD19抗原结合片段(例如scFv)特异性结合CD19的不同表位,在下文中被称为“CD3×CD19三特异性抗原结合蛋白”或“CD3×CD19 TSAP”。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP是三价的和双特异性的,即两个抗CD19抗原结合片段(例如scFv)特异性结合相同CD19表位,在下文中被称为“三价CD3×CD19 BSAP”。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP是二价的和双特异性的,在下文中被称为“二价CD3×CD19 BSAP”。一示例性CD3×CD19 MSAP显示于图1B中。

[0086] 本发明的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)具有重大优势,包括但不限于:1)经证明的增强的癌细胞杀灭功效;2)经证明的在动物模型中对伯基特氏淋巴瘤和前体B细胞(前B)急性淋巴母细胞性白血病(ALL)的优越体内治疗作用;和3)与非人灵长类动物诸如食蟹猴的交叉反应性,此可有助于采用非人灵长类动物(例如食蟹猴)进行毒理学研究以有益于人类临床研究预测。

[0087] 因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由二硫键连接。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3ε的N末端(例如CD3ε的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链高变区H1(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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的VL包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链

高变区L1 (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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC (SEQ ID NO:45) 或CPPCS (SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含两个具有相同氨基酸序列的抗CD19 scFv。在一些实施方案中,MSAP包含两个具有不同氨基酸序列的抗CD19 scFv。在一些实施方案中,接头包含约2至约30个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头包含约2至约15个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(例如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:53或60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(例如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:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(例如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:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0088] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端。

[0089] 因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。

[0090] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述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;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含VH,其中所述抗CD19 scFv的所述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;并且/或者其中所述抗CD19 scFv包含VL,其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选

的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。

[0091] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含VH,其中所述抗CD19 scFv的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19 scFv包含VL,其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的

抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。

[0092] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述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;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,任选地,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含VH,其中所述抗CD19 scFv的所述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;并且/或者其中所述抗CD19 scFv包含VL,其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由

约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。

[0093] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19 scFv的VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含

SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。

[0094] 在一些实施方案中,提供了一种包含第一多肽和第二多肽的MSAP(诸如BSAP),其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种包含第一多肽和第二多肽的MSAP(诸如BSAP),其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。

[0096] 因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0097] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述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;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,任选地,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含VH,其中所述抗CD19scFv的所述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;并且/或者其中所述抗CD19 scFv包含VL,其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在

一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0098] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含VH,其中所述抗CD19 scFv的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19 scFv包含VL,其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0099] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,任选地,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述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;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL

包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3；和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头；其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中，提供了一种MSAP(诸如BSAP)，所述MSAP包含：I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段，其中所述抗CD3 Fab片段包含：(a) Ig VH和Ig CH1；和(b) Ig VL和Ig CL；任选地，其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接；其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列；并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列；II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv，其中所述抗CD19 scFv包含VH，其中所述抗CD19 scFv的所述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；并且/或者其中所述抗CD19 scFv包含VL，其中所述抗CD19 scFv的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3；和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头；其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列；并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中，抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH，和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中，抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此，在一些实施方案中，提供了一种MSAP(诸如BSAP)，所述MSAP包含：I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段，其中所述抗CD3 Fab片段包含：(a) Ig VH和Ig CH1；和(b) Ig VL和Ig CL；任选地，其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接；其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列；并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列；II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv，其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列；和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头；其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中，接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中，接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中，MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽，和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中，MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽，和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0100] 在一些实施方案中，提供了一种MSAP(诸如BSAP)，所述MSAP包含：I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段，其中所述抗CD3 Fab片段包含：(a) Ig VH和Ig CH1；和(b) Ig VL和Ig CL；任选地，其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接；其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列；并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的

所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19 scFv的VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(例如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0101] 在一些实施方案中,提供了一种包含第一多肽和第二多肽的MSAP(诸如BSAP),其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种包含第一多肽和第二多肽的MSAP(诸如BSAP),其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0102] 在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端。

[0103] 因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,

并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和/或第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和/或第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和/或第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,第一接头和第二接头在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。

在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0104] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述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;并且/或者其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv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;并且/或者其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv的VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施

方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和/或第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和/或第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任意的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0105] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3

Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任意的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19scFv和第二抗CD19scFv,其中所述第一抗CD19scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv的VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任意的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和/或第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0106] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述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;并且/或者其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其

中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv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;并且/或者其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv的VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和/或第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和/或第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一

些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0107] 在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VL,其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,提供了一种MSAP(诸如BSAP),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv的VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv的VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,第一抗CD19scFv和/或第二抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和

丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,第一接头和/或第二接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。

[0108] 在一些实施方案中,提供了一种包含第一多肽和第二多肽的MSAP(诸如BSAP),其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种包含第一多肽和第二多肽的MSAP(诸如BSAP),其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种包含第一多肽和第二多肽的MSAP(诸如BSAP),其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0109] 本发明还提供了包含本文所述的任何CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的融合蛋白、CD3×CD19 MSAP缀合物(例如小分子药物缀合物)、或表达本文所述的任何CD3×CD19 MSAP的经分离细胞。

[0110] 抗CD3 Fab片段

[0111] 本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的抗CD3 Fab片段特异性结合CD3,诸如人CD3。在本领域中,已知“CD3”是一种具有六个链的多蛋白复合物(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CD3 γ 链、CD3 δ 链、两个CD3 ϵ 链、以及CD3 ζ 链的同二聚体。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链是免疫球蛋白超家族的含有单一免疫球蛋白结构域的高度相关细胞表面蛋白。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的跨膜区域带负电荷,此是允许这些链与带正电荷的TCR链缔合的特征。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的细胞内尾部各自含有被称为免疫受体酪氨酸基活化基序或ITAM的单一保守基序,而每个CD3 ζ 链具有三个。在不受理论束缚下,认为ITAM对于TCR复合物的信号传导能力是重要的。如本文所用的CD3可来自各种动物物种,包括人、灵长类动物、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0112] 在一些实施方案中,相较于单独抗CD3 Fab片段,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)具有增加的体内半衰期。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)具有是单个抗CD3 Fab片段的至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍的半衰期。

[0113] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的抗CD3 Fab片段以 $\leq 1\mu\text{M}$,诸如 $\leq 100\text{nM}$,优选是 $\leq 10\text{nM}$,更优选是 $\leq 1\text{nM}$ 的平衡结合常数(K_d)结合CD3。举例来说,抗CD3 Fab片段的K_d值在约 $\leq 1\text{nM}$ 与约 1pM 之间。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段以约 $0.1 \times 10^{-9}\text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{M}$,诸如约 $5.99 \times 10^{-9}\text{M}$ 的K_d结合人CD3。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段以约 $0.1 \times 10^{-9}\text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{M}$,诸如约 $1.88 \times 10^{-8}\text{M}$ 的K_d结合猴(例如食蟹猴)CD3。

[0114] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的抗CD3 Fab片段特异性结合单个CD3链,诸如CD3 γ 链、CD3 δ 链、或CD3 ϵ 链。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合由两个或更多个单个CD3链形成的复合物(例如超过一个CD3 ϵ 链的复合物、CD3 γ 链和CD3 ϵ 链的复合物、CD3 δ 链和CD3 ϵ 链的复合物)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合

CD3 ϵ 链。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位。

[0115] 抗CD3 Fab片段可通过本领域中已知的多种方法产生(参见例如美国专利第6,291,161;6,291,158号)。抗CD3 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,抗CD3 Fab片段源于人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段是嵌合的。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段源于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的完全人抗体。

[0116] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合人CD3与非人灵长类动物(诸如食蟹猴)CD3两者。与猴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; 以及Yang等人, *J. Immunol.* 137:1097-1100:1986)。具有与猴CD3具有交叉反应性的抗CD3 Fab片段的CD3 \times CD19 MSAP(诸如BSAP)可有助于在非人灵长类动物中进行毒性研究,此可为人临床试验候选物提供更加相关的安全性评估,而不必在黑猩猩中或使用替代分子进行毒性研究。

[0117] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段源于与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, New York, (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)及其衍生物诸如OKT3 ala-ala(Herold等人(2003) *J. Clin. Invest.* 11:409)、维西珠单抗(visilizumab)(Carpenter等人(2002) *Blood* 99:2712)、以及145-2C11单克隆抗体(Hirsch等人(1988) *J. Immunol.* 140:3766)。本文考虑的其他CD3结合分子包括UCHT-1(Beverley, P C和Callard, R.E. (1981) *Eur. J. Immunol.* 11:329-334)以及W02004/106380; W02010/037838; W02008/119567; W02007/042261; W02010/0150918中所述的CD3结合分子。

[0118] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含免疫球蛋白(Ig)重链的一个恒定(CH1)区和一个可变(VH)区,以及Ig轻链的一个恒定(CL)区和一个可变(VL)区。在一些实施方案中,CH1和VH与VL和CL异二聚,并且在重链恒定区与轻链恒定区之间通过二硫键共价连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段具有基本结构NH₂-VL-CL-S-S-CH1-VH-NH₂。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由一个或多个二硫键连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1与CL之间的二硫键的数目是至少一,诸如2、3、4或更多。在一些实施方案中,半胱氨酸残基被工程改造在抗CD3 Fab片段中(诸如在CH1区和CL区中)以引入二硫键。

[0119] 在一些实施方案中,CD3 \times CD19 MSAP(诸如BSAP)的抗CD3 Fab片段不包含二硫键。举例来说,重链和轻链可以使得在不需要二硫键的情况下进行稳定相互作用的方式加以工程改造。在一些实施方案中,重链或轻链可被工程改造来移除半胱氨酸残基,并且其中重链和轻链仍然稳定相互作用,并且充当Fab。在一些实施方案中,进行突变以有助于重链与轻

链之间的稳定相互作用。举例来说,“钮入孔(knob into hole)”工程改造策略可用于有助于Fab的重链与轻链之间的二聚化(参见例如1996Protein Engineering,9:617-621)。还考虑在本文中用于特定目的加以设计的变异Fab片段,所述目的例如是在CH1和/或CL恒定结构域中达成氨基酸变化,以及移除二硫键或添加标签以用于纯化等。

[0120] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段内的可变区和恒定区的构型可不同于见于天然抗CD3 Fab中的构型。在一些实施方案中,可变区和恒定区的定向可为在一个链中的VH-CL,以及在另一链中的VL-CH1(参见例如Shaefer等人(2011),PNAS,108:111870-92)。

[0121] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的抗CD3 Fab片段源于单克隆抗体。适合单克隆抗体可属于任何类型,包括IgA、IgM、IgD、IgG、IgE,以及所述任何类型的亚型,诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。轻链结构域可源于κ或λ链。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段是重组设计的。

[0122] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含人免疫球蛋白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。在某一实施方案中,抗CD3 Fab片段包含人λ轻链恒定区。在一个实施方案中,人λ轻链恒定区包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5(诸如1、2、3、4或5)个二硫键连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约2个二硫键连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。

[0123] SEQ ID NO:18(人CH1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

[0124] SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKS

[0125] SEQ ID NO:52(人λCL)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW

[0126] KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC
QVTHEGSTVEKTVAPTE

[0127] CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的抗CD3 Fab片段通过在重链可变区(VH)与轻链可变区(VL)之间形成的抗原结合位点特异性结合CD3。抗原结合位点包含免疫球蛋白重链的至少一个(诸如1、2或3个)HVR和/或免疫球蛋白轻链的至少一个(诸如1、2或3个)HVR。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含特异性结合CD3的全长抗体的VH序列和VL序列的1、2、3、4、5个或全部6个HVR。

[0128] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段源于SP34。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段是美国专利第8,846,042号中所述的CD3 Fab片段。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含含有一个、两个或三个来自SEQ ID NO:15的HVR(或CDR)的VH,和/或含有一个、两个或三个来自SEQ ID NO:16的HVR(或CDR)的VL。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含含有三个来自SEQ ID NO:15的HVR的VH,和/或含有三个来自SEQ ID NO:16的HVR的VL。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含含有一个、两个或三个选自SEQ ID NO:9-11的HVR的VH,和/或含有一个、两个或三个选自SEQ ID NO:12-14的HVR的VL。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包

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,抗CD3 Fab片段包含含有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%同一的氨基酸序列的VH。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含含有与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%同一的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,相对于参考序列,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列或VL序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含那个序列的抗CD3 Fab片段保留结合CD3的能力。在一些实施方案中,在HVR中的任何一者或多者中,已取代、插入以及/或者缺失一个或两个氨基酸。在一些实施方案中,取代、插入或缺失发生在处于HVR的外部的区域中(即在框架区“FR”中)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的重链多肽;和/或含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的轻链多肽。

[0129] SEQ ID NO:9 (抗CD3 HVR-H1)

[0130] **TYAMN**

[0131] SEQ ID NO:10 (抗CD3 HVR-H2)

[0132] **RIRSKYNNYATYYADSVKD**

[0133] SEQ ID NO:11 (抗CD3 HVR-H3)

[0134] **HGNFGNSYVSWFAY**

[0135] SEQ ID NO:12 (抗CD3 HVR-L1)

[0136] **RSSTGAVTTSNYAN**

[0137] SEQ ID NO:13 (抗CD3 HVR-L2)

[0138] **GTNKRAP**

[0139] SEQ ID NO:14 (抗CD3 HVR-L3)

[0140] **ALWYSNLWV**

[0141] SEQ ID NO:15 (抗CD3 VH;HVR加下划线)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP

[0142] **GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQM**

NSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGMVTVSS

[0143] SEQ ID NO:16 (抗CD3 VL;HVR加下划线)

- QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQOK
- [0144] PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA
EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
- [0145] SEQ ID NO:57 (抗CD3 Fab片段Fd多肽;HVR加下划线)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQM
[0146] NSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGMVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCPPCS
- [0147] SEQ ID NO:58 (抗CD3 Fab片段轻链多肽;HVR加下划线)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQOK
PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA
[0148] EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPSSEELQA
NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNK
YAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECPPCS

[0149] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的特定VH和/或VL可用于筛选互补性可变区的文库以鉴定具有合乎需要的性质诸如增加的对CD3的亲力的VH/VL。此类方法例如描述于Portolano等人,J.Immunol.(1993)150:880-887;Clarkson等人,Nature(1991)352:624-628;以及Klimka等人,British Journal of Cancer(2000)83:252-260;Beiboer等人,J.Mol.Biol.(2000)296:833-849;以及Rader等人,PNAS(1998)95:8910-8915中。

[0150] 抗CD19抗原结合片段

[0151] 本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含一个或两个特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合在抗CD3 Fab片段的N末端,例如在抗CD3 Fab片段的VH的N末端,以及/或者在抗CD3 Fab片段的VL的N末端。

[0152] B淋巴细胞抗原CD19也被称为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。在人中,CD19在除浆细胞之外的所有B谱系细胞中,以及在滤泡树突细胞中表达。CD19具有两个主要作用:1)充当衔接蛋白以将细胞质信号传导蛋白募集至膜;和2)在CD19/CD21复合物内起作用以降低B细胞受体信号传导路径的阈值。CD19在正常B淋巴细胞与恶性B淋巴细胞两者中表达,并且被视为一种B细胞肿瘤相关抗原。举例来说,CD19可充当B淋巴细胞发育的生物标志物、癌症诊断标志物、或免疫疗法的靶标,诸如针对B细胞淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0153] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)可特异性结合细胞表面上的

CD19。在一些实施方案中,细胞是癌细胞。在一些实施方案中,癌细胞在实体肿瘤中。在一些实施方案中,癌细胞是转移性癌细胞,诸如血液癌症,例如ALL、CLL、MCL、B细胞淋巴瘤等。

[0154] 在一些实施方案中,相较于单独抗CD19抗原结合片段(例如scFv),本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)具有增加的体内半衰期。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)具有是单个抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍的半衰期。

[0155] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的抗CD19抗原结合片段(例如scFv)以 $\leq 1\mu\text{M}$,诸如 $\leq 100\text{nM}$,优选是 $\leq 10\text{nM}$,更优选是 $\leq 1\text{nM}$ 的平衡结合常数(K_d)结合CD19。举例来说,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的 K_d 值在约 $\leq 1\text{nM}$ 与约 1pM 之间。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)以约 $0.01 \times 10^{-9}\text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{M}$,诸如约 $8.91 \times 10^{-10}\text{M}$ 的 K_d 结合人CD19。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)以约 $0.1 \times 10^{-9}\text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-7}\text{M}$,诸如约 $8.91 \times 10^{-9}\text{M}$ 的 K_d 结合猴(例如食蟹猴)CD19。

[0156] CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)中的抗CD19抗原结合片段(例如scFv)不仅提供额外结合特异性和增强的性质(例如增加的血清半衰期,或免疫活化级联的活化),而且还由于融合于VH链和/或VL链的N末端而创建空间位阻以显著降低抗CD3 Fab片段对CD3的结合亲和力。这与其他Fab融合蛋白诸如在Fab片段的C末端融合额外结合结构域的TRIBODIES™(参见例如Journal of Immunology, 2000, 165:7050-7057)截然不同。不同于其他已知融合蛋白,诸如W02008/024188和W02009/149185中所述的那些,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)不意图二聚化。CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的另一明显特征是当MSAP(诸如BSAP)不结合于肿瘤细胞上的CD19时,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)降低抗CD3 Fab片段对CD3的结合亲和力。

[0157] 本文所述的抗CD19抗原结合片段可处于任何形式,并且源于任何适合抗CD19抗体。举例来说,抗CD19抗原结合片段可选自scFv、VH、VL、scFv-scFv、Fv、Fab、Fab'、(Fab')₂、微型抗体(minibody)、微型双功能抗体(diabody)、结构域抗体变体(dAb)、单结构域抗体(sdAb)、骆驼科动物抗体(VHH)、纤连蛋白(fibronectin)3结构域变体、锚蛋白重复序列变体、以及源于其他蛋白质骨架的其他抗原特异性结合结构域。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)是嵌合的。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)源于小鼠、大鼠、猴或兔的单克隆抗体。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)源于选自B43、MEDI-551、CLB-CD19、4G7、SJ25-C1LT19、Leu-12、HD37、或任何其他已知抗CD19抗体的任何单克隆抗体。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)源于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的完全人抗体。

[0158] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)特异性结合人CD19与非人灵长类动物(诸如食蟹猴)CD19两者。具有与猴CD19具有交叉反应性的抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)可有助于在非人灵长类动物中进行毒性研究,此可为人临床试验候选物提供更加相关的安全性评估,而不必在黑猩猩中或使用替代分子进行毒性研究。

[0159] 本发明的抗CD19抗原结合片段(例如scFv)可完全或部分调节、阻断、抑制、降低、

拮抗、中和或干扰CD19的功能活性。当相较于未由抗CD19抗原结合片段(例如scFv)所结合,在抗CD19抗原结合片段(例如scFv)存在下,CD19的功能活性降低至少95%(诸如96%、97%、98%、99%或100%)时,所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)被视为能够完全调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰CD19的功能活性。当相较于未由抗CD19抗原结合片段(例如scFv)所结合,在抗CD19抗原结合片段(例如scFv)存在下,CD19的功能活性降低至少50%(诸如55%、60%、75%、80%、85%或90%)时,所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)被视为能够显著调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰CD19的功能活性。当相较于未由抗CD19抗原结合片段(例如scFv)所结合,在抗CD19抗原结合片段(例如scFv)存在下,CD19的功能活性降低小于95%(诸如降低10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%)时,所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)被视为能够部分调节、阻断、抑制、降低、拮抗、中和或干扰CD19的功能活性。

[0160] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含特定序列或这些序列的某些变体。在一些实施方案中,变异序列中的氨基酸取代不实质上降低抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合CD19的能力。还考虑实质上改善抗CD19抗原结合片段(例如scFv)对CD19的结合亲和力或其他性质的修饰,所述其他性质诸如是特异性、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CD19变体的交叉反应性。

[0161] 抗CD19抗原结合片段(例如scFv)可包含特异性结合CD19的全长抗体的免疫球蛋白重链的至少一个(诸如1、2或3个)HVR和/或免疫球蛋白轻链的至少一个(诸如1、2或3个)HVR。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含特异性结合CD19的全长抗体的VH序列和VL序列的1、2、3、4、5个或全部6个HVR。

[0162] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是特异性结合CD19的scFv(在本文中也被称为“抗CD19 scFv”)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv的VH和VL通过肽接头诸如包含甘氨酸和/或丝氨酸的柔性接头彼此连接。在以下“接头”子章节中的任何肽接头都可用作介于抗CD19 scFv的VH和VL之间的连接肽。在一些实施方案中,抗CD19scFv的VH和VL直接彼此连接。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包括N'-VH-L-VL-C'融合多肽,其中L是任选的肽接头。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包括N'-VL-L-VH-C'融合多肽,其中L是任选的肽接头。

[0163] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含VH和/或VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有一个、两个或三个来自SEQ ID NO:7的HVR(或CDR)的VH,和/或含有一个、两个或三个来自SEQ ID NO:8或50的HVR(或CDR)的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有一个、两个或三个来自SEQ ID NO:7的HVR(或CDR)的VH,和/或含有一个、两个或三个来自SEQ ID NO:50的HVR(或CDR)的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有三个来自SEQ ID NO:7的HVR的VH,和/或含有三个来自SEQ ID NO:8或50的HVR的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有三个来自SEQ ID NO:7的HVR的VH,和/或含有三个来自SEQ ID NO:50的HVR的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有与SEQ ID NO:7的序列至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%同一的氨基酸序列的VH,和/或含有与SEQ ID NO:8或50(诸如SEQ ID NO:50)的序列至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%同一的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

- [0164] SEQ ID NO:1 (抗CD19 HVR-H1)
- [0165] **SYVMH**
- [0166] SEQ ID NO:2 (抗CD19 HVR-H2)
- [0167] **WIGYINPYNDGTKY**
- [0168] SEQ ID NO:3 (抗CD19 HVR-H3)
- [0169] **GTYYYGSRVFDY**
- [0170] SEQ ID NO:47 (抗CD19 HVR-L1-1.3)
- [0171] **RSSKSLQNVNGNTYLY**
- [0172] SEQ ID NO:48 (抗CD19 HVR-L2-1.3)
- [0173] **RMSNLNS**
- [0174] SEQ ID NO:49 (抗CD19 HVR-L3-1.3)
- [0175] **MQHLEYPLT**
- [0176] SEQ ID NO:4 (抗CD19 HVR-L1-1.2)
- [0177] **RSSKSLQNVNGNTYLY**
- [0178] SEQ ID NO:5 (抗CD19 HVR-L2-1.2)
- [0179] **RMSNLNS**
- [0180] SEQ ID NO:6 (抗CD19 HVR-L3-1.2)
- [0181] **MQHLEYPIT**
- [0182] SEQ ID NO:7 (抗CD19 VH;HVR加下划线)

- QVQLVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQKP
- [0183] GQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSL
RSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTVTVSS
- [0184] SEQ ID NO:50 (抗CD19 VL1.3;HVR加下划线)
DVVMTQSPSSIPVTLGESVSISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ
- [0185] QRPQGSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
GVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLEIK
- [0186] SEQ ID NO:8 (抗CD19 VL1.2;HVR加下划线)
DVVMTQSPSSIPVTLGESVSISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ
- [0187] QRPQGSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
GVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK
- [0188] SEQ ID NO:51 (抗CD19 scFv (VL-VH) 1.3);HVR加下划线,肽接头用粗体表示)
DVVMTQSPSSIPVTLGESVSISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ
QRPQGSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
GVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGGSQVQ
- [0189] LVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQKPQGLE
WIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSLRSEDS
AVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTVTVSS
- [0190] SEQ ID NO:59 (抗CD19 scFv (VL-VH) 1.2);HVR加下划线,肽接头用粗体表示)
DVVMTQSPSSIPVTLGESVSISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ
QRPQGSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
GVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGGSQVQL
- [0191] VQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQKPQGLEW
IGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSLRSEDSAV
YYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTVTVSS

[0192] 接头

[0193] 本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 可包含连接抗CD3Fab片段的VH或VL和抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 的接头 (诸如肽接头)。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 包含两个抗CD19抗原结合片段 (例如scFv)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH与第一抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 之间的接头和抗CD3 Fab片段的VL与第二抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 之间的接头相同。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH与第一抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 之间的接头和抗CD3 Fab片段的VL与第二抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 之间的接头不同。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是scFv。在

一些实施方案中,抗CD19 scFv包含连接抗CD19 scFv的VH和VL的接头(诸如肽接头),所述接头可和抗CD3 Fab片段的VH和VL与抗CD19 scFv之间的任何接头相同或不同。

[0194] 接头可为任何长度的肽接头。在一些实施方案中,肽接头是约1个氨基酸至约10个氨基酸长的,约2个氨基酸至约15个氨基酸长的,约3个氨基酸至约12个氨基酸长的,约4个氨基酸至约10个氨基酸长的,约5个氨基酸至约9个氨基酸长的,约6个氨基酸至约8个氨基酸长的,约1个氨基酸至约20个氨基酸长的,约21个氨基酸至约30个氨基酸长的,约1个氨基酸至约30个氨基酸长的,约2个氨基酸至约20个氨基酸长的,约10个氨基酸至约30个氨基酸长的,约2个氨基酸至约19个氨基酸长的,约2个氨基酸至约18个氨基酸长的,约2个氨基酸至约17个氨基酸长的,约2个氨基酸至约16个氨基酸长的,约2个氨基酸至约10个氨基酸长的,约2个氨基酸至约14个氨基酸长的,约2个氨基酸至约13个氨基酸长的,约2个氨基酸至约12个氨基酸长的,约2个氨基酸至约11个氨基酸长的,约2个氨基酸至约9个氨基酸长的,约2个氨基酸至约8个氨基酸长的,约2个氨基酸至约7个氨基酸长的,约2个氨基酸至约6个氨基酸长的,约2个氨基酸至约5个氨基酸长的,约2个氨基酸至约4个氨基酸长的,或约2个氨基酸至约3个氨基酸长的。在一些实施方案中,肽接头的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,肽接头的长度是21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸中的任一者。举例来说,在一些实施方案中,肽接头是约5个氨基酸长的。在一些实施方案中,肽接头的N末端共价连接于抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的C末端,并且肽接头的C末端共价连接于抗CD3 Fab片段的VH或VL的N末端。

[0195] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。举例来说,源于仅有重链的抗体的铰链区的序列可被用作接头。参见例如WO 1996/34103。在一些实施方案中,肽接头是人IgG1或IgG4铰链。在一些实施方案中,肽接头是突变人IgG1或IgG4铰链。在一些实施方案中,接头是柔性接头。示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G_n (SEQ ID NO:31)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如($GS)_n$ (SEQ ID NO:32)、($GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:33)、($GGGS)_n$ (SEQ ID NO:34)、或($GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:35),其中n是至少是1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,因此可能够充当组分之间的中性系链。甘氨酸即使相比于丙氨酸也会获取显著更多 Φ - Ψ 空间,并且相比于具有较长侧链的残基,受到的限制少得多(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:36)、Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:37)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO:38)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:39)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:40)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:41)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO:42)、Gly-Gly-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:29)、GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:43)、GGGGS (SEQ ID NO:44)等。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH与抗CD19抗原结合片段(例如scFv)之间的接头是GGGGS (SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VL与抗CD19抗原结合片段(例如scFv)之间的接头是GGGGS (SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,连接抗CD19 scFv的VH和VL的接头是GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:43)。普通技术人员将认识到CD3 \times CD19 MSAP(诸

如BSAP)的设计可包括是完全或部分柔性的接头,以致接头可包括柔性接头部分以及一个或多个赋予柔性较小的结构的部分以提供所需CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)结构。

[0196] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段与抗CD19抗原结合片段(例如scFv)之间的接头是稳定接头(不可由蛋白酶尤其是MMP裂解)。

[0197] 在一些实施方案中,接头是可裂解接头。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH或VL与抗CD19抗原结合片段(例如scFv)之间的接头包含蛋白酶底物裂解序列,例如MMP底物裂解序列。可由MMP裂解的底物序列已得到广泛研究。举例来说,序列PLGLAG(SEQ ID NO:30)可由大多数MMP裂解。在一些实施方案中,蛋白酶裂解位点由MMP-2、MMP-9、或它们的组合识别。

[0198] 在一些实施方案中,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含结构:N'-抗CD19 VH-L1-抗CD19 VL-L2-抗CD3 VH-CH1-C',和第二多肽,所述第二多肽包含结构:N'-抗CD3 VL-CL-C'。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-L1-抗CD19 VH-L2-抗CD3 VH-CH1-C',和第二多肽,所述第二多肽包含结构:N'-抗CD3 VL-CL-C'。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含结构:N'-抗CD3 VH-CH1-C',和第二多肽,所述第二多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-L1-抗CD19 VH-L2-抗CD3 VL-CL-C'。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含结构:N'-抗CD3 VH-CH1-C',和第二多肽,所述第二多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-L1-抗CD19 VH-L2-抗CD3 VL-CL-C'。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含结构:N'-抗CD19 VH-L1-抗CD19 VL-L2-抗CD3 VH-CH1-C',和第二多肽,所述第二多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-L3-抗CD19 VH-L4-抗CD3 VL-CL-C'。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含结构:N'-抗CD19 VH-L1-抗CD19 VL-L2-抗CD3 VH-CH1-C',和第二多肽,所述第二多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-L3-抗CD19 VH-L4-抗CD3 VL-CL-C'。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-L1-抗CD19 VH-L2-抗CD3 VH-CH1-C',和第二多肽,所述第二多肽包含结构:N'-抗CD19 VL-L3-抗CD19 VH-L4-抗CD3 VL-CL-C'。L1、L2、L3和L4是本文所述的任何可能接头(诸如肽接头)。L1-L4可为相同的或不同的。

[0199] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:53的序列至少约85%(诸如至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%)同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第一多肽,所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:60的序列至少约85%(诸如至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%)同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第二多肽,所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54的序列至少约85%(诸如至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%)同一的氨基酸

序列。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含第二多肽,所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:61的序列至少约85%(诸如至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%)同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,第一多肽由包含SEQ ID NO:55的序列的核酸编码。在一些实施方案中,第二多肽由包含SEQ ID NO:56的序列的核酸编码。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,CD3×CD19MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。还提供了CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)及其组合物(诸如药物组合物),所述CD3×CD19 MSAP包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。还提供了CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)及其组合物(诸如药物组合物),所述CD3×CD19 MSAP包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。还提供了CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)及其组合物(诸如药物组合物),所述CD3×CD19 MSAP包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。还提供了CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)及其组合物(诸如药物组合物),所述CD3×CD19 MSAP包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。

[0200] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如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:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。举例来说,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CD3 Fab片段的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末端可包含用于蛋白质纯化的组氨酸标签(HIS标签)。举例来说,在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的N末端另外与组氨酸标签融合。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和/或CL的C末端另外与组氨酸标签融合。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的第一多肽和/或第二多肽的N末端另外与信号肽融合以达成更好表达,所述信号肽诸如是以SEQ ID NO:25阐述的信号肽序列,或由SEQ ID NO:26的核酸序列编码的信号肽。

[0201] SEQ ID NO:53(第一多肽抗CD19 VL-抗CD19 VH-GGGGS接头-抗CD3 VH-CH1-CPPCS的氨基酸序列;接头用粗体表示,HVR加下划线)

[0202] DVVMTQSPSSIPVTLGESV**SISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ**
 QRPQQSPQLLIY**RMSNLNSG**VPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
 GVYY**CMQHLEYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGGS**GGGGGSQVQ
 LVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTS**YVMHWVRQKPGQGLE**
WIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSLRSEDS
 AVYYCARGT**YYYGSRVFDY**WGQGT**TVT**VSS**GGGG**GSEVQLVESG
 GGLVQPGGSLRLSCAASGFT**FNTYAMN**WVRQAPGKGLEW**VARI**
 RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMN**SLRAEDTAV**
 YYCVR**HGNFGNSYVSWFAY**WGQGT**MVT**VSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP**VT**SWNSGALTS**GVHTFPAVLQS**
 SGLYSLSSV**TV**PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK**SCPP**
 CS

[0203] SEQ ID NO:54 (第二多肽抗CD19 VL-抗CD19 VH-GGGGS接头-抗CD3 VL-CL-CPPCS的氨基酸序列;接头用粗体表示,HVR加下划线)

[0204] DVVMTQSPSSIPVTLGESV**SISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ**
 QRPQQSPQLLIY**RMSNLNSG**VPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
 GVYY**CMQHLEYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGGS**GGGGGSQVQ
 LVQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTS**YVMHWVRQKPGQGLE**
WIGYINPYNDGTKYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMELSSLRSEDS
 AVYYCARGT**YYYGSRVFDY**WGQGT**TVT**VSS**GGGG**SQAVVTQEP
 SLTVSPGGTVTLTCR**SSTGAVTTSNYAN**WVQKPGQAPRGLIG**GT**
NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL**SGVQPEDEAEYYCALWYSNL**
WVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT**LFPPSSEELQANKATLVCLISDF**
 YPGAVTV**AWKADSSPVKAGVET**TPSKQSN**NKYAASSYLSLTPE**
 QWKS**HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECPPCS**

[0205] SEQ ID NO:55 (编码第一多肽抗CD19 VL-抗CD19 VH-GGGGS接头-抗CD3 VH-CH1-CPPCS的核酸序列)

gatggtgatgactcagtctcccagcagcatccccgtgaccctgggcgagtctgtgtccatcagc
 tgcagaagcagcaagagcctgcagaacgtcaacggcaacacctacctgtactggtccagcagcggc
 ctggccagtctcccagctgctgatctaccggatgagcaacctgaacagcggcgtgcccgatagatttc
 tggctctggcagcggcaccgacttcaccctgagaatctccggcgtggaacccgaggacgtggcggtg
 actactgtatgcagcacctggaataccccctgacctcggagccggcaccaagctggagatcaaagc
 ggaggcggtagtggcgggtggtggtcaggcgggtggcggatctcaggtgcagctggtgcagtctggcc
 ccgagctaataagcctggcggcagcgtgaagatgagctgcaaggcctccggctacacctcaccagc
 tacgtgatgcactgggtgcccagaagcctggacagggcctggaatggatcggtacatcaacccta
 caacgatggcaccaagtacaacgagaagtcaagggcagagccaccctgaccagcacaagagcag
 cagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcaggacagcggcgtgtactattgtccaga
 ggcacctactactacggcagccgggtgttcgactactggggacagggcaccacggtcaccgtctctc
 aggtggcggaggatctgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggggggctc
 ctgagactctctgtgcagcctctggattcaccttaacacctacgcatgaactgggtccgccaggctcc
 aggaaggggctggagtgggtgcacgcataagaagtaaataataattatgcaacatattatgccgat
 tcagtgaagaccggttcaccatctccagagacgattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagc
 ctgagagccgaggacacggcctatattactgtgtgagacatgggaactcggtaatagctacgttct
 gggttctactggggccaagggacaatgggtcaccgtctcttcagctagcaccaagggccatccgtctt
 cccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgctgtcaaggact
 actccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccg
 gctgtctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagctgggca
 cccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagtgagccc
 aaatctgtccaccgtgctcatag

[0206] SEQ ID NO:56 (编码第二多肽抗CD19 VL-抗CD19 VH-GGGGS接头-抗CD3 VL-CL-CPPCS的核酸序列)

[0207] gatggtgatgactcagtctcccagcagcatccccgtgaccctgggcgagtctgtgtccatcagc
 [0208] tgcagaagcagcaagagcctgcagaacgtcaacggcaacacctacctgtactggtccagcagcggc

ctggccagtctccccagctgctgatctaccggatgagcaacctgaacagcggcgtgcccgatagatttc
 tggtcttggcagcggcaccgactcaccctgagaatctccggcgtggaacccgaggacgtggcgtgt
 actactgtatgcagcacctggaataccccctgacctcggagccggcaccaagctggagatcaaagcc
 ggagcggtagtggcgggtggtggtcaggcgggtggcggatctcaggtgcagctggtgcagtctggcc
 ccgagctaataagcctggcggcagcgtgaagatgagctgcaaggcctccggctacacctcaccagc
 tacgtgatgcactgggtgcgccagaagcctggacagggcctggaatggatcggctacatcaacccta
 caacgatggcaccaagtacaacgagaagttcaagggcagagccaccctgaccagcgacaagagcag
 cagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcggagacagcggcgtgtactattgtccaga
 ggcacctactactacggcagcgggtgttcgactactggggacagggcaccacggtcaccgtctctc
 [0209] aggtggcggaggatctcaggtgtggtgactcaggagccctcactgactgtgtcccaggaggacag
 tctctcactgtcgtcaagtactggggctgttacaactagtaactatgccaaactgggtccagcagaaa
 cctggacaagcaccagggtctgattggtggtaccaacaagcagctccaggtaccctgcccggtt
 ctcaggtccctccttgggggcaagctgccctgacactgtcaggtgtgcagcctgaggacgaggtg
 agtattactgcgctctatggtacagcaacctctgggtgttcggcggaggaccacaagctgaccgtcctagg
 ccaaccgaaagcggcggcctcggctactctgttcccggcctcctctgaggagcttcaagccaacaagg
 ccactggtgtgtctcataagtgacttctaccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagca
 gccccgtcaaggcgggagtgagaccaccacacctccaacaagaacaacaagctacgcggcca
 gcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcat
 gaagggagcaccgtggagaagacagtgggcccctacagaatgtccaccgtgctcatag

[0210] SEQ ID NO:60 (第一多肽抗CD19 VL-抗CD19 VH-GGGGS接头-抗CD3 VH-CH1-CPPCS
 的氨基酸序列;接头用粗体表示,HVR加下划线)

DVVMTQSPSSIPVTLGESVSISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ
 QRPQGSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
 GVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKGGGGSGGGGSQVQL
 [0211] VQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQKPGQGLEWI
 GYINPYNDGTTYNEKFKGRATLTSKSSSTAYMELSSLRSEDSAV
 YYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTVTVSSGGGGSEVQLVESGGG
 LVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK

[0212] YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCPPCS

[0213] SEQ ID NO:61 (第二多肽抗CD19 VL-抗CD19 VH-GGGGS接头-抗CD3 VL-CL-CPPCS的氨基酸序列;接头用粗体表示,HVR加下划线)

DVVMTQSPSSIPVTLGESVSI**SCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQ**
 QRPQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEPEDV
 GVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK**GGGGSGGGGS**GGGGGSQVQL
 VQSGPELIKPGGSVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQKPGQGLEWI
 GYINPYNDG**TKYNEKFKGRATL**TSKSSSTAYMELSSLRSEDSAV
 [0214] YYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTVTVSS**GGGGSQAVVTQEPSL**
 TVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTN
KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL**SGVQPEDEAEYYCALWYSNLW**
VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT**LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP**
 GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW
 KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE**CPPCS**

[0215] III. 制备方法

[0216] 本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 可通过本领域中的任何已知蛋白质表达和纯化方法制备。举例来说,参见实施例1。可完全合成编码CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 的DNA序列。在获得此序列之后,将它克隆至适合表达载体中,接着转染至适合宿主细胞中。培养经转染宿主细胞,并且收集和纯化上清液以获得本发明的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP)。

[0217] 在一些实施方案中,本申请提供了编码本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 中的任一者的多肽中的一者或多者的经分离核酸。在一些实施方案中,经分离核酸包含SEQ ID NO:55或56的核酸序列。经分离核酸可为DNA或RNA。

[0218] 在一些实施方案中,经分离核酸被插入至载体诸如表达载体、病毒载体或克隆载体中。对于核酸的表达,可将载体引入至宿主细胞中以允许在所述宿主细胞内表达核酸。表达载体可含有用于控制表达的多种元件,包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择标记和信号序列。这些元件可由本领域普通技术人员酌情选择。举例来说,可选择启动子序列以促进载体中多核苷酸的转录。适合启动子序列包括但不限于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。可选择增强子序列以增强核酸的转录。可选择可选择标记以允许从未插入有载体的那些宿主细胞选择插入有载体的宿主细胞,举例来说,可选择标记可为赋予抗生素抗性的基因。可选择信号序列以允许所表达多肽运输至宿主细胞的外部。在一些实施方案中,经分离核酸还包含编码信号肽的核酸序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些

实施方案中,编码信号肽的核酸序列包含SEQ ID NO:26的核酸序列。

[0219] SEQ ID NO:25(信号肽的氨基酸序列)

[0220] MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

[0221] SEQ ID NO:26(编码信号肽的核酸)

[0222] atggaatggagctgggtctttctcttctctgtcagtaacgactggtgtccactcc

[0223] 在一些实施方案中,提供了一种含有以上所述的载体的经分离宿主细胞。含有载体的宿主细胞可用于经分离核酸的表达或克隆。适合宿主细胞可包括但不限于原核细胞、真菌细胞、酵母细胞、或高等真核细胞诸如哺乳动物细胞。在原核细胞诸如大肠杆菌(*E.coli*)中表达抗体和抗原结合片段在本领域中是众所周知的。对于综述,参见例如 Pluckthun, A. *BioTechnology* 9:545-551 (1991)。在所培养的真核细胞中表达也可作为用于产生抗体或其抗原结合片段的选项为本领域技术人员所用,参见新近综述,例如 Ref, 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,特别是源于多细胞生物体的那些,可用于糖基化多肽的表达。适合高等真核细胞包括但不限于无脊椎动物细胞和昆虫细胞、以及脊椎动物细胞。

[0224] 可使用本领域中已知的任何适合方法将载体引入至宿主细胞中,所述方法包括但不限于DEAE-右旋糖酐介导的递送、磷酸钙沉淀方法、阳离子脂质介导的递送、脂质体介导的转染、电穿孔、微粒轰击、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。用于转染和转化细胞以表达目标载体的标准方法在本领域中是熟知的。在一些实施方案中,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,宿主细胞包含含有编码第一多肽和第二多肽的经分离核酸的单一载体。

[0225] 在一些实施方案中,本申请提供了表达本文所述的任何CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)的方法,所述方法包括培养含有载体的经分离宿主细胞,以及从细胞培养物回收CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)。在允许插入载体中的经分离核酸的表达的条件下培养经分离宿主细胞。适于多核苷酸的表达的条件可包括但不限于适合培养基、宿主细胞在培养基中的适合密度、存在必要营养物、存在补充性因子、适合温度和湿度、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的目的酌情选择适合条件。

[0226] 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,因此产生本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)。在一些实施方案中,在宿主细胞中表达的多肽可形成是同二聚体的多肽复合物。在一些实施方案中,宿主细胞表达第一多核苷酸和第二多核苷酸,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸可形成是异二聚体的多肽复合物。

[0227] 在一些实施方案中,多肽复合物(诸如CD3×CD19 MSAP或BSAP)可在宿主细胞的内部形成。举例来说,二聚体可借助于相关酶和/或辅因子而在宿主细胞的内部形成。在一些实施方案中,多肽复合物可被分泌出细胞。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽可被分泌出宿主细胞,并且在宿主细胞的外部形成二聚体(诸如CD3×CD19 MSAP或BSAP)。

[0228] 在一些实施方案中,可单独表达第一多肽和第二多肽,并且使其在适合条件下二聚化以形成CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)。举例来说,可将第一多肽和第二多肽组合在适合缓冲液中,并且使第一蛋白质单体和第二蛋白质单体通过适当相互作用诸如疏水性相互作用来二聚化。在一些实施方案中,可将第一多肽和第二多肽组合在含有可促进第一多肽和第二多肽的二聚化的酶和/或辅因子的适合缓冲液中。在一些实施方案中,可将第一多肽和

第二多肽组合在适合媒介物中,并且使它们在适合试剂和/或催化剂存在下彼此反应。

[0229] 一种或多种所表达多肽和/或多肽复合物可使用任何适合方法加以收集。一种或多种多肽和/或多肽复合物可在细胞内,在周质间隙中表达,或被分泌至细胞的外部而进入培养基中。如果多肽和/或多肽复合物在细胞内表达,那么可使含有多肽和/或多肽复合物的宿主细胞溶解,并且可通过离心或超滤移除非所要碎片来从溶解产物分离多肽和/或多肽复合物。如果多肽和/或多肽复合物被分泌至大肠杆菌的周质间隙中,那么可在诸如乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯基甲基磺酰氟(PMSF)的剂存在下使细胞糊状物解冻约30分钟,并且可通过离心移除细胞碎片(Carter等人,BioTechnology 10:163-167(1992))。如果多肽和/或多肽复合物被分泌至培养基中,那么可收集细胞培养物的上清液,并且使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器例如Amincon或Millipore Pellicon超滤装置加以浓缩。可在收集和浓缩步骤中包括蛋白酶抑制剂和/或抗生素以抑制蛋白质降解和/或污染微生物的生长。

[0230] 一种或多种所表达多肽和/或多肽复合物可通过适合方法进一步纯化,所述方法诸如但不限于亲和色谱法、羟磷灰石色谱法、尺寸排阻色谱法、凝胶电泳、透析、在离子交换柱上进行的离子交换分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅色谱法、肝素琼脂糖色谱法、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE、以及硫酸铵沉淀(对于综述,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)。

[0231] 在一些实施方案中,多肽和/或多肽二聚体复合物可通过亲和色谱法纯化。在一些实施方案中,蛋白A色谱法或蛋白A/G(蛋白A和蛋白G的融合蛋白)色谱法可用于纯化包含源于抗体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,第V部分,531-535,2010)。在一些实施方案中,蛋白G色谱法可用于纯化包含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色谱法可用于纯化包含 κ 轻链的多肽和/或多肽复合物(Sudhir,P.,Antigen engineering protocols,第26章,由Humana Press出版,1995;Nilson,B.H.K.等人,J.Biol.Chem.,267,2234-2239(1992))。亲和配体所连接的基质最经常是琼脂糖,但其他基质是可用的。相比于可用琼脂糖实现的流速和处理时间,机械稳定基质诸如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯允许达成更快流速和更短处理时间。当CD3 \times CD19 MSAP(诸如BSAP)包含额外CH3结构域时,Bakerbond ABX树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。

[0232] IV. 药物组合物、单位剂量、制品和药盒

[0233] 本申请还提供了包含本文所述的任一CD3 \times CD19 MSAP(诸如BSAP)以及任选的药学上可接受的载体的药物组合物。

[0234] 药物组合物可适于本文所述的多种施用模式,包括例如全身性或局部化施用。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于静脉内施用。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于皮下施用。在一些实施方案中,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,药物组合物被配制用于肿瘤内注射。

[0235] 如本文所用的“载体”包括在采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。经常,生理上可接受的载体是pH缓冲水溶

液。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、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(诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苜蓿氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸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;以及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖以及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0236] 在一些实施方案中,药物组合物被配制以具有在约4.5至约9.0的范围内的pH,包括例如约5.0至约8.0、约6.5至约7.5、或约6.5至约7.0中的任一者的pH范围。在一些实施方案中,还可通过添加适合张力调节剂诸如甘油来使药物组合物与血液等张。

[0237] 待用于体内施用的药物组合物通常被配制成无菌的大致上等张药物组合物,并且完全符合美国食品与药物管理局的所有良好制造规范(GMP)规定。通过经无菌过滤膜过滤,易于实现无菌性。在一些实施方案中,组合物不含病原体。对于注射,药物组合物可呈液体溶液的形式,例如处于生理上可相容的缓冲液诸如汉克斯溶液(Hank's solution)或林格氏溶液(Ringer's solution)中。此外,药物组合物可呈固体形式,并且在使用之前即刻加以再溶解或混悬。还包括冻干组合物。

[0238] 在某一实施方案中,药物组合物根据常规程序被配制成适合于静脉内、腹膜内或玻璃体内注射的药物组合物。通常,注射用组合物是处于无菌等张水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可包括增溶剂和局部麻醉剂(诸如利多卡因(lignocaine))以减轻注射部位处的疼痛。通常,成分以分开方式或以一起混合成单位剂型的方式加以供给,例如作为干燥冻干粉末或无水浓缩物处于指示活性剂的数量的气密容器诸如安瓿或药囊中。当组合物待通过输注施用,它可用含有无菌药品级水或盐水的输注瓶加以分配。当组合物通过注射施用,可提供含无菌注射用水或盐水的安瓿以使成分可在施用之前加以混合。

[0239] 在一些实施方案中,药物组合物适于施用至人。在一些实施方案中,药物组合物适于施用至啮齿动物(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,药物组合物含于单次使用小瓶诸如单次使用密封小瓶中。在一些实施方案中,药物组合物含于多次使用小瓶中。在一些实施方案中,药物组合物散装含于容器中。在一些实施方案中,药物组合物是经低温保存的。

[0240] 还提供了本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)的单位剂型。术语“单位剂型”是指适合作为单位剂量用于个体的物理离散单元,每个单元含有被计算以产生所需治疗作用的预定量的活性物质,以及适合药物载体、稀释剂或赋形剂。这些单位剂型可以单一或多个单位剂量储存在适合包装中,并且还可加以进一步灭菌和密封。

[0241] 本申请还提供了在适合包装中包含本文所述的组合物(诸如药物组合物)的制品。适于本文所述的组合物(诸如药物组合物)的包装在本领域中是已知的,并且包括例如小瓶(诸如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、柔性包装(例如密封迈拉(Mylar)或塑料袋)等。这些制

品可进一步加以灭菌和/或密封。

[0242] 本申请还提供了包括本文所述的组合物(诸如药物组合物)的药盒,并且可还包括关于使用组合物的方法诸如本文所述的用途的一个或多个说明。本文所述的药盒可还包括从商业和使用者观点来看可合乎需要的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器、以及具有关于进行本文所述的任何方法的说明的包装插页。

[0243] V. 治疗癌症的方法

[0244] 本申请的一个方面提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本文所述的任何CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。

[0245] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如

scFv) 具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列的scFv。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病

(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤 (BPDCN)、包括套膜细胞白血病 (MCL) 和小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 的非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中, 本文所述的治疗癌症的方法具有以下生物活性中的一者或多者: (1) 杀灭癌细胞; (2) 抑制癌细胞的增殖; (3) 诱导外周T细胞再分布 (例如将T细胞募集至表达CD19的组织或肿瘤); (4) 降低肿瘤尺寸; (5) 缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状; (6) 抑制肿瘤转移 (例如向淋巴结的转移); (7) 延长存活期; (8) 延长达到癌症进展的时间; 以及 (9) 预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中, 由本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物介导的杀灭癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中, 由本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物介导的降低肿瘤尺寸的方法可使肿瘤尺寸降低至少约10% (包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中, 由本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移 (例如向淋巴结的转移) 的方法可使转移抑制至少约10% (包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中, 由本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物介导的延长个体 (诸如人) 的存活期的方法可使所述个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月或更长时间中的任一者。在一些实施方案中, 由本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物介导的延长达到癌症进展的时间的方法可使达到癌症进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中, 本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物可通过活化效应细胞 (例如T细胞, 例如CD8+和/或CD4+T细胞) 来增加、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CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物之前, 个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加的或增强的致敏、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0246] 在一些实施方案中, 提供了一种治疗个体 (诸如人) 中的癌症 (例如DLBCL或ALL) 的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP (诸如BSAP; 或其药物组合物), 所述MSAP包含: I. 特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段, 其中所述抗CD3 Fab片段包含: (a) Ig VH和Ig CH1; 和 (b) Ig VL和Ig CL; 任选地, 其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接; 其中所述抗CD3 Fab片段的所述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; 并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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; II. 特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段 (例如scFv), 其中所述抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 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VL, 所述VL包含: 含有SEQ ID NO: 47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO: 48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO: 6或49的氨基酸序列的HVR-L3; 和III. 任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 的接头; 其中所述抗CD19抗原结合片段 (例如scFv) 融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中, 提供了一种治疗个体 (诸如人) 中的癌症 (例如DLBCL或ALL) 的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP (诸如

BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19抗原结合片段和/或所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID

NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列的scFv。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法具有以下生物活性中的一者或多者:(1)杀灭癌细胞;(2)抑制癌细胞的增殖;(3)诱导外周T细胞再分布(例如将T细胞募集至表达CD19的组织或肿瘤);(4)降低肿瘤尺寸;(5)缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移);(7)延长存活期;(8)延长达到癌症进展的时间;以及(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的杀灭癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的降低肿瘤尺寸的方法可使肿瘤尺寸降低至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)的方法可使转移抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长个体(诸如人)的存活期的方法可使所述个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个

月或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长达到癌症进展的时间的方法可使达到癌症进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物可通过活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞)来增加、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CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加的或增强的致敏、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0247] 在一些实施方案中,MSAP特异性结合超过两个(诸如3个或更多个)表位。举例来说,在一些实施方案中,MSAP包含融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv),和融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端的第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,MSAP是三特异性剂。在一些实施方案中,MSAP是双特异性的(例如BSAP)和二价的。举例来说,在一些实施方案中,二价和双特异性MSAP(或BSAP)包含一个融合于抗CD3 Fab片段的VH或VL的N末端的抗CD19抗原结合片段(例如scFv)。在一些实施方案中,MSAP是双特异性的(例如BSAP)和三价的。举例来说,在一些实施方案中,MSAP包含融合于抗CD3 Fab片段的VH的N末端的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv),和融合于抗CD3 Fab片段的VL的N末端的第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列和/或结构,但结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列的scFv。

[0248] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的

第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv具有相同氨基酸序列,诸如SEQ ID NO:51或59。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如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:53或60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如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:53的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如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:60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如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:53或60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如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:57的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一

些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法具有以下生物活性中的一者或多者:(1)杀灭癌细胞;(2)抑制癌细胞的增殖;(3)诱导外周T细胞再分布(例如将T细胞募集至表达CD19的组织或肿瘤);(4)降低肿瘤尺寸;(5)缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移);(7)延长存活期;(8)延长达到癌症进展的时间;以及(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的杀灭癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的降低肿瘤尺寸的方法可使肿瘤尺寸降低至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)的方法可使转移抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长个体(诸如人)的存活期的方法可使所述个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长达到癌症进展的时间的方法可使达到癌症进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物可通过活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞)来增加、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CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加的或增强的致敏、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0249] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-

L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的抗CD19 scFv,其中所述抗CD19 scFv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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19 scFv的接头;其中所述抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和/或所述第二抗CD19 scFv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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者

抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布爾森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法具有以下生物活性中的一者或多者:(1)杀灭癌细胞;(2)抑制癌细胞的增殖;(3)诱导外周T细胞再分布(例如将T细胞募集至表达CD19的组织或肿瘤);(4)降低肿瘤尺寸;(5)缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移);(7)延长存活期;(8)延长达到癌症进展的时间;以及(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的杀灭癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的降低肿瘤尺寸的方法可使肿瘤尺寸降低至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)的方法可使转移抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长个体(诸如人)的存活期的方法可使所述个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月或更长

时间中的任一者。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长达到癌症进展的时间的方法可使达到癌症进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物可通过活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞)来增加、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CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加的或增强的致敏、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0250] 在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含两个抗CD19 scFv。在一些实施方案中,两个抗CD19 scFv均包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。

[0251] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述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;II.特异性结合CD19的第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv,其中所述第一抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19 scFv融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;其中所述第一抗CD19 scFv和所述第二抗CD19 scFv均包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19 scFv的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19 scFv的第二接头。在一些实施方案中,第一接头和第二接头在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风

暴。在一些实施方案中,癌症选自以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法具有以下生物活性中的一者或多者:(1)杀灭癌细胞;(2)抑制癌细胞的增殖;(3)诱导外周T细胞再分布(例如将T细胞募集至表达CD19的组织或肿瘤);(4)降低肿瘤尺寸;(5)缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移);(7)延长存活期;(8)延长达到癌症进展的时间;以及(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的杀灭癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的降低肿瘤尺寸的方法可使肿瘤尺寸降低至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)的方法可使转移抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长个体(诸如人)的存活期的方法可使所述个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长达到癌症进展的时间的方法可使达到癌症进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物可通过活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞)来增加、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CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加的或增强的致敏、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0252] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的

癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法具有以下生物活性中的一者或多者:(1)杀灭癌细胞;(2)抑制癌细胞的增殖;(3)诱导外周T细胞再分布(例如将T细胞募集至表达CD19的组织或肿瘤);(4)降低肿瘤尺寸;(5)缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移);(7)延长存活期;(8)延长达到癌症进展的时间;以及(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的杀灭癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的降低肿瘤尺寸的方法可使肿瘤尺寸降低至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)的方法可使转移抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长个体(诸如人)的存活期的方法可使所述个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长达到癌症进展的时间的方法可使达到癌症进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物可通过活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞)来增加、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CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加的或增强的致敏、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0253] 在一些实施方案中,提供了一种杀灭个体(诸如人)中的癌细胞(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫

键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种杀灭个体(诸如人)中的癌细胞(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种杀灭个体(诸如人)中的癌细胞(例如DLBCL或ALL)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,由MSAP(诸如BSAP)介导的肿瘤细胞死亡率是至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原

结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴瘤母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0254] 在一些实施方案中,提供了一种抑制个体(诸如人)中的癌细胞(例如DLBCL或ALL)的增殖的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种抑制个体(诸如人)中的癌细胞(例如DLBCL或ALL)的增殖的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种抑制个体(诸如人)中的癌细胞(例如DLBCL或ALL)的增殖的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗

CD3 Fab片段包含：(a) Ig VH和Ig CH1；和(b) Ig VL和Ig CL；任选地，其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接；II. 特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)，其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端，并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端；和III. 任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头，和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中，第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中，第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中，第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中，第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中，第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中，第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中，在MSAP(诸如BSAP；或其药物组合物)存在下，癌细胞增殖速率降低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者。在一些实施方案中，MSAP(诸如BSAP；或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中，方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段的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；并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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，抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列；并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列；并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中，抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL，所述VL包含：含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中，抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH，和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中，抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中，接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中，接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中，MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽，和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中，MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽，和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多

肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0255] 在一些实施方案中,提供了一种诱导个体(诸如人)中的外周T细胞的再分布(例如将T细胞募集至表达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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,存在一种诱导个体(诸如人)中的外周T细胞的再分布(例如将T细胞募集至表达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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种诱导个体(诸如人)中的外周T细胞的再分布(例如将T细胞募集至表达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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原

结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0256] 在一些实施方案中,提供了一种降低个体(诸如人)中的肿瘤尺寸的方法,所述方

法包括向所述个体施用有效量的MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,存在一种降低个体(诸如人)中的肿瘤尺寸的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种降低个体(诸如人)中的肿瘤尺寸的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,在MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)存在下,肿瘤尺寸降低至少约10% (包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/

或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC (SEQ ID NO:45)或CPPCS (SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0257] 在一些实施方案中,提供了一种缓和患有癌症(例如DLBCL或ALL)的个体(诸如人)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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,存在一种缓和患有癌症(例如DLBCL或ALL)的个体(诸如人)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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如

scFv) 融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种缓和患有癌症(例如DLBCL或ALL)的个体(诸如人)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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。

在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0258] 在一些实施方案中,提供了一种降低(诸如根除)个体(诸如人)中预先存在的肿瘤转移(诸如向淋巴结的转移)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,存在一种降低(诸如根除)个体(诸如人)中预先存在的肿瘤转移(诸如向淋巴结的转移)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种降低(诸如根除)个体(诸如人)中预先存在的肿瘤转移(诸如向淋巴结的转移)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a)Ig VH和Ig CH1;和(b)Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序

列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,在MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)存在下,肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)降低至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性

浆细胞样树突细胞赘瘤 (BPDCN)、包括套膜细胞白血病 (MCL) 和小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 的非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0259] 在一些实施方案中,提供了一种降低个体(诸如人)中预先存在的肿瘤转移(诸如向淋巴结的转移)的发生或负荷的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,存在一种降低个体(诸如人)中预先存在的肿瘤转移(诸如向淋巴结的转移)的发生或负荷的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种降低个体(诸如人)中预先存在的肿瘤转移(诸如向淋巴结的转移)的发生或负荷的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0260] 在一些实施方案中,提供了一种延长患有癌症(例如DLBCL或ALL)的个体(诸如人)的存活期的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,存在一种延长患有癌症(例如DLBCL或ALL)的个体(诸如人)的存活期的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合

CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种延长患有癌症(例如DLBCL或ALL)的个体(诸如人)的存活期的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,方法使个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月中的任一者。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和

丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0261] 在一些实施方案中,提供了一种延长个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)达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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,存在一种延长个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)达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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种延长个体(诸如人)中的癌症(例如DLBCL或ALL)达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MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如

scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同氨基酸序列。在一些实施方案中,方法使达到疾病进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病

(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛细胞白血病 (HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤 (BPDCN)、包括套膜细胞白血病 (MCL) 和小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 的非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0262] 本文提供的方法可在辅助环境中实施。在一些实施方案中,方法在新辅助环境中实施,即方法可在初级/确定性疗法之前进行。在一些实施方案中,方法用于治疗先前已加以治疗的个体(诸如人)。本文提供的任何治疗方法都可用于治疗先前尚未加以治疗的个体(诸如人)。在一些实施方案中,方法被用作第一线疗法。在一些实施方案中,方法被用作第二线疗法。

[0263] 本文所述的方法适于治疗多种癌症,包括实体癌症与液体癌症两者。方法可应用于所有分期的癌症,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状态下的癌症。本文所述的方法可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诸如是化学疗法、手术、放射、基因疗法、免疫疗法、骨髓移植、干细胞移植、靶向疗法、低温疗法、超声疗法、光动力疗法、射频消除等。在一些实施方案中,癌症已为先前疗法所难治。

[0264] 可通过本发明方法治疗的实体癌症的实例包括但不限于胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、除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、除胶质母细胞瘤以外的脑癌、肾癌、甲状腺癌等。

[0265] 可通过本发明方法治疗的非实体癌症的实例包括但不限于急性髓系白血病 (AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因 (Bcr-ABL易位) 的慢性髓源性白血病 (CML)、骨髓增生异常综合征 (MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病 (B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛细胞白血病 (HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤 (BPDCN)、包括套膜细胞白血病 (MCL) 和小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 的非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是DLBCL或B-ALL。

[0266] 在一些实施方案中,方法适于治疗在癌细胞的表面上过度表达CD19的癌症。在一些实施方案中,相较于正常细胞,个体中的癌细胞表达至少约超过2、5、10、20、50、100、200、500、1000倍或更多倍中的任一者的CD19。在一些实施方案中,CD19阳性癌症是白血病或淋巴瘤。在一些实施方案中,CD19阳性癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病 (AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因 (Bcr-ABL易位) 的慢性髓源性白血病 (CML)、骨髓增生异常综合征 (MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病 (B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛细胞白血病 (HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤 (BPDCN)、包括套膜细胞白血病 (MCL) 和小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 的非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0267] 因此,在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的CD19阳性癌症(诸如白血病或淋巴瘤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药

物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的CD19阳性癌症(诸如白血病或淋巴瘤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段(例如scFv);和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的接头;其中所述抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。在一些实施方案中,提供了一种治疗个体(诸如人)中的CD19阳性癌症(诸如白血病或淋巴瘤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物),所述MSAP包含:I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:(a) Ig VH和Ig CH1;和(b) Ig VL和Ig CL;任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;II.特异性结合CD19的第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv),其中所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端;和III.任选的连接所述抗CD3 Fab片段的所述VH和所述第一抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第一接头,和连接所述抗CD3 Fab片段的所述VL和所述第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)的第二接头。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有相同氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)具有不同序列。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合相同CD19表位。在一些实施方案中,第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段(例如scFv)结合不同CD19表位。在一些实施方案中,第一接头和第二接头在序列方面是相同的。在一些实施方案中,第一接头和第二接头具有不同序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端(例如CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位)。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的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;并且/或者其中抗CD3 Fab片段的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,抗CD3 Fab片段的VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL由约1至约5个二硫键(例如2个二硫键)连接。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者抗CD3 Fab片段的CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段的CH1和CL的C末端各自还包含能够形成分子间二硫键的共价结合序列CPPC(SEQ ID NO:45)或CPPCS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)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VL,所述VL包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段(例如scFv)包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和/或含有SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合片段是包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列的scFv。在一些实施方案中,接头包含约2至约30(例如约2至约15)个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。在一些实施方案中,接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组(例如SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第一多肽,和含有SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列的第二多肽。在一些实施方案中,MSAP(诸如BSAP)或其组合物(诸如药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,方法不诱导细胞因子风暴。在一些实施方案中,CD19阳性癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。在一些实施方案中,本文所述的治疗CD19阳性癌症的方法具有以下生物活性中的一者或多者:(1)杀灭癌细胞;(2)抑制癌细胞的增殖;(3)诱导外周T细胞再分布(例如将T细胞募集至表达CD19的组织或肿瘤);(4)降低肿瘤尺寸;(5)缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移);(7)延长存活期;(8)延长达到癌症进展的时间;以及(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的杀灭癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的降低肿瘤尺寸的方法可使肿瘤尺寸降低至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)的方法可使转移抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)或其药物组合物介导的延长个体(诸如人)的存活期的方法可使所述个体的存活期延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,由本文所述的CD3×

CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物介导的延长达到癌症进展的时间的方法可使达到癌症进展的时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或更长时间中的任一者。在一些实施方案中,本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物可通过活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞)来增加、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CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP) 或其药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞具有增加的或增强的致敏、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。

[0268] 本文所述的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物) (或其药物组合物)的示例性施用途径包括但不限于口服、静脉内、腔内、肿瘤内、动脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、经粘膜、经皮、经眼、经表面、腹膜内、颅内、胸膜内和经表皮途径,或递送至已知含有癌细胞的淋巴腺、身体间隙、器官或组织中。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)以静脉内方式施用。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)通过输注加以施用。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)以皮下方式施用。在一些实施方案中,MSAP通过注射加以施用。

[0269] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)通过静脉内输注加以施用。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)历经至多约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者的时期输注至个体。在一些实施方案中,(诸如BSAP)历经约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小时中的任一者的时期输注至个体。(诸如BSAP)可以任何适合速率输注至个体。在一些实施方案中,(诸如BSAP)可以超过约0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 或更快中的任一者的速率输注。

[0270] 施用至个体(诸如人)的CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP)的给药方案可随特定MSAP (诸如BSAP)组合物(诸如药物组合物)、施用方法、以及所治疗癌症的特定类型和分期而变化。在一些实施方案中,MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)的有效量低于诱导毒理学效应(即高于临床上可接受的毒性水平的效应)的水平,或处于当组合物被施用至个体时,潜在副作用可被控制或耐受的水平。

[0271] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP (诸如BSAP;或其药物组合物)的有效量低于诱导中枢神经系统中的不利影响的水平。举例来说,在抗体疗法中观察到的不利影响是发生输注相关的副作用,诸如细胞因子释放综合征(“CRS”),其重度情况被称为“细胞因子风暴”。当诱导“细胞因子风暴”时,健康个体的免疫系统被活化,并且释放大量促炎性细胞因子,诸如INF- γ 、CCL2、IIL-10、IL-6等。它是一种潜在致命性免疫反应,通常由细胞因子与免疫细胞之间的正反馈环路组成,伴有各种细胞因子的水平高度升高。被描述为与CRS相关的其他不利副作用是疲劳、呕吐、心动过速、高血压、背痛,而且还包括中枢神经系统反应

(CNS反应),诸如癫痫发作、脑病变、脑水肿、无菌性脑膜炎和头痛。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以不诱导细胞因子释放综合征诸如细胞因子风暴的剂量加以施用。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以不诱导一种或多种选自由IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF和INF- γ 组成的组的细胞因子的显著释放的剂量加以施用。在一些实施方案中,细胞因子的显著释放是历经至少约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者的过程,细胞因子持续释放。在一些实施方案中,细胞因子的显著释放是细胞因子的血清或血液水平在至少约1、5、10、20、50、100、200、500、1000或更大pg/mL中的任一者的浓度下。在不受任何理论束缚下,本文所述的CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP)(或其药物组合物)需要结合靶标肿瘤细胞上的CD19以募集和活化T细胞。此要求可极大降低非所要细胞因子风暴,以及在不存在所需靶标肿瘤细胞下的非所要T细胞活化。

[0272] 在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以至多约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1mg/kg中的任一者的剂量施用。本文所述的剂量可指适于食蟹猴的剂量,所述剂量的人等效剂量,或用于个体的特定物种的等效剂量。

[0273] CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)的有效量可以单次剂量或以多次剂量施用。对于包括以多次剂量施用MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)的方法,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、每周/持续三周中的两周、每周/持续四周中的三周、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,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)约每2周一次、每3周一次、每4周一次、每6周一次、或每8周一次加以施用。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)以至少约一周1次、2次、3次、4次、5次、6次、或7次(即每日)中的任一者加以施用。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天中的任一者。在一些实施方案中,每次施用之间的间隔超过约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年中的任一者。在一些实施方案中,在给药时程中不存在间断。

[0274] CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)的施用可历经诸如1天至约1周,约1周至约1个月,约1个月至约1年,约1年至约数年的延长时期加以延长。在一些实施方案中,CD3×CD19 MSAP(诸如BSAP;或其药物组合物)历经至少约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者的时期加以施用。

[0275] 示例性实施方案

[0276] 实施方案1.一种多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含:

[0277] I.特异性结合CD3的抗CD3 Fab片段,其中所述抗CD3 Fab片段包含:

[0278] (a)免疫球蛋白(Ig)重链可变区(VH)和Ig重链恒定区(CH1);和

- [0279] (b) Ig轻链可变区 (VL) 和Ig轻链恒定区 (CL) ;
- [0280] 任选地,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由二硫键连接;
- [0281] II. 特异性结合CD19的抗CD19抗原结合片段;和
- [0282] III. 任选的连接所述抗CD3 Fab片段和所述抗CD19抗原结合片段的接头。
- [0283] 实施方案2. 如实施方案1所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19抗原结合片段融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端。
- [0284] 实施方案3. 如实施方案1所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19抗原结合片段融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。
- [0285] 实施方案4. 如实施方案1所述的多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含第一抗CD19抗原结合片段和第二抗CD19抗原结合片段,其中所述第一抗CD19抗原结合片段融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VH的N末端,并且其中所述第二抗CD19抗原结合片段融合于所述抗CD3 Fab片段的所述VL的N末端。
- [0286] 实施方案5. 如实施方案1-4中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的N末端。
- [0287] 实施方案6. 如实施方案5所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段特异性结合CD3 ϵ 的氨基酸1-27内的表位。
- [0288] 实施方案7. 如实施方案5或6所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链高变区H1 (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;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链高变区L1 (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。
- [0289] 实施方案8. 如实施方案5-7中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。
- [0290] 实施方案9. 如实施方案1-8中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由约1至约5个二硫键连接。
- [0291] 实施方案10. 如实施方案9所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1和所述CL由约2个二硫键连接。
- [0292] 实施方案11. 如实施方案1-10中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD3 Fab片段的所述CH1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD3 Fab片段的所述CL包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。
- [0293] 实施方案12. 如实施方案1-11中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19抗原结合片段包含VH,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述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;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段包含VL,其中所述抗CD19抗原结合片段的所述VL包含含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-L2、和含有SEQ ID NO:6或49的氨基酸序列的HVR-L3。
- [0294] 实施方案13. 如实施方案12所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19抗原

结合片段的所述VH包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且/或者其中所述抗CD19抗原结合片段的所述VL包含SEQ ID NO:8或50的氨基酸序列。

[0295] 实施方案14.如实施方案1-13中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19抗原结合片段是单链可变片段(scFv)。

[0296] 实施方案15.如实施方案14所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述抗CD19 scFv包含SEQ ID NO:51或59的氨基酸序列。

[0297] 实施方案16.如实施方案14或15所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述多特异性抗原结合蛋白包含第一抗CD19 scFv和第二抗CD19 scFv。

[0298] 实施方案17.如实施方案16所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第一抗CD19scFv和所述第二抗CD19scFv具有相同氨基酸序列。

[0299] 实施方案18.如实施方案1-17中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述接头包含约2至约30个选自由甘氨酸、丝氨酸、精氨酸和丙氨酸组成的组的氨基酸残基。

[0300] 实施方案19.如实施方案18所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述接头包含约2至约15个氨基酸残基。

[0301] 实施方案20.如实施方案18或19所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述接头选自由SEQ ID NO:20-22、29和31-44组成的组。

[0302] 实施方案21.如实施方案1-20中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述多特异性抗原结合蛋白包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53或60的氨基酸序列,并且其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:54或61的氨基酸序列。

[0303] 实施方案22.如实施方案21所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

[0304] 实施方案23.如实施方案21所述的多特异性抗原结合蛋白,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0305] 实施方案24.一种经分离核酸,所述经分离核酸编码实施方案1-23中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白。

[0306] 实施方案25.一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案1-23中的任一者所述的多特异性抗原结合蛋白以及任选的药学上可接受的载体。

[0307] 实施方案26.一种治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的实施方案25所述的药物组合物。

[0308] 实施方案27.如实施方案26所述的方法,其中所述药物组合物以静脉内方式施用。

[0309] 实施方案28.如实施方案26或27所述的方法,其中所述个体是人。

[0310] 实施方案29.如实施方案26-28中的任一者所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML)、包括CML的母细胞性危象和与CML相关的埃布尔森致癌基因(Bcr-ABL易位)的慢性髓源性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性B淋巴细胞性白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、包括CLL的里克特氏综合征或里克特氏转化的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤(BPDCN)、包括套膜细胞白血病(MCL)和小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症、以及伯基特氏淋巴瘤。

[0311] 实施方案30.如实施方案29所述的方法,其中所述癌症是DLBCL或ALL。

[0312] 实施例

[0313] 以下实施例仅意图例示本发明,因此不应被视为以任何方式限制本发明。以下实施例和详细描述通过说明的方式而非通过限制的方式加以提供。对于其中未描述实验方法的细节的实施方案,此类方法根据常规条件进行,所述常规条件诸如是Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述或如由制造商建议的那些。

[0314] 实施例1:示例性多特异性抗原结合蛋白的表达和纯化

[0315] 使用标准方案表达多特异性抗原结合蛋白(MSAP)。将编码MSAP的第一多肽链和第二多肽链的DNA片段克隆至基于pBOS的载体中以产生表达第一多肽链和第二多肽链的构建体。构建体还含有编码信号肽的序列以有助于第一多肽链和第二多肽链蛋白的分泌。

[0316] 示例性CD19×CD3 MSAP的氨基酸序列及其编码核酸序列显示于表1中。图1A描绘抗CD3 scFv融合在抗CD19 Fab片段的VH的N末端的ITAB2009 MSAP构象。图1B描绘第一抗CD19 scFv融合在抗CD3 Fab片段的VH的N末端,并且第二抗CD19 scFv融合在抗CD3 Fab片段的VL的N末端的ITAB2007 MSAP构象。

[0317] 表1. 示例性CD19×CD3 MSAP

蛋白质代号	第一多肽链的氨基酸序列	第二多肽链的氨基酸序列	编码第一多肽链的核酸序列	编码第二多肽链的核酸序列	接头
[0318] ITAB2007	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:44 (GGGGS)
ITAB2009	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:21 (SGGGGS)

[0319] 使用CD19×CD3 MSAP ITAB2007作为一实例,将编码ITAB2007的第一多肽链的DNA片段(核酸序列SEQ ID NO:55)和编码ITAB2007的第二多肽链的DNA片段(核酸序列SEQ ID NO:56)分别克隆至基于pBOS的载体中。构建体还在第一多肽链和/或第二多肽链的上游含有科扎克(Kozak)序列和编码信号肽的序列(氨基酸序列显示为SEQ ID NO:25,核酸序列显示为SEQ ID NO:26),由此产生表达ITAB2007 MSAP的第一多肽链和第二多肽链的构建体。CD19×CD3 MSAP ITAB2009以类似方式构建。测序结果指示正确基因插入。将构建体转化至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。对于转染,将10mL含有质粒DNA(编码MSAP的第一多肽和第二多肽的DNA构建体)和25kD聚乙烯亚胺(PEI;DNA/线性25kD PEI重量比1:3)的培养基添加至90mL细胞培养物中。或者,根据制造商说明书使用ExpiFectamine 293转染试剂盒(Invitrogen)将约30μg DNA混合物(编码MSAP的第一多肽和第二多肽的DNA构建体)转染至HEK293细胞中。在CO₂孵育器(37°C,5%CO₂,125rpm)中培养经转染细胞约6天,接着收集上清液。

[0320] 用IgG-CH1亲和色谱法(Thermo Fisher Scientific)纯化细胞培养上清液以获得靶标蛋白质。将细胞培养上清液经0.22μm无菌膜过滤,上样于用150mM NaCl和10mM磷酸盐

缓冲盐水 (PBS, pH 7.5) 平衡的 IgG-CH1 亲和基质上, 并且用 150mM NaCl 和 50mM NaAc 缓冲液 (pH 3.5) 洗脱。将洗脱物用 2M Tris 洗脱液调整至 pH 7.2, 并且用具有 10kD 分子量截断值的 Vivaspin 离心浓缩器 (Sartorius) 浓缩。在 4°C 下储存纯化蛋白质。

[0321] 实施例 2: CD19 × CD3 MSAP 的结合亲和力的测定

[0322] 抗原结合亲和力

[0323] 使用 Octet QK^e 与抗人 IgG Fc 捕集 (AHC) 生物传感器来测量示例性 CD19 × CD3 MSAP (即 ITAB2007 和 ITAB2009) 中的抗 CD19 结合结构域和抗 CD3 结合结构域与相应人抗原和食蟹猴抗原的结合亲和力。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) 具有由融合于人 IgG Fc 的 CD3g 氨基酸 1-27 组成的肽。CD3 抗原构建体的表达已描述于 US 8,846,042 中。用稀释液 (PBS) 将 CD3 抗原构建体或 CD19 抗原 (食蟹猴/恒河猴 CD19 蛋白 (Fc 标签), Sino Biological, Inc; 重组人 CD19 Fc 嵌合体, R&D Systems Inc) 稀释至 0.02mg/mL, 接着固定在抗人 Fc 捕集 (AHC) 生物传感器上。将 ITAB2007 和 ITAB2009 稀释至各种浓度, 并且添加至黑色微板中。还设置了仅含有 PBS 的对照孔。使用 ForteBio 数据获取和 ForteBio 数据分析软件分析检测结果。

[0324] 如表 2 中所示, 示例性 CD19 × CD3 MSAP (ITAB2007 或 ITAB2009) 展现对人抗原和食蟹猴抗原 (CD19 或 CD3) 的体外交叉反应性。MSAP 的交叉反应性可有助于将来自食蟹猴的毒性和功效研究结果外推至人临床研究。

[0325] 表 2. 体外结合亲和力 (KD)

[0326]

抗原	ITAB2007	ITAB2009
huCD19.Fc	$8.91 \times 10^{-10} \text{M}$	$1.82 \times 10^{-8} \text{M}$
cynoCD19.Fc	$8.91 \times 10^{-9} \text{M}$	$2.96 \times 10^{-8} \text{M}$
CD3εAA 1-27.Fc	$5.99 \times 10^{-9} \text{M}$	$2.35 \times 10^{-8} \text{M}$
cyno CD3εAA 1-27.Fc	$1.88 \times 10^{-8} \text{M}$	$1.29 \times 10^{-8} \text{M}$

[0327] 实施例 3: CD19 × CD3 MSAP 介导的针对自体 B 细胞的 PBMC 细胞毒性

[0328] 人 PBMC (hPBMC) 制备: 将来自健康成人的白血细胞浓缩样品用 PBS 缓冲液 (Gibco) 稀释, 通过密度梯度离心 (Ficoll-Paque, GE Healthcare) 加以离心以获得 PBMC, 用 PBS 洗涤两次, 接着在室温、1000g 下离心 10 分钟。收集细胞, 并且再悬浮于含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基 (Gibco) 中。

[0329] 将每孔 200μL 3×10^5 个 PBMC 添加至 96 孔板中。接着根据实验设计添加稀释至各种浓度的 CD19 × CD3 MSAP ITAB2007 和 ITAB2009。不添加 CD19 × CD3 MSAP 的含有 PBMC 的孔设置为对照。在 37°C、5% CO₂ 下将混合物孵育约 18-24 小时。收集细胞, 并且与 FITC 小鼠抗人 CD20 抗体 (BD Pharmingen™) 一起在室温下孵育 30 分钟。在 2μg/mL 下添加碘化丙锭 (Sigma), 并且染色 15 分钟。使用 ACCURI C6 (BD Bioscience) 进行分析。

[0330] 碘化丙锭 (PI) 是一种通常使用的核荧光染料。PI 不能穿透完整细胞膜, 因此不能染色具有完整细胞膜的活细胞。由于死细胞的膜完整性丧失, 所以 PI 可进入死细胞以结合 DNA。因此, PI 染色可用于鉴定死细胞。CD20 阳性指示活 B 细胞, 而 CD20 与 PI 两者均呈阳性的细胞代表死 B 细胞。使用下式计算 CD19 × CD3 MSAP 介导的细胞毒性: 死亡率 % = [1 - (样品孔活 B 细胞 / 样品孔总 B 细胞) / (对照孔活 B 细胞 / 对照孔总 B 细胞)] × 100 %。

[0331] 将死亡率设为 y 轴, 并且将 MSAP 浓度设为 x 轴。使用 4 参数逻辑模型拟合曲线以确定

EC50。

[0332] 如可由图2所见,CD19×CD3 ITAB2007 MSAP与ITAB2009 MSAP两者均能够介导由人PBMC达成的自体B细胞杀灭,其中EC50分别是约0.16pM和2.4pM。ITAB2007 CD19×CD3 MSAP在杀灭自体B细胞方面优于ITAB2009。

[0333] 实施例4:CD19×CD3 MSAP介导的针对肿瘤细胞的PBMC细胞毒性(细胞毒性测定)

[0334] 根据实施例3中所述的方法制备人PBMC,并且再悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0335] 将Daudi细胞(靶标细胞)洗涤和离心,用DiOC18(3,3'-双十八基氧碳花青高氯酸盐,Life technologies)染色15分钟,接着再悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI1640培养基中。将100μL 3×10^4 个Daudi细胞和100μL 3×10^5 个PBMC添加至96孔板的每个孔中。根据实验设计将CD19×CD3 MSAP(例如ITAB2007、ITAB2009)稀释至各种浓度,并且添加至细胞混合物中。未添加MSAP的孔(PBMC+Daudi靶标细胞)设置为对照。在37°C下,在5%CO₂下进行约48小时孵育。设置了DiOC18非染色对照孔。用碘化丙啶(PI, Sigma)染色细胞以代表死细胞。ACCURI C6细胞仪(BD Bioscience)用于分析。

[0336] DiOC18阳性细胞代表活Daudi细胞,而DiOC18与PI两者均呈阳性的细胞代表死Daudi细胞。使用下式计算CD19×CD3 MSAP介导的细胞毒性:死亡率% = [1 - (样品孔活B细胞/样品孔总B细胞) / (对照孔活B细胞/对照孔总B细胞)] × 100%。

[0337] 将死亡率设为y轴,并且将MSAP浓度设为x轴。使用4参数逻辑模型拟合曲线以确定EC50。

[0338] 如可由图3所见,CD19×CD3 MSAP ITAB2007与ITAB2009均有效介导人PBMC杀灭肿瘤细胞诸如Daudi。

[0339] 实施例5:由CD19×CD3 MSAP达成的对人Pri-T细胞的肿瘤依赖性活化

[0340] CD8是一种典型T细胞表面抗原。CD69是一种在T细胞活化后上调的细胞表面受体。CD69+CD8+亚型的百分比可充当T细胞的活化状况的有效指标。进行基于FACS的T细胞活化测定以测定示例性CD19×CD3 MSAP(即ITAB2009和ITAB2007)在T细胞活化方面的能力。

[0341] 在ITAB2009或ITAB2007介导的人T细胞活化(CD69+CD8+T细胞相对于总CD8+T细胞的比率)中研究Pfeiffer(弥漫性大B细胞淋巴瘤)和Daudi(伯基特氏淋巴瘤),即两种具有不同CD19表达水平的B淋巴瘤细胞系(图4)。

[0342] Pri-T细胞的制备:根据实施例3中所述的方法制备人PBMC,并且再悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。将PBMC接种至用小鼠IgG2a抗人CD3抗体(5 μg/mL;BioLegend, Inc.)和小鼠IgG1抗人CD28抗体(1 μg/mL;BioLegend, Inc.)包被的培养瓶中,并且在37°C、5%CO₂孵育器中培养3天。将细胞用IL-2再处理3天,接着收集以进行未来实验。将这些细胞命名为Pri-T。

[0343] 温和混合Pri-T(3×10^4 个细胞/100μL)和Daudi或Pfeiffer细胞(3×10^4 个细胞/100μL),接着添加ITAB2009或ITAB2007 CD19×CD3 MSAP,并且孵育不同孵育时间。接着收集细胞以用FITC小鼠抗人CD69抗体(BD Pharmingen™)和CD8抗体(3B5) RPE缀合物(Invitrogen)染色30分钟,并且使用流式细胞仪进行分析。使用ACCURI®C6细胞仪(BD Biosciences)分析样品。结果显示于图5A至图5B中。通过计算CD69+相对于CD8+的百分比来呈现数据。

[0344] 如图5A至图5B中所示,在相同条件下,就作为具有低CD19表达的弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)细胞系的Pfeiffer细胞(图5A,图4)来说,相比于ITAB2009,ITAB2007 CD19×CD3 MSAP更有效诱导T细胞活化;而就作为具有高CD19表达的淋巴瘤细胞系的Daudi(图4)来说,ITAB2007和ITAB2009 CD19×CD3 MSAP显示类似T细胞活化作用(图5B)。这些结果指示双特异性三价ITAB2007 CD19×CD3 MSAP具有靶向低CD19表达性肿瘤细胞的潜力。

[0345] 实施例6:CD19×CD3 MSAP介导的针对肿瘤细胞的人Pri-T细胞细胞毒性(细胞毒性测定)

[0346] 根据实施例5中所述的方法制备Pri-T细胞,并且再悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0347] 将Reh细胞(急性淋巴细胞性白血病)洗涤和离心,用CFSE(5-(和6)-二乙酸羧基荧光素丁二酰亚胺酯,eBioscience)染色10分钟,接着再悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。将100 μ L 1×10⁴个Reh细胞和100 μ L 4×10⁴个Pri-T细胞添加至96孔板的每个孔中。根据实验设计将CD19×CD3 MSAP(例如ITAB2007、ITAB2009)稀释至各种浓度,并且添加至细胞混合物中。未添加MSAP的孔(Pri-T+Reh靶标细胞)设置为对照。在37°C下,在5%CO₂下进行约24小时孵育。将细胞用7-AAD(7-氨基-放线菌素,BD)染色10分钟。CytotoflexS(Beckman)用于分析。

[0348] CFSE阳性细胞代表Reh细胞,而7-AAD阳性细胞代表死细胞。使用下式计算CD19×CD3 MSAP介导的细胞毒性:死亡率%=[1-(样品孔活B细胞/样品孔总活细胞)/(对照孔活B细胞/对照孔总活细胞)]×100%。

[0349] 将死亡率设为y轴,并且将MSAP浓度设为x轴。使用4参数逻辑模型拟合曲线以确定EC50。

[0350] 如图6中所示,在介导人Pri-T细胞杀灭肿瘤细胞诸如Reh细胞方面,相较于ITAB2009,CD19×CD3 MSAP ITAB2007显示显著更好的有效性。

[0351] 实施例7:CD19×CD3 MSAP在免疫重建小鼠模型中在杀灭人伯基特氏淋巴瘤肿瘤异种移植方面的功效测定

[0352] 为考查示例性CD19×CD3 MSAP(即ITAB2007)抑制人伯基特氏淋巴瘤肿瘤异种移植的生长的作用,采用具有用人淋巴细胞重建的免疫系统,并且用Raji肿瘤细胞加以植入的免疫缺陷小鼠进行体内药物功效测定。

[0353] 对于癌细胞接种,在体外培养并收集Raji伯基特氏淋巴瘤细胞系,用在冰上预先冷却的无血清L-15培养基(Gibco)再悬浮,并且放置在冰上供稍后使用。对于人PBMC重构,收集由健康人供者捐献的白细胞浓缩物,通过密度梯度离心(Ficoll-Paque, GE Healthcare)加以离心以获得PBMC,再悬浮于在冰上预先冷却的RPMI 1640培养基(Gibco)中,并且放置在冰上供稍后使用。

[0354] 在研究开始之前至少一周,在SPF条件(经AAALAC认可)下饲养七至八周龄雌性NOG小鼠(NOD.Cg-Prkdc^{scid}II2rg^{tmlSug}/JicCr1)。持续两天(第-4天和第-3天)每天在25mg/kg的浓度下用白消安(Busulfan)(Sigma)腹膜内处理小鼠,接着在第0天以0.2mL/小鼠的体积用2.0×10⁶个细胞/小鼠的Raji细胞在小鼠的右背部侧腹中皮下接种,继之以在第3天以0.2mL/小鼠的体积使用4.0×10⁶个细胞/小鼠的来自一个健康供者的未刺激人PBMC进行腹膜内重构。

[0355] 在Raji肿瘤生长至约100-300mm³时的第14天,将三十二只携带肿瘤的小鼠随机分入4组中以进行CD19×CD3 MSAP治疗(每组八只小鼠),并且每日分别用媒介物(PBST,对照)、0.5μg/kg ITAB2007、5μg/kg ITAB2007、或50μg/kg ITAB2007加以腹膜内治疗。在随机化之后,一周两次使用测径规测量每个肿瘤的长度和宽度。基于下式计算单个肿瘤体积:肿瘤体积(mm³)=长度(mm)×宽度(mm)×宽度(mm)×0.5。肿瘤生长抑制率(TGI%)用于评估药物功效。 $TGI\% = [1 - (avT_i - avT_0) / (avC_i - avC_0)] \times 100$,其中avT_i-avT₀是治疗组的在第i天的平均肿瘤体积减去在治疗开始那天(即第14天)的平均肿瘤体积,并且avC_i-0是媒介物对照组的在第i天的平均肿瘤体积减去在治疗开始那天(即第14天)的平均肿瘤体积。

[0356] 图7显示在用人PBMC接种的免疫重建NOG小鼠中,ITAB2007针对皮下Raji异种移植肿瘤的生长抑制作用。在研究结束时,媒介物对照组的平均肿瘤体积是2320.96±276.62mm³(在第29天),对于ITAB2007在0.5μg/kg组的情况下,平均肿瘤体积是2477.04±331.34mm³(在第32天),对于ITAB2007在5μg/kg组的情况下,平均肿瘤体积是1534.02±159.21mm³(在第32天),并且对于ITAB2007在50μg/kg组的情况下,平均肿瘤体积是370.05±207.68mm³(在第43天)。在第29天,在用ITAB2007在0.5μg/kg、5μg/kg和50μg/kg下治疗后,肿瘤生长抑制率(TGI%)分别是23.0%(p=0.9999)、57.0%(p=0.5176)和95.1%(p=0.0002)。

[0357] 因此,在白消安调理NOG小鼠中的骨髓,以及使用人PBMC重建免疫系统之后,施用CD19×CD3 MSAP(即ITAB2007)可有效抑制人伯基特氏淋巴瘤细胞Raji在小鼠中的体内生长,从而指示CD19×CD3 MSAP可在体内介导免疫细胞杀灭肿瘤细胞,并且以剂量依赖性方式显著抑制肿瘤生长。

[0358] 实施例8:采用静脉内注射Reh白血病肿瘤异种移植物和人原代T细胞的小鼠存活模型(免疫重建小鼠模型)进行的CD19×CD3 MSAP功效测定

[0359] 为考查示例性CD19×CD3 MSAP(ITAB2007和ITAB2009)对异种移植肿瘤的生长抑制作用,评估用人前体B细胞(前B)急性淋巴母细胞性白血病(ALL)Reh细胞和人原代T细胞静脉内注射的免疫缺陷NOD/SCID小鼠以测定MSAP延长白血病存活率的体内功效。

[0360] 在研究开始之前至少一周,在SPF条件(经AAALAC认可)下饲养八至十周龄雌性NOD/SCID(NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NcrCr1)小鼠。

[0361] 根据实施例5中所述的方法制备Pri-T细胞,并且再悬浮于含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0362] 在37℃、5%CO₂孵育器中,在含有10%FBS(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco)中培养Reh细胞。

[0363] 在第0天以0.2mL/小鼠的体积用1.0×10⁷个细胞/小鼠的Reh细胞通过尾部静脉来对小鼠进行静脉内接种,随后以0.2mL/小鼠的体积用4.0×10⁶个细胞/动物的体外培养人原代T细胞(Pri-T)通过尾部静脉来进行静脉内重构,在第3天、第9天、第15天和第21天总共进行4次注射。

[0364] 将三十七只进行了Reh癌细胞接种和人原代T细胞重构的NOD/SCID小鼠随机分入3组中以在第3天在注射人原代T细胞之后用媒介物(PBST;n=13)、ITAB2009(n=12)或ITAB2007(n=12)进行腹膜内治疗。ITAB2009和ITAB2007的给药方案如下:每个循环50μg/kg,每天一次,持续3天,继之以100μg/kg,每天一次,持续3天,持续从第3天至第26天的总共

4个循环,并且在注射人原代T细胞之后2小时起始。每日监测和记录临床观察和存活率。

[0365] 如图8中所示,媒介物组中小鼠的中值存活期是肿瘤细胞接种后35天,截至第50天,所有小鼠都已死亡或被安乐死。相较于媒介物对照,ITAB2009或ITAB2007 CD19×CD3 MSAP治疗显著延长了小鼠存活率,其中ITAB2009达成的中值存活期是53.5天($p<0.0001$, $HR=0.2294$),并且ITAB2007达成的中值存活期是47.5天($p=0.0003$, $HR=0.2977$)。

[0366] 总之,三价形式ITAB2007 CD19×CD3 MSAP显示了极大体内Reh细胞(ALL细胞系)杀灭功效,并且在介导由人Pri-T细胞达成的体外Reh细胞杀灭方面,相较于ITAB2009,显示了显著更好的效能。此外,相较于二价形式ITAB2009 CD19×CD3 MSAP,就体外和体内人B细胞肿瘤杀灭来说,ITAB2007显示了好得多的功效。总之,ITAB2007显示了用以靶向低CD19表达性肿瘤细胞的极大潜力。

[0367] 本发明中提及的所有参考文献都通过引用并入本文,就好像那些参考文献已单独地通过引用并入本文一样。尽管描述提及了特定实施方案,但将为本领域技术人员明了的是本发明可以这些特定细节的变化形式加以实施。因此,本发明不应解释为限于本文阐述的实施方案。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 埃泰美德(香港)有限公司
- [0003] <120> 能够结合CD19和CD3的多特异性抗原结合蛋白及其用途
- [0004] <130> 72062-20016.41
- [0005] <140> 尚未分配
- [0006] <141> 同时随同提交
- [0007] <150> PCT/CN2018/123108
- [0008] <151> 2018-12-24
- [0009] <160> 61
- [0010] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 5
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [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(Artificial Sequence)
- [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(Artificial Sequence)
- [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(Artificial Sequence)

[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)			
[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(Artificial Sequence)			
[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(Artificial Sequence)			
[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(Artificial Sequence)			
[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(Artificial Sequence)			

[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(Artificial Sequence)
 [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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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(Artificial Sequence)
[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

[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	475 480
[0383]	Pro Cys Ser		
[0384]	<210> 24		
[0385]	<211> 223		
[0386]	<212> PRT		
[0387]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[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 15
[0393]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val		
[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 80
[0401]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His		
[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	155 160
[0411]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[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		

- [0462] <400> 28
- [0463] gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
- [0464] tctgtgcag cctctggatt cacctttaac acctacgcca tgaactgggt cgcagcagct 120
- [0465] ccaggaagg ggctggagtg ggtcgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
- [0466] tattatgccg attcagtgaag agaccggttc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
- [0467] ctgtatctgc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgtgaga 300
- [0468] catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgett actggggcca agggacaatg 360
- [0469] gtcaccgtct cttcaggtgg cgggtggcagc ggcgggtggtg ggtccgggtg cggcggatct 420
- [0470] caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc 480
- [0471] acctgctgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgcccaactg ggtccagcag 540
- [0472] aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtggtacca acaagcagc tccaggtacc 600
- [0473] cctgcccggc tctcaggtc cctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgtg 660
- [0474] cagcctgagg acgagctga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 720
- [0475] ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaagt ggcgggtgag gatctcaggt gcagctggtg 780
- [0476] cagtctggcc ccgagtaat caagcctggc ggcagcgtga agatgagctg caaggcctcc 840
- [0477] ggctacacct tcaccagta cgtgatgcac tgggtgcgcc agaagcctgg acagggctg 900
- [0478] gaatggatcg gctacatcaa ccctacaac gatggcacca agtacaacga gaagttcaag 960
- [0479] ggcagagcca ccctgaccag cgacaagagc agcagcaccg cctacatgga actgagcagc 1020
- [0480] ctgcggagcg aggacagcgc cgtgtactat tgtgccagag gcacctacta ctacggcagc 1080
- [0481] cgggtgttcg actactgggg acagggcacc acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 1140
- [0482] ggcccatecg tcttcccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 1200
- [0483] ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc 1260
- [0484] gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 1320
- [0485] ctcagcagcg tggtagcctg gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac 1380
- [0486] gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtcca 1440
- [0487] ccgtgctcat ag 1452
- [0488] <210> 29
- [0489] <211> 6
- [0490] <212> PRT
- [0491] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0492] <220>
- [0493] <223> 合成构建体
- [0494] <400> 29
- [0495] Gly Arg Ala Gly Gly Gly
- [0496] 1 5
- [0497] <210> 30
- [0498] <211> 6
- [0499] <212> PRT
- [0500] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0501] <220>
- [0502] <223> 合成构建体
- [0503] <400> 30

- [0504] Pro Leu Gly Leu Ala Gly
[0505] 1 5
[0506] <210> 31
[0507] <211> 1
[0508] <212> PRT
[0509] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0510] <220>
[0511] <223> 合成构建体
[0512] <220>
[0513] <221> 变体
[0514] <222> 1
[0515] <223> 可以重复至少1次的方式存在
[0516] <400> 31
[0517] Gly
[0518] 1
[0519] <210> 32
[0520] <211> 2
[0521] <212> PRT
[0522] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0523] <220>
[0524] <223> 合成构建体
[0525] <220>
[0526] <221> 变体
[0527] <222> (1) ... (2)
[0528] <223> 可以重复至少1次的方式存在
[0529] <400> 32
[0530] Gly Ser
[0531] 1
[0532] <210> 33
[0533] <211> 5
[0534] <212> PRT
[0535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0536] <220>
[0537] <223> 合成构建体
[0538] <220>
[0539] <221> 变体
[0540] <222> (1) ... (5)
[0541] <223> 可以重复至少1次的方式存在
[0542] <400> 33
[0543] Gly Ser Gly Gly Ser
[0544] 1 5
[0545] <210> 34

- [0546] <211> 4
[0547] <212> PRT
[0548] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0549] <220>
[0550] <223> 合成构建体
[0551] <220>
[0552] <221> 变体
[0553] <222> (1) ... (4)
[0554] <223> 可以重复至少1次的方式存在
[0555] <400> 34
[0556] Gly Gly Gly Ser
[0557] 1
[0558] <210> 35
[0559] <211> 5
[0560] <212> PRT
[0561] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0562] <220>
[0563] <223> 合成构建体
[0564] <220>
[0565] <221> 变体
[0566] <222> (1) ... (5)
[0567] <223> 可以重复至少1次的方式存在
[0568] <400> 35
[0569] Gly Gly Gly Gly Ser
[0570] 1 5
[0571] <210> 36
[0572] <211> 2
[0573] <212> PRT
[0574] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0575] <220>
[0576] <223> 合成构建体
[0577] <400> 36
[0578] Gly Gly
[0579] 1
[0580] <210> 37
[0581] <211> 4
[0582] <212> PRT
[0583] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0584] <220>
[0585] <223> 合成构建体
[0586] <400> 37
[0587] Gly Gly Ser Gly

- [0588] 1
- [0589] <210> 38
- [0590] <211> 5
- [0591] <212> PRT
- [0592] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0593] <220>
- [0594] <223> 合成构建体
- [0595] <400> 38
- [0596] Gly Gly Ser Gly Gly
- [0597] 1 5
- [0598] <210> 39
- [0599] <211> 5
- [0600] <212> PRT
- [0601] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0602] <220>
- [0603] <223> 合成构建体
- [0604] <400> 39
- [0605] Gly Ser Gly Ser Gly
- [0606] 1 5
- [0607] <210> 40
- [0608] <211> 5
- [0609] <212> PRT
- [0610] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0611] <220>
- [0612] <223> 合成构建体
- [0613] <400> 40
- [0614] Gly Ser Gly Gly Gly
- [0615] 1 5
- [0616] <210> 41
- [0617] <211> 5
- [0618] <212> PRT
- [0619] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0620] <220>
- [0621] <223> 合成构建体
- [0622] <400> 41
- [0623] Gly Gly Gly Ser Gly
- [0624] 1 5
- [0625] <210> 42
- [0626] <211> 5
- [0627] <212> PRT
- [0628] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0629] <220>

- [0630] <223> 合成构建体
[0631] <400> 42
[0632] Gly Ser Ser Ser Gly
[0633] 1 5
[0634] <210> 43
[0635] <211> 15
[0636] <212> PRT
[0637] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0638] <220>
[0639] <223> 合成构建体
[0640] <400> 43
[0641] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0642] 1 5 10 15
[0643] <210> 44
[0644] <211> 5
[0645] <212> PRT
[0646] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0647] <220>
[0648] <223> 合成构建体
[0649] <400> 44
[0650] Gly Gly Gly Gly Ser
[0651] 1 5
[0652] <210> 45
[0653] <211> 4
[0654] <212> PRT
[0655] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0656] <220>
[0657] <223> 合成构建体
[0658] <400> 45
[0659] Cys Pro Pro Cys
[0660] 1
[0661] <210> 46
[0662] <211> 5
[0663] <212> PRT
[0664] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0665] <220>
[0666] <223> 合成构建体
[0667] <400> 46
[0668] Cys Pro Pro Cys Ser
[0669] 1 5
[0670] <210> 47
[0671] <211> 16

[0672]	<212>	PRT		
[0673]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
[0674]	<220>			
[0675]	<223>	合成构建体		
[0676]	<400>	47		
[0677]		Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr		
[0678]		1	5	10 15
[0679]	<210>	48		
[0680]	<211>	7		
[0681]	<212>	PRT		
[0682]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
[0683]	<220>			
[0684]	<223>	合成构建体		
[0685]	<400>	48		
[0686]		Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser		
[0687]		1	5	
[0688]	<210>	49		
[0689]	<211>	9		
[0690]	<212>	PRT		
[0691]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
[0692]	<220>			
[0693]	<223>	合成构建体		
[0694]	<400>	49		
[0695]		Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr		
[0696]		1	5	
[0697]	<210>	50		
[0698]	<211>	112		
[0699]	<212>	PRT		
[0700]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
[0701]	<220>			
[0702]	<223>	合成构建体		
[0703]	<400>	50		
[0704]		Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly		
[0705]		1	5	10 15
[0706]		Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val		
[0707]			20	25 30
[0708]		Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0709]			35	40 45
[0710]		Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro		
[0711]			50	55 60
[0712]		Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile		
[0713]			65	70 75 80

[0714]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
[0715]	85 90 95
[0716]	Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0717]	100 105 110
[0718]	<210> 51
[0719]	<211> 248
[0720]	<212> PRT
[0721]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0722]	<220>
[0723]	<223> 合成构建体
[0724]	<400> 51
[0725]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly
[0726]	1 5 10 15
[0727]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
[0728]	20 25 30
[0729]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0730]	35 40 45
[0731]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
[0732]	50 55 60
[0733]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
[0734]	65 70 75 80
[0735]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
[0736]	85 90 95
[0737]	Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0738]	100 105 110
[0739]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
[0740]	115 120 125
[0741]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser
[0742]	130 135 140
[0743]	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val
[0744]	145 150 155 160
[0745]	Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
[0746]	165 170 175
[0747]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0748]	180 185 190
[0749]	Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
[0750]	195 200 205
[0751]	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0752]	210 215 220
[0753]	Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[0754]	225 230 235 240
[0755]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0798]		100		105		110
[0799]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln					
[0800]		115		120		125
[0801]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser					
[0802]		130		135		140
[0803]	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val					
[0804]		145		150		155 160
[0805]	Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly					
[0806]		165		170		175
[0807]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys					
[0808]		180		185		190
[0809]	Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met					
[0810]		195		200		205
[0811]	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala					
[0812]		210		215		220
[0813]	Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln					
[0814]		225		230		235 240
[0815]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln					
[0816]		245		250		255
[0817]	Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg					
[0818]		260		265		270
[0819]	Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn					
[0820]		275		280		285
[0821]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile					
[0822]		290		295		300
[0823]	Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys					
[0824]		305		310		315 320
[0825]	Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu					
[0826]		325		330		335
[0827]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val					
[0828]		340		345		350
[0829]	Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp					
[0830]		355		360		365
[0831]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro					
[0832]		370		375		380
[0833]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr					
[0834]		385		390		395 400
[0835]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr					
[0836]		405		410		415
[0837]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro					
[0838]		420		425		430
[0839]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr					

[0840]	435	440	445
[0841]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
[0842]	450	455	460
[0843]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
[0844]	465	470	475 480
[0845]	Cys Pro Pro Cys Ser		
[0846]	485		
[0847]	<210> 54		
[0848]	<211> 471		
[0849]	<212> PRT		
[0850]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0851]	<220>		
[0852]	<223> 合成构建体		
[0853]	<400> 54		
[0854]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly		
[0855]	1	5	10 15
[0856]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val		
[0857]	20	25	30
[0858]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0859]	35	40	45
[0860]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro		
[0861]	50	55	60
[0862]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile		
[0863]	65	70	75 80
[0864]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His		
[0865]	85	90	95
[0866]	Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0867]	100	105	110
[0868]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln		
[0869]	115	120	125
[0870]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser		
[0871]	130	135	140
[0872]	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val		
[0873]	145	150	155 160
[0874]	Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
[0875]	165	170	175
[0876]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[0877]	180	185	190
[0878]	Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met		
[0879]	195	200	205
[0880]	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0881]	210	215	220

[0882]	Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[0883]	225 230 235 240
[0884]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val
[0885]	245 250 255
[0886]	Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr
[0887]	260 265 270
[0888]	Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala
[0889]	275 280 285
[0890]	Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly
[0891]	290 295 300
[0892]	Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0893]	305 310 315 320
[0894]	Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
[0895]	325 330 335
[0896]	Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
[0897]	340 345 350
[0898]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
[0899]	355 360 365
[0900]	Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
[0901]	370 375 380
[0902]	Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
[0903]	385 390 395 400
[0904]	Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
[0905]	405 410 415
[0906]	Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
[0907]	420 425 430
[0908]	Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
[0909]	435 440 445
[0910]	Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
[0911]	450 455 460
[0912]	Thr Glu Cys Pro Pro Cys Ser
[0913]	465 470
[0914]	<210> 55
[0915]	<211> 1458
[0916]	<212> DNA
[0917]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0918]	<220>
[0919]	<223> 合成构建体
[0920]	<400> 55
[0921]	gatgttgtga tgactcagtc tcccagcagc atccccgtga ccctgggcga gtctgtgtcc 60
[0922]	atcagctgca gaagcagcaa gaggcctgcag aacgtcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
[0923]	ttccagcagc ggectggcca gtctccccag ctgctgatct accggatgag caacctgaac 180

[0924]	agcggcgtgc cccgatagatt ttctggctct ggcagcggca ccgacttcac cctgagaatc	240
[0925]	tccggcgtgg aaccggagga cgtgggcgtg tactactgta tgcagcacct ggaatacccc	300
[0926]	ctgaccttcg gagccggcac caagctggag atcaaaggcg gaggcggtag tggcggtggt	360
[0927]	ggttcaggcg gtggcggatc tcaggtgcag ctggtgcagt ctggccccga gctaatcaag	420
[0928]	cctggcggca gcgtgaagat gagctgcaag gcctccggct acaccttcac cagctacgtg	480
[0929]	atgcaactggg tgcgccagaa gcctggacag ggcctggaat ggatcggcta catcaacccc	540
[0930]	tacaacgatg gcaccaagta caacgagaag ttcaagggca gagccaccct gaccagcgac	600
[0931]	aagagcagca gcaccgccta catggaactg agcagcctgc ggagcgagga cagcgccgtg	660
[0932]	tactattgtg ccagaggcac ctactactac ggcagccggg tgttcgacta ctggggacag	720
[0933]	ggcaccacgg tcaccgtctc ctcaggtggc ggaggatctg aggtgcagct ggtggagtct	780
[0934]	gggggaggct tggtagacc tgggggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc	840
[0935]	accttaaca cctacccat gaactgggtc cggcaggctc cagggaagg gctggagtgg	900
[0936]	gtcgcacgca taagaagtaa atataataat tatgcaacat attatgccga ttcagtgaag	960
[0937]	gaccggttca ccatctccag agacgattcc aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc	1020
[0938]	ctgagagccg aggacacggc cgtatattac tgtgtgagac atgggaactt cggtaatagc	1080
[0939]	tacgtttcct ggtttgctta ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcagctagc	1140
[0940]	accaagggcc catccgtctt cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca	1200
[0941]	gcggcctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtagcggg gctcgtggaac	1260
[0942]	tcaggcggcc tgaccagcg cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc	1320
[0943]	tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	1380
[0944]	tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct	1440
[0945]	tgtccaccgt gctcatag	1458
[0946]	<210>	56
[0947]	<211>	1416
[0948]	<212>	DNA
[0949]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0950]	<220>	
[0951]	<223>	合成构建体
[0952]	<400>	56
[0953]	gatgttgtga tgactcagtc tcccagcagc atccccgtga ccctgggcga gtctgtgtcc	60
[0954]	atcagctgca gaagcagcaa gagcctgcag aacgtcaac gcaacaccta cctgtactgg	120
[0955]	ttccagcagc ggccctggca gtctcccag ctgctgatct accgcatgag caacctgaac	180
[0956]	agcggcgtgc cccgatagatt ttctggctct ggcagcggca ccgacttcac cctgagaatc	240
[0957]	tccggcgtgg aaccggagga cgtgggcgtg tactactgta tgcagcacct ggaatacccc	300
[0958]	ctgaccttcg gagccggcac caagctggag atcaaaggcg gaggcggtag tggcggtggt	360
[0959]	ggttcaggcg gtggcggatc tcaggtgcag ctggtgcagt ctggccccga gctaatcaag	420
[0960]	cctggcggca gcgtgaagat gagctgcaag gcctccggct acaccttcac cagctacgtg	480
[0961]	atgcaactggg tgcgccagaa gcctggacag ggcctggaat ggatcggcta catcaacccc	540
[0962]	tacaacgatg gcaccaagta caacgagaag ttcaagggca gagccaccct gaccagcgac	600
[0963]	aagagcagca gcaccgccta catggaactg agcagcctgc ggagcgagga cagcgccgtg	660
[0964]	tactattgtg ccagaggcac ctactactac ggcagccggg tgttcgacta ctggggacag	720
[0965]	ggcaccacgg tcaccgtctc ctcaggtggc ggaggatctc aggtgtggt gactcaggag	780

[0966] ccctactga ctgtgtcccc aggaggaca gtcactctca cctgtcgctc aagtactggg 840
 [0967] gctgttaciaa ctagtaacta tgccaactgg gtccagcaga aacctggaca agcaccagg 900
 [0968] ggtctgattg gtggtacaa caagcgagct ccaggtaccc ctgccccgtt ctcaggctcc 960
 [0969] ctcttgggg gcaaagctgc cctgacactg tcaggtgtgc agcctgagga cgaggctgag 1020
 [0970] tattactgcg ctctatggta cagcaacctc tgggtgttcg gcggaggac caagctgacc 1080
 [0971] gtctaggcc aaccgaaagc ggcgccctcg gtcactctgt tcccgcctc ctctgaggag 1140
 [0972] cttcaagcca acaagccac actggtgtgt ctcataagtg acttctaccc gggagccgtg 1200
 [0973] acagtggcct ggaaggcaga tagcagcccc gtcaaggcgg gagtggagac caccacacc 1260
 [0974] tccaaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag 1320
 [0975] tggaagtccc acagaagcta cagctgccag gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag 1380
 [0976] acagtggccc ctacagaatg tccaccgtgc tcatag 1416
 [0977] <210> 57
 [0978] <211> 232
 [0979] <212> PRT
 [0980] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0981] <220>
 [0982] <223> 合成构建体
 [0983] <400> 57
 [0984] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0985] 1 5 10 15
 [0986] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [0987] 20 25 30
 [0988] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0989] 35 40 45
 [0990] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0991] 50 55 60
 [0992] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0993] 65 70 75 80
 [0994] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0995] 85 90 95
 [0996] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0997] 100 105 110
 [0998] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 [0999] 115 120 125
 [1000] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 [1001] 130 135 140
 [1002] Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 [1003] 145 150 155 160
 [1004] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 [1005] 165 170 175
 [1006] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 [1007] 180 185 190

[1008]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[1009]	195 200 205
[1010]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
[1011]	210 215 220
[1012]	Pro Lys Ser Cys Pro Pro Cys Ser
[1013]	225 230
[1014]	<210> 58
[1015]	<211> 218
[1016]	<212> PRT
[1017]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1018]	<220>
[1019]	<223> 合成构建体
[1020]	<400> 58
[1021]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1022]	1 5 10 15
[1023]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1024]	20 25 30
[1025]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[1026]	35 40 45
[1027]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
[1028]	50 55 60
[1029]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
[1030]	65 70 75 80
[1031]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1032]	85 90 95
[1033]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
[1034]	100 105 110
[1035]	Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
[1036]	115 120 125
[1037]	Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
[1038]	130 135 140
[1039]	Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
[1040]	145 150 155 160
[1041]	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
[1042]	165 170 175
[1043]	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
[1044]	180 185 190
[1045]	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
[1046]	195 200 205
[1047]	Val Ala Pro Thr Glu Cys Pro Pro Cys Ser
[1048]	210 215
[1049]	<210> 59

[1134]	305	310	315	320
[1135]	Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
[1136]		325	330	335
[1137]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val			
[1138]		340	345	350
[1139]	Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp			
[1140]		355	360	365
[1141]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
[1142]		370	375	380
[1143]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
[1144]	385	390	395	400
[1145]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
[1146]		405	410	415
[1147]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
[1148]		420	425	430
[1149]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
[1150]		435	440	445
[1151]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
[1152]		450	455	460
[1153]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser			
[1154]	465	470	475	480
[1155]	Cys Pro Pro Cys Ser			
[1156]		485		
[1157]	<210> 61			
[1158]	<211> 471			
[1159]	<212> PRT			
[1160]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1161]	<220>			
[1162]	<223> 合成构建体			
[1163]	<400> 61			
[1164]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly			
[1165]	1	5	10	15
[1166]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val			
[1167]		20	25	30
[1168]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
[1169]		35	40	45
[1170]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro			
[1171]		50	55	60
[1172]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile			
[1173]	65	70	75	80
[1174]	Ser Gly Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His			
[1175]		85	90	95

[1176]	Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1177]	100 105 110
[1178]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
[1179]	115 120 125
[1180]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser
[1181]	130 135 140
[1182]	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val
[1183]	145 150 155 160
[1184]	Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
[1185]	165 170 175
[1186]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1187]	180 185 190
[1188]	Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
[1189]	195 200 205
[1190]	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[1191]	210 215 220
[1192]	Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[1193]	225 230 235 240
[1194]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val
[1195]	245 250 255
[1196]	Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr
[1197]	260 265 270
[1198]	Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala
[1199]	275 280 285
[1200]	Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly
[1201]	290 295 300
[1202]	Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[1203]	305 310 315 320
[1204]	Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
[1205]	325 330 335
[1206]	Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
[1207]	340 345 350
[1208]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
[1209]	355 360 365
[1210]	Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
[1211]	370 375 380
[1212]	Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
[1213]	385 390 395 400
[1214]	Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
[1215]	405 410 415
[1216]	Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
[1217]	420 425 430

[1218] Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
[1219] 435 440 445
[1220] Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
[1221] 450 455 460
[1222] Thr Glu Cys Pro Pro Cys Ser
[1223] 465 470

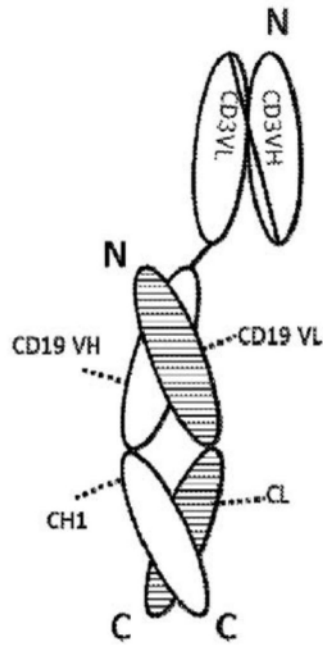


图1A

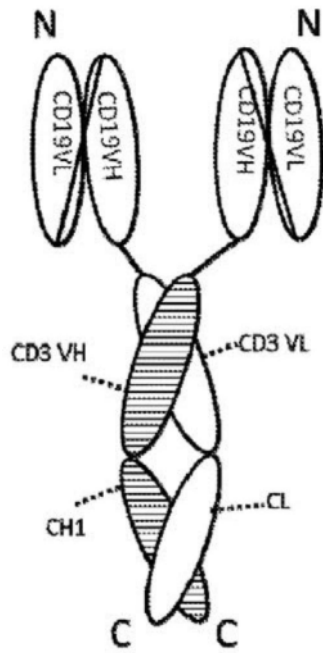


图1B

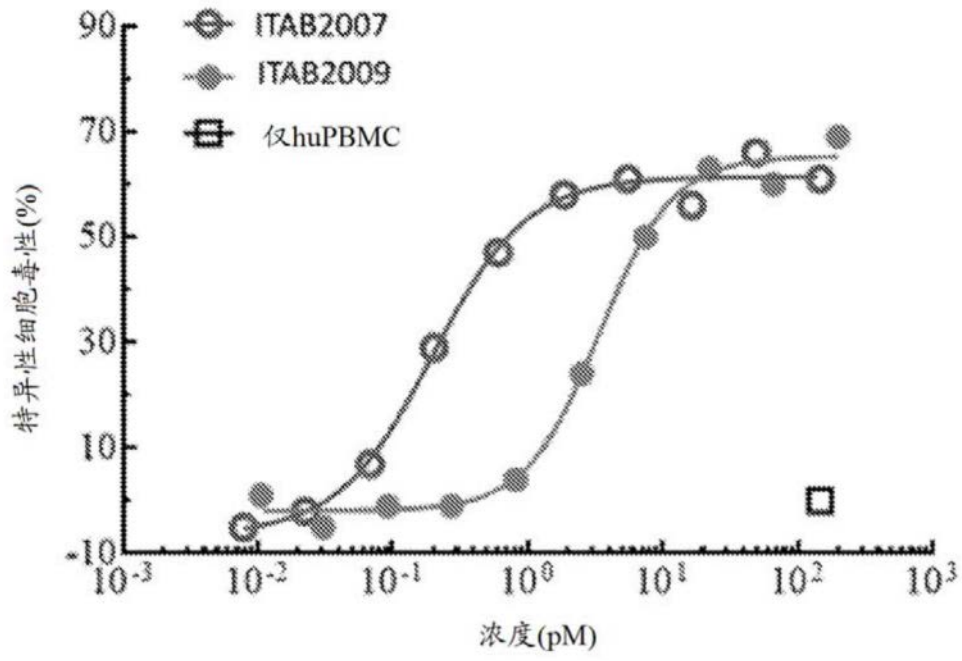


图2

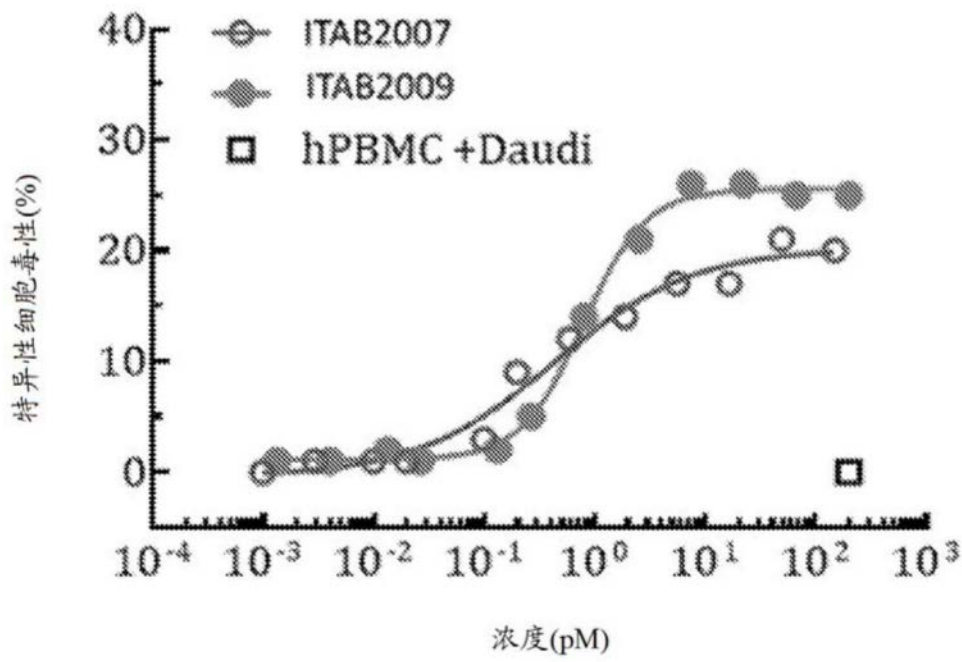


图3

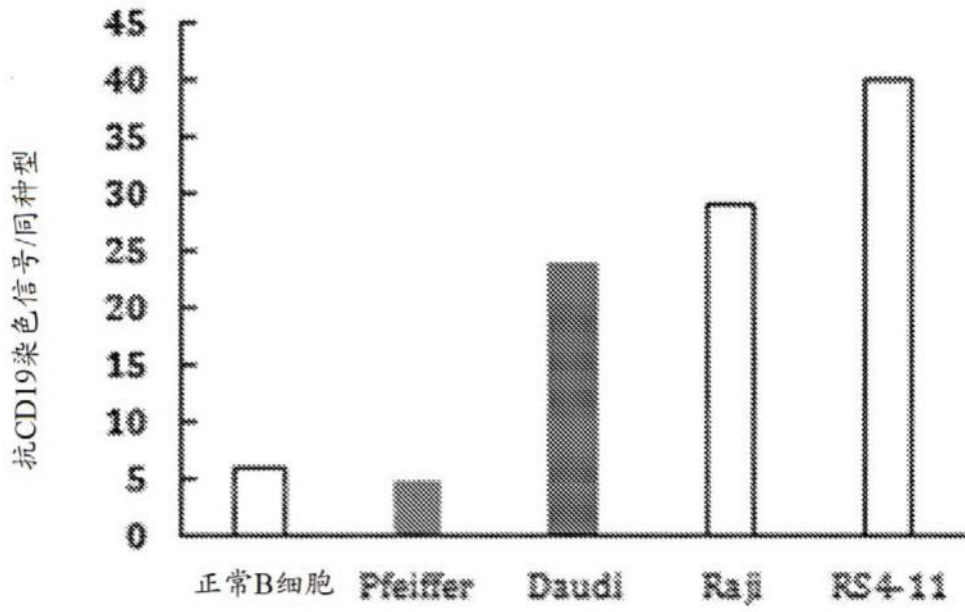


图4

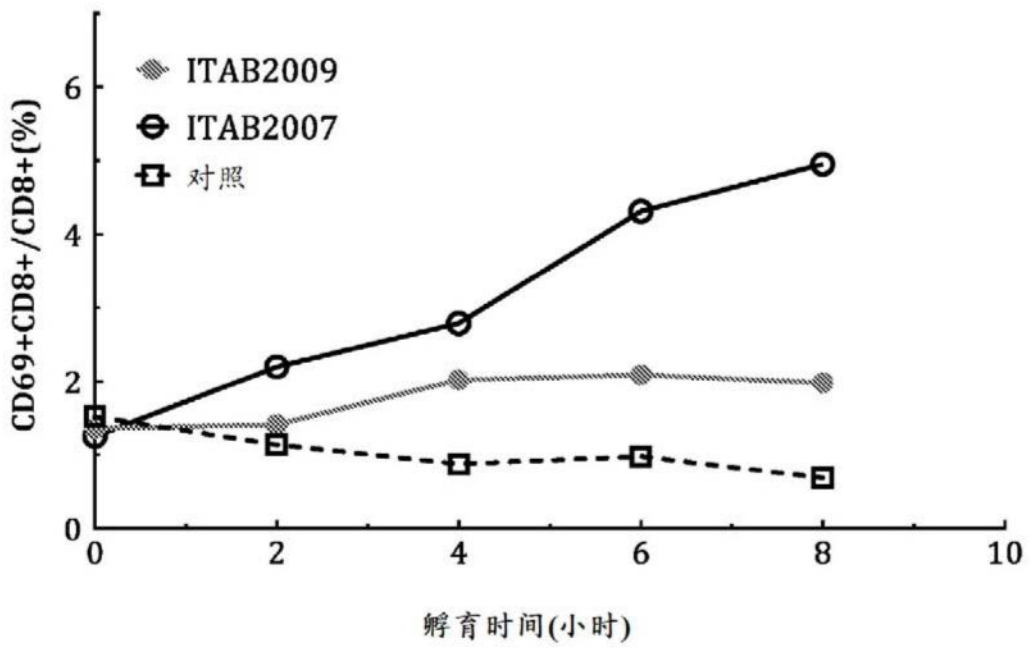


图5A

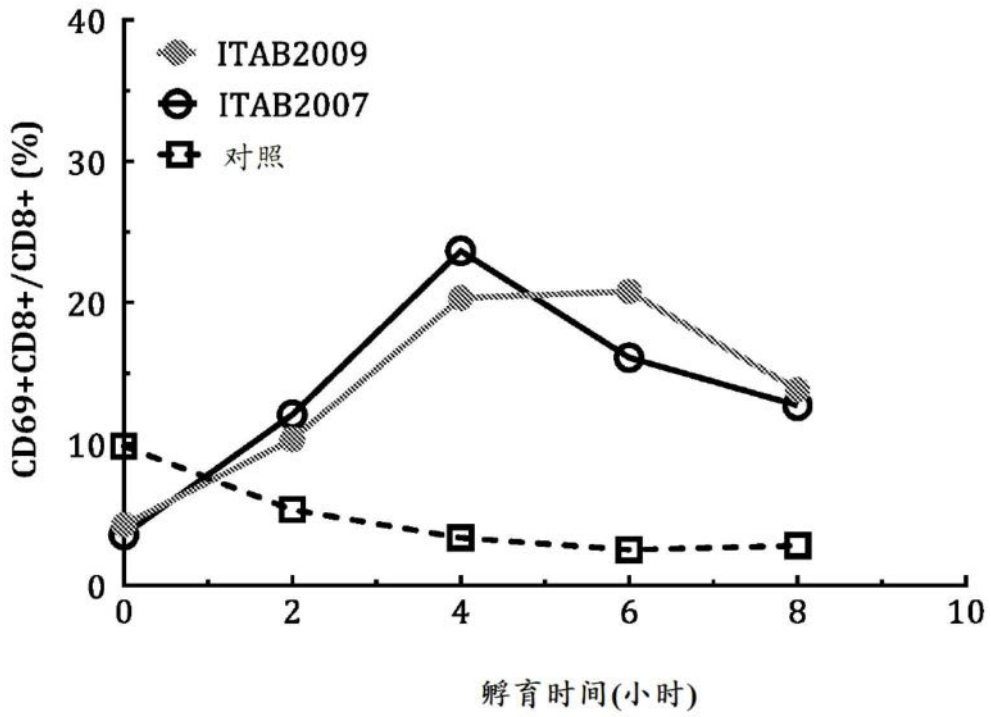


图5B

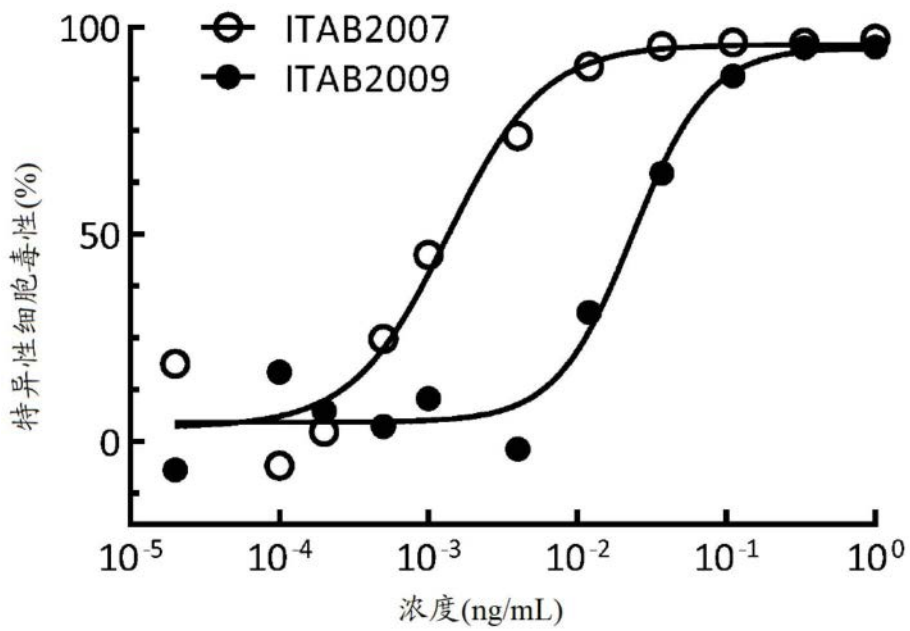


图6

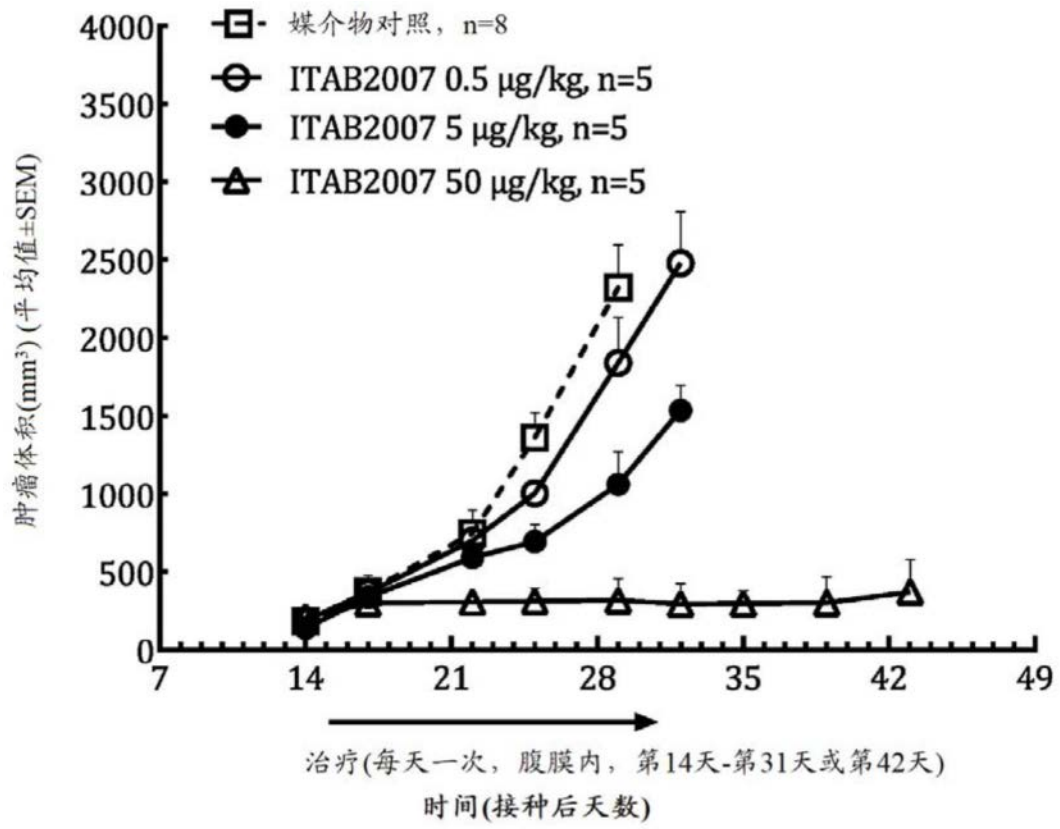


图7

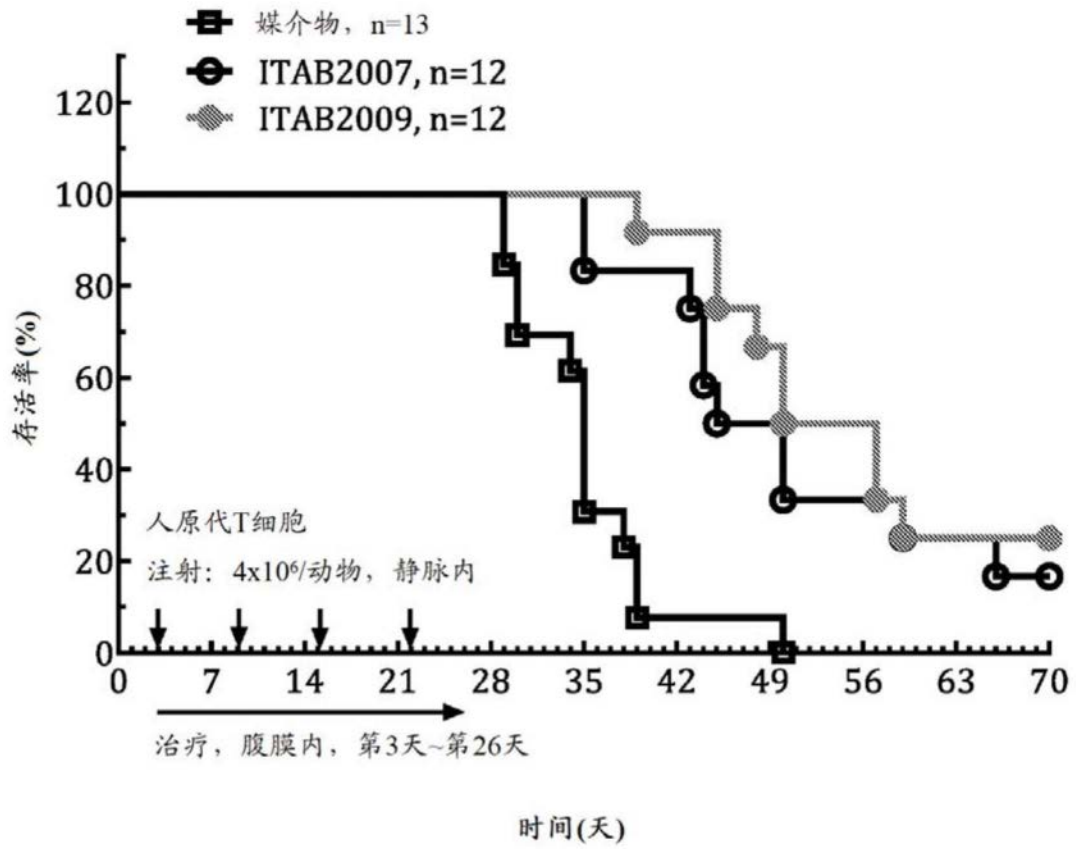


图8