

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680047162.4

[51] Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 24 日

[11] 公开号 CN 101331151A

[22] 申请日 2006.11.29

[21] 申请号 200680047162.4

[30] 优先权

[32] 2005.12.16 [33] EP [31] 05027606.2

[32] 2006.3.1 [33] EP [31] 06004144.9

[86] 国际申请 PCT/EP2006/011466 2006.11.29

[87] 国际公布 WO2007/068354 英 2007.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.13

[71] 申请人 麦克罗梅特股份公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 P·鲍尔勒 P·库弗

M·克灵格尔 E·里奥

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书 4 页 说明书 49 页 序列表 24 页
附图 16 页

[54] 发明名称

治疗肿瘤性疾病的方式和方法

[57] 摘要

提供了预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (BNHL) 和 B 细胞白血病的方式和方法, 包括向需要其的患者施用双特异性单链抗体构建体; 提供了所述双特异性单链抗体构建体在制备预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (BNHL) 和 B 细胞白血病的药物组合物中的用途, 其中所述的构建体以指定的日剂量施用至少 1 周。此外, 本发明涉及待根据本发明使用的包含双特异性单链抗体构建体的药盒。

1. 双特异性单链抗体构建体用于制备预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 或 B 细胞白血病的药物组合物的用途, 所述双特异性单链抗体构建体包含对人 CD3 和人 CD19 特异的结合结构域, 其中相应的可变重链区(V_H)和相应的可变轻链区(V_L)从 N 端到 C 端以下列次序排列:

$V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,

$V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$, 或

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$,

并且其中所述的双特异性单链抗体构建体以每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ 至 $80\mu\text{g}$ 的日剂量施用至少 1 周, 并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时。

2. 预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 或 B 细胞白血病的的方法, 所述方法包括向需要其的患者施用包含双特异性单链抗体构建体的药物组合物, 所述双特异性单链抗体构建体包含对人 CD3 和人 CD19 特异的结合结构域, 其中相应的可变重链区(V_H)和相应的可变轻链区(V_L)从 N 端到 C 端以下列次序排列:

$V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,

$V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$, 或

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$,

其中所述的双特异性单链抗体构建体以每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ 至 $80\mu\text{g}$ 的日剂量施用至少 1 周, 并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时。

3. 药盒, 其包含在人中预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 或 B 细胞白血病的药物组合物和说明书, 所述药物

组合物包含药学活性的双特异性单链抗体构建体，所述双特异性单链抗体构建体包含对人 CD3 和人 CD19 特异的结合结构域，其中相应的可变重链区(V_H)和相应的可变轻链区(V_L)从 N 端到 C 端以下列次序排列：

V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3)，
 V_H(CD19)-V_L(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3)，
 V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(CD19)-V_L(CD19)，或
 V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_H(CD19)，

并且所述说明书描述了双特异性单链抗体构建体的施用方案，包括以每平方米患者身体表面积 10μg 至 80μg 的日剂量施用至少 1 周，并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时。

4.用来在人中预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL)或 B 细胞白血病的药盒，根据至少一周包括施用包含对人 CD3 和人 CD19 特异的结合结构域的双特异性单链抗体构建体的治疗方案，其中相应的可变重链区(V_H)和相应的可变轻链区(V_L)从 N 端到 C 端以下列次序排列：

V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3)，
 V_H(CD19)-V_L(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3)，
 V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(CD19)-V_L(CD19)，或
 V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_H(CD19)，

其中所述的双特异性单链抗体构建体以每平方米患者身体表面积 10μg 至 80μg 的日剂量施用至少 1 周，并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时，并且其中所述的药盒含有下列组分：

- (a) 至少 7 份 140μg 至 320μg 所述药学活性的双特异性单链抗体构建体的单独的日剂量；和
- (b) 将组分以促进对治疗方案顺应性的方式安排的装置。

5.根据权利要求 1 的用途、根据权利要求 2 的方法或者根据权利要求 3 或 4 的药盒，其中所述的日剂量施用超过至少 10 小时。

6.根据权利要求 1 的用途、根据权利要求 2 的方法或者根据权利要求 3

或 4 的药盒，其中所述的日剂量施用超过至少 12 小时。

7. 根据权利要求 1 的用途、根据权利要求 2 的方法或者根据权利要求 3 或 4 的药盒，其中所述的日剂量施用超过至少 24 小时。

8. 根据权利要求 1、5、6 或 7 中任意一项所述的用途、根据权利要求 2、5、6 或 7 中任意一项所述的方法、或者根据权利要求 3-7 中任意一项所述的药盒，其中所述 CD3 特异的结构域的所述 V_H 区和 V_L 区衍生自选自 OKT-3、X35-3、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT31、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2 和 F101.01 的 CD3 特异性抗体。

9. 根据权利要求 1-8 中任意一项所述的用途、方法或药盒，其中所述 CD3 特异的结构域的所述 V_H 区包含至少一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 11 的 CDR3 区。

10. 根据权利要求 1-9 中任意一项所述的用途、方法或药盒，其中所述 CD3 特异的结构域的所述 V_H 区包含至少一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 10 的 CDR2 区。

11. 根据权利要求 1-10 中任意一项所述的用途、方法或药盒，其中所述 CD3 特异的结构域的所述 V_H 区包含至少一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 9 的 CDR1 区。

12. 根据权利要求 1-11 中任意一项所述的用途、方法或药盒，其中所述 CD3 特异的结构域的所述 V_L 区包含至少一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 14 的 CDR3 区。

13. 根据权利要求 1-12 中任意一项所述的用途、方法或药盒，其中所述 CD3 特异的结构域的所述 V_L 区包含至少一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 13 的 CDR2 区。

14. 根据权利要求 1-13 中任意一项所述的用途、方法或药盒，其中所述 CD3 特异的结构域的所述 V_L 区包含至少一个包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 12 的 CDR1 区。

15. 根据权利要求 1-14 中任意一项所述的用途、方法或药盒, 其中所述 CD3 特异的所述 V_H 区包含 SEQ ID NO. 17, 所述 CD19 特异的所述 V_H 区包含 SEQ ID NO. 15, 所述 CD3 特异的所述 V_L 区包含 SEQ ID NO. 18, 和/或所述 CD19 特异的所述 V_L 区包含 SEQ ID NO. 16。

16. 根据权利要求 1-15 中任意一项所述的用途、方法或药盒, 其中所述双特异性单链抗体构建体包含选自以下的氨基酸序列:

- (a) 在 SEQ ID NO 2、4、6 或 8 中描述的氨基酸序列;
- (b) 由 SEQ ID NO 1、3、5 或 7 中所示核酸序列编码的氨基酸序列;
- (c) 由与(b)的核酸序列具有至少 70%、80%、90%、95%或 99%同一性的核酸序列编码的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列能够特异地结合至 CD3 和 CD19; 以及

(d) 由与(b)的核苷酸序列遗传密码简并的核酸序列编码的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列能够特异地结合至 CD3 和 CD19。

17. 根据权利要求 1-16 中任意一项所述的用途、方法或药盒, 其中所述的可变区通过额外的接头序列连接。

18. 根据权利要求 1-17 中任意一项所述的用途、方法或药盒, 其中所述日施用持续至少 2 周、至少 3 周或者至少 4 周。

19. 根据权利要求 1-18 中任意一项所述的用途、方法或药盒, 其中所述的药物组合物与一种或多种其它的药剂联合施用。

20. 根据权利要求 1-19 中任意一项所述的用途、方法或药盒, 其中所述的药物组合物向人类患者施用。

21. 根据权利要求 1-20 中任意一项所述的用途、方法或药盒, 其中所述的双特异性单链抗体构建体在第一天以低于每平方米患者身体表面积 10 μ g 至 80 μ g 的日剂量施用。

治疗肿瘤性疾病的方式和方法

本发明涉及基于向患者施用抗体构建体尤其是双特异性单链构建体的免疫性医学干涉的药学方式和方法。具体而言，本发明涉及治疗惰性（indolent）或迅速蔓延性（aggressive）B细胞非霍奇金淋巴瘤（B NHL）或B细胞白血病的药学方式和方法，其中所述的方式和方法涉及施用双特异性单链抗体。本发明进一步涉及双特异性单链抗体在制备治疗惰性或迅速蔓延性B细胞非霍奇金淋巴瘤（B NHL）或B细胞白血病的药物中的用途。

基于抗体的疗法广泛用于治疗人类疾病。此类治疗方案一般需要施用多次大剂量输注的抗体治疗剂，即在整个治疗期间间歇地多次、通常为静脉内地（i.v.）和高剂量地注射抗体—根据韦氏在线字典，“大剂量输注（bolus infusions）”表示通常在短时间内注射入血管的单次剂量药物；也参见 www.nlm.nih.gov/medlineplus 和 www.phoenix5.org/glossary。例如，反复以每周剂量施用治疗复发性或顽固性低度或滤泡性 CD20⁺ B细胞非霍奇金淋巴瘤（NHL）的单克隆抗 CD20 抗体利妥昔单抗（Rituximab）（美罗华（Rituxan））超过 4-8 周（Ghielmini M., J. Clin. Oncol. 2004）。大剂量输注模式也描述于用于慢性淋巴细胞白血病的人源化抗 CD52 的单克隆抗体阿来组单抗（Alemtuzumab）（O'Brian, 2003, Cancer, 98, 2657-63）、用于转移性乳腺癌的曲妥珠单抗（Trastuzumab）（赫赛汀（Herceptin），抗 Her2 抗体）、用于急性骨髓样白血病（AML）的吉妥珠单抗（Gemtuzumab）（麦罗塔（Myelotarg），抗 CD33 抗体）、用于 B 细胞慢性淋巴白血病（CLL）的阿来组单抗（Campath，抗 CD52 抗体）和用于复发性或顽固性低度、滤泡性或转化的 B 细胞 NHL 的替伊莫单抗（Ibritumomab）（Zevalin，抗 CD20 抗体）（综述见 Cersosimo, 2003, Am. J. Health-Syst-Pharm., 60, 1531-48）。抗 17-1A 的单克隆抗体依决洛单抗（Edrecolomab）（Panorex）也用作反复

的输注剂，其中以高剂量（500 mg）起始、两周后每 28 天经静脉内注射 100 mg(Makower, 2003, Cancer Invest., 2, 177-84)。

在抗体疗法中常见的现象是发生与输注相关的副作用，例如细胞因子释放综合征（“CRS”）。CRS 是应答 T 细胞结合性抗体的输注而立即发生的并发症。CRS 与 T 细胞/单核细胞活化相关，并继而与补体级联的活化相关。这些过程通过能够交联 T 细胞和单核细胞、并活化补体的抗体的 Fc 部分介导。CRS 的发病机理归因于应答 OKT3 对 T 淋巴细胞的刺激而合成的肿瘤坏死因子（TNF） α 、IL-2、IL-6 和 γ -干扰素。一般地，此类抗体结合 T 细胞受体，从而活化 T 细胞。由活化的 T 细胞释放的细胞因子（例如，TNF α 、白细胞介素（IL-2、IL-6）和干扰素（IFN γ ））产生与在严重感染中发现的反应类似的并且表征为低血压、发烧和僵直的类型系统性炎症反应（systemic inflammatory response）。患者感觉非常不舒服，如同发高烧一样——的确，CRS 实际上是一种类型的非传染性发烧。所描述的其它与 CRS 相关的副作用为疲劳、呕吐、心跳过速、高血压、头痛和背痛。

当施用多种单克隆抗体时也观察到 CRS。例如，利用抗 CD20 抗体利妥昔单抗的抗肿瘤活性来治疗 B 细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)。通过每周三次增量完成的剂量逐渐增加即增加剂量对利妥昔单抗作为单一试剂发挥显著临床活性是必需的(Lin, 2003, Seminar Oncol. 30, 483-92)。然而，这种施用方案触发细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的释放，其中 TNF- α 和 IL-6 的血浆水平分别在起始输注后 90 分钟达到峰值。这种细胞因子的上升伴随着发烧、寒战、低血压和恶心(Winkler, 1999, Blood, 94, 2217-24)。输注的毒性可以通过适当的预药物制剂（pre-pharmaceutical agent）和加强的施用方案来降低(Lin, 2003, Seminar Oncol. 30, 483-492)。

当施用其它抗体形式例如双特异性抗体时也观察到 CRS。在乳腺癌患者中单次输注联合 GCSF（粒细胞集落刺激因子）的双特异性抗体 MDX-2H12（抗 Fc γ 受体 I \times 抗 Her-2/neu）分别在输注 MDX-2H12 后的 2 和 4 小时导致 TNF- α 和 IL-6 的最高水平。TNF- α 和 IL-6 的峰值水平不

与所施用的双特异性抗体的剂量相关 (Repp, 2003, Br. J. Cancer, 89, 2234-43)。

如在 WO 99/54440 中所述, CRS 在向 B 细胞衍生性慢性淋巴白血病 (B-CLL) 患者中以重复输注施用抗 CD19 × 抗 CD30 的双特异性单链抗体 (bscCD19 × CD3) 进行的内部临床研究中发现。如 WO 99/54440 的图 19 和 20 所示, 发现应答每次输注而释放 TNF、IL-6 和 IL-8, 其中所述的输注为两次施用 20 分钟的输注(分别为 3 μg 和 10 μg 双特异性单链抗体), 伴随每次施用后释放细胞因子。在施用 10 μg 双特异性单链抗体后观察到最大的细胞因子释放。

Ten Berge 等人, 1996, Transplant. Proc. 28, 3217-20 描述了涉及连续输注抗 CD3 的单克隆抗体 OKT3 两小时的研究。这项研究的目的是确定已知与施用 OKT3 相关的血栓栓塞并发症是否取决于这个分子施用的方式。一般地, 通过连续输注施用 OKT3 比单次大剂量输注较好地耐受。

连续输注也在抗体相关药剂的现有技术中进行了描述。例如, 连续输注 GD3 神经节苷脂特异性单克隆抗体 R24 主要在 25 和 50 mg/m² 的剂量导致 R24 相关的毒性(Alpaugh, 1998, Med. Oncol., 15, 191-8)。在患有转移性黑素瘤的患者中连续输注两次 24 小时性 GD3 神经节苷脂特异的人 IgM 单克隆抗体输注 48 小时会在输注期间和之后诱导小的副作用(Irie, 2004, Cancer Immunol. Immunother. 53, 110-7)。在本文, 需要极高的治疗性抗体施用率、即克抗体的级别来完成临床效果。

此外, 将从杂交瘤作为鼠 IgG1 生产的抗 CD16 × 抗 CD30 的双特异性抗体应用于患有霍奇金病的患者的不同输注方案中(Hartmann, 2001, Clin. Cancer Res., 7, 1873-1881)。这个抗体通过结合 CD16(Fc-γ 受体 III)活化 NK 细胞。输注以连续 4 天超过 24 小时的连续输注或者以每隔一天 1 小时的输注进行。每次输注的双特异性抗体的绝对剂量为在 5% 人白蛋白溶液中的 4 × 25 mg。不论何种施用方案, 输注双特异性抗体后未在外周血细胞计数中观察到一致变化, 尽管后者在个体间截然不同。不管抗体治疗方案是连续还是间歇的, 患者都发展出发烧。连续而非间歇地以大剂量输注治疗性抗

体不能减轻患者遭受的副作用的发生或严重性。讨论了例如通过同时施用细胞因子来达到靶向的效应细胞数量和/或活化状态的增加可能对于增加双特异性抗体疗法的抗癌效力也是必需的。尽管在上文所述研究中使用总量 100 mg 的治疗性抗体,双特异性抗体成为成功且可广泛应用的疗法的主要障碍确定为双特异性抗体有限的利用率。作者提出,可以通过下列途径来非常大地改善临床效力,所述途径为: 1)增加双特异性抗体的剂量;和 2)增加治疗周期数量。

因此,需要降低不希望的副作用。

因此,本发明的目的是为基于抗体的医学疗法提供具增加的患者耐受性的药学方式和方法。具体而言,目的在于此类方式和方法允许所施用的抗体保持最大生物活性,同时最小化这种施用引起的不希望和不利的副反应。

本发明涉及双特异性单链抗体构建体在制备预防、治疗或改善癌或非实体或实体瘤的药物组合物中的用途,其中所述的双特异性单链抗体构建体用于持久地施用较长的一段时间。

因此,本发明的第一个方面提供了双特异性单链抗体构建体在制备预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 或 B 细胞白血病的药物组合物中的用途,其中所述的双特异性单链抗体构建体包含对人 CD3 和人 CD19 特异的结合结构域,其中相应的可变重链区(V_H)和相应的可变轻链区 (V_L) 从 N 端到 C 端以以下次序排列:

$V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),

$V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 6), 或者

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 8),

并且其中所述双特异性单链抗体构建体至少以每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ 至 $80\mu\text{g}$ 的日剂量施用 1 周,并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时。

在另一实施方案中,本发明涉及预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性

B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 或 B 细胞白血病的方法, 所述方法包括向需要其的个体施用包含双特异性单链抗体构建体的药物组合物, 所述双特异性单链抗体构建体包含对人 CD3 和人 CD19 特异的结合结构域, 其中相应的可变重链区 (V_H) 和相应的可变轻链区 (V_L) 从 N 端到 C 端以以下次序排列:

$V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),

$V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 6), 或者

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 8),

其中所述的双特异性单链抗体构建体至少以每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ 至 $80\mu\text{g}$ 的日剂量施用 1 周, 并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时。

在另一实施方案中, 本发明涉及药盒, 其包含用于在人中预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 或 B 细胞白血病的药物组合物和说明书, 其中所述药物组合物包含的双特异性单链抗体构建体包含对人 CD3 和人 CD19 特异的结合结构域, 其中相应的可变重链区 (V_H) 和相应的可变轻链区 (V_L) 从 N 端到 C 端以以下次序排列:

$V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),

$V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 6), 或者

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 8),

并且所述说明书描述了双特异性单链抗体构建体的施用方案, 包括以每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ 至 $80\mu\text{g}$ 的日剂量施用至少 1 周, 并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时。

本发明的另一实施方案涉及用来在人中预防、治疗或改善惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 或 B 细胞白血病的药盒, 其中包括施用包含人 CD3 和人 CD19 特异结合结构域的双特异性单链抗体构建体, 其中相应的可变重链区 (V_H) 和相应的可变轻链区 (V_L) 从 N 端到 C

端以以下次序排列:

$V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),

$V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 6), 或者

$V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 8),

其中所述的双特异性单链抗体构建体以每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ 至 $80\mu\text{g}$ 的日剂量至少施用 1 周, 并且其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时, 并且其中所述的药盒含有下列组分:

- (a) 至少 7 份 $140\mu\text{g}$ - $320\mu\text{g}$ 双特异性单链抗体构建体的单独的日剂量; 和
- (b) 将组分以促进对治疗方案顺应性的方式安排的装置 (means)。

因此, 在方法、药盒或用途的上下文中根据本发明计算的患者平均身体表面积在 1.7 - 2.2 m^2 的范围。

有利地, 本发明的药盒进一步包含任选的(a)反应缓冲液、储藏溶液和/或所述用途需要的剩余试剂或物质。此外, 本发明药盒的组分包独立地包装在管或瓶子中、或者联合包装在容器或多容器单位中。药盒的制备优选遵循本领域技术人员已知的标准方案。

为了评估本文所述抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体 (bscCD19 × CD3) 的安全性和耐受性, 向两名患有复发性非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 的患者通过长期连续的输注施用化合物。

在 2000 年第一名患者被诊断为滤泡性淋巴瘤。虽然这位患者在过去接受了多种化学疗法和免疫疗法, 但疾病仍然恶化了。在根据本文提供的用途和方法用本文所述的抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体构建体进行治疗后, 疾病不仅首次得到停止, 而且实现了淋巴瘤病灶的显著缩小。如下列非限制性实施例中所述, 当这名患者以 $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时剂量水平的本文所述抗 CD3 × 抗 CD19 双特异性单链抗体构建体接受 4 周连续输注时, 治疗得到很好的耐受, 即未观察到显著的副作用。治疗导致强的 T 细胞活化和增殖。具细胞毒性表型的 T 细胞主要是因为 CD8^+ T 细胞增殖。T 细胞的活化和增殖在肿瘤中由本文所述抗 CD3 × 抗 CD19 双特异性单链抗体修

饰的 B 淋巴瘤细胞诱导。测定治疗期间的 B 细胞数显示，所述构建体能够由于其对淋巴瘤细胞的细胞毒性而完全地消除循环的 B（淋巴瘤）细胞。在治疗后的再分期（restaging），发现根据 NHL 的反应测定的淋巴瘤块明确减小：通过对应肿瘤反应测试中部分的反应（Partial Response, PR）的计算性 X 射线断层术(CT)，六个参考淋巴瘤病灶的总产物直径（Sum Product Diameters, SPD）诊断为下降 58.0%。

1999 年第 2 名患者诊断为患有小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL 或 B-CLL)。在疾病 7 年的历史里，患者接受了 7 种不同的化学疗法方案以及免疫疗法和放射疗法，但未显示任何主要反应，而根据本发明的药学方式和方法用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体构建体治疗这名患者首次提供了成功疗法，其中可以实现参考淋巴瘤病灶的缩小高于 50%。当所述第二名患者用 15 μ g/m²/24 小时的本文所述抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体构建体连续治疗两周时，循环的 B（淋巴瘤）细胞得到有效耗竭。此外，观察到骨髓中的总淋巴瘤细胞被本文所述的抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体构建体的全部消除。这个发现与通过例如常规化学疗法难以实现的完全骨髓瘤反应一致。在治疗的再分期，发现淋巴瘤瘤块明确减少：通过对应肿瘤反应测试中部分的反应（PR）的计算性 X 射线断层术(CT)，六个参考淋巴瘤病灶的大小诊断为下降 57.2%。

根据本发明的术语“双特异性单链抗体”或“单链双特异性抗体”或相关术语表示通过将至少两个抗体可变区连接在缺乏完整免疫球蛋白恒定和/或 Fc 部分的单个多肽链中产生的抗体构建体。本文所用的“接头”连接相同特异性的 V 结构域，而本文所用的“间隔物”连接不同特异性的 V 结构域。例如，双特异性单链抗体可以是具总共两个抗体可变区例如两个 VH 区的构建体，其中所述的每个可变区能够特异地结合分别的抗原，并且彼此通过短的（通常少于 10 个氨基酸）合成性多肽间隔物连接以便这两个抗体可变区与插入其中的间隔物以单一连续多肽链存在。另一个双特异性单链抗体的实例可以是具有三个抗体可变区的单一多肽链。此处，两个抗体可变区例如一个 VH 和一个 VL 可以组成 scFv，其中这两个抗体可

变区通过合成性多肽接头彼此连接，通常对所述的多肽接头进行基因设计以便最小化免疫原性、同时保持对蛋白水解作用最大的抗性。这个 scFv 能够特异地结合特定抗原，并且连接于能够进一步结合与 scFv 所结合抗原不同的抗原的抗体可变区，例如 VH 区。此外，另一双特异性单链抗体的实例为具四个抗体可变区的单一多肽链。此处，前两个抗体可变区例如 VH 区和 VL 区可以形成一个能够结合一个抗原的 scFv，而第二个的 VH 区和 VL 区可以形成第二个能结合另一抗原的 scFv。在单一连续多肽链中，一种特异性的单独抗体可变区可以有利地通过如上文所述的合成性多肽接头隔开，而各个 scFv 可以有利地通过如上文所述的短肽间隔物分开。WO 99/54440, WO 2004/106381, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-70; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-5; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-7; Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-103; Brühl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426 中显示了双特异性单链抗体及其生产方法的非限制性实例。

如本文所用，“人 CD3”表示在人 T 细胞上作为多分子 T 细胞受体复合体的部分表达的抗原，CD3 由五种不同链组成：CD3- ϵ ，CD3- γ ，CD3- δ ，CD3- η 和 CD3 ζ 。如上文所述，CD3 例如通过抗 CD3 抗体在 T 细胞上的成簇导致 T 细胞类似于结合抗原、但不依赖于 T 细胞亚群克隆特异性的活化。因此，如本文所用，术语“以其一种特异性特异结合人 CD3 抗原的双特异性单链抗体”涉及能够结合在 T 细胞上表达的人 CD3 复合体、并且能够诱导靶细胞消除/裂解的 CD3 特异性构建体，其中所述的此类靶细胞携带/显示与双特异性单链抗体的另一非 CD3 结合部分结合的抗原。如本领域已知地，CD3 复合体与 CD3 特异结合物（例如根据本发明的药学方式和方法施用的双特异性单链抗体）的结合导致 T 细胞活化，见，例如 WO 99/54440 或 WO 2004/106381。因此，适合本发明药学方式和方法的构建体能有利地在体内和/或体外消除/裂解靶细胞。相应的靶细胞包含表达肿瘤抗原例如 CD19 的细胞，其中所述肿瘤抗原通过所述构建体的第二种特异性（即双特异性单链抗体的非 CD3 结合部分）识别。优选地，所述第

二种特异性是已在 WO 99/54440 或 WO 2004/106381 中描述的对人 CD19 的特异性。根据该实施方案，双特异性单链抗体的每一抗原特异性部分包含抗体 VH 区和抗体 VL 区。这种双特异性单链抗体的有利变体从 N 末端到 C 末端为：

V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 2),

V_H(CD19)-V_L(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 4),

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(CD19)-V_L(CD19) (SEQ ID NO.: 6), 或者

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_H(CD19) (SEQ ID NO.: 8)。

更加具体地，在本发明含义内，将术语“特异地结合”或相关术语例如“特异性”理解为主要通过以下两个参数表征：定性参数（结合表位，或抗体结合部位）和定量参数（结合亲和力，或该抗体结合其结合的位置有多强）。抗体结合哪个表位可以有利地通过例如 FACS 方法、ELISA、肽-点表位作图或质谱法测定。抗体结合特定表位的强度可以有利地通过例如已知的 Biacore 和/或 ELISA 法测定。联合这些技术使得可以将计算信号：噪音比作为结合特异性的代表性量度。在所述信号：噪音比中，信号代表抗体结合目的表位的强度，而噪音代表抗体结合其它不同于目的表位的非相关表位的强度。将各目的表位的信号噪音比为例如至少 50、但优选大约 80 作为所评估抗体以特异方式结合目的表位、即为“特异结合物”的指标，其中所述的信号噪音比例如通过 Biacore、ELISA 或 FACS 测定。术语“结合至/与……相互作用”也涉及由人靶分子或其部分的两个区域组成的构象表位、结构表位或非连续表位。在本发明上下文中，构象表位由两个或多个在一级序列中分离的不连续氨基酸序列定义，其中当多肽折叠成天然蛋白质时所述不连续氨基酸序列在分子表面上凑在一起(Sela, (1969) Science 166, 1365 和 Laver, (1990) Cell 61, 553-6)。术语“非连续表位”在本发明上下文中表示由多肽链间隔部分的残基组装成的非线性表位。当多肽链折叠成为三维结构时，这些残基在分子表面上凑在一起来构成构象/结构表位。

根据本发明，文中与 Ig 衍生的抗原相互作用一起使用的“可变区”包含多肽的片段和衍生物，其中所述多肽至少包含一个衍生自抗体、抗体片

段或其衍生物的 CDR。本发明考虑了下列情况，即所述至少一个 CDR 优选地为 CDR3、更加优选地为抗体重链的 CDR3 (CDR-H3)。但是，其它抗体衍生的 CDR 也特别地包含在术语“可变区”中。

术语“抗体片段或其衍生物”涉及单链抗体或其片段、合成性抗体、抗体片段例如 Fab、F(ab2)'、Fv 或 scFv 片段、单结构域抗体等、或者任一这些的化学修饰的衍生物。根据本发明采用的抗体或其相应的免疫球蛋白链可以进一步在基序之外用本领域已知的常规技术来修饰，例如通过单独或联合使用本领域已知的氨基酸缺失、插入、替换、添加和/或重组、和/或任意其它修饰（例如翻译后修饰和化学修饰，例如糖基化和磷酸化）。向编码免疫球蛋白链氨基酸序列的 DNA 序列中引入此类修饰的方法为本领域技术人员熟知，见，例如 Sambrook 等人；*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第二版 1989 年和 第三版 2001 年。

本文所用术语“肽”或“多肽”描述了一类包含肽组和多肽组的分子。肽组由不超过 30 个氨基酸的分子组成，多肽组由多于 30 个氨基酸的分子组成。术语“抗体片段或其衍生物”尤其涉及包含至少一个 CDR、优选 CDR-H3 的肽或多肽构建体。所述抗体分子的片段或衍生物限定了为上述抗体的部分、和/或通过化学/生物化学或分子生物学方法修饰的肽或多肽。相应方法为本领域已知，并且尤其在实验室手册中进行了描述（见 Sambrook 等人，在上述引文中；Gerhardt 等人；*Methods for General and Molecular Bacteriology*; ASM Press, 1994；Lefkovits；*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*; Academic Press, 1997；Golemis；*Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002）。

在所给多肽的氨基酸序列中鉴定基序的方法为本领域技术人员已知，并在一些实验室手册中（例如，在 Sambrook 等人，在上述引文中；Mülhardt；*Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*; Spektrum Akademischer Verlag, 2001 中）进行了描述。此外，所述方法在后附实施

例中进行了例示。

本文所用术语“施用”表示向个体施用治疗有效量的上述双特异性单链抗体。“治疗有效量”表示对其施用的对象产生效果的剂量。确切剂量依赖于治疗目的，并且通过本领域技术人员用已知技术确定。如本领域已知和上文所述地，根据全身递送和局部递送、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用时间、药物相互作用和病症严重性进行调整可以是必需的，并且由本领域技术人员通过常规实验方法确定。

主治医师和临床因素决定剂量方案。如医学领域熟知地，任意一名患者的剂量取决于许多因素，其中包括患者尺寸、身体表面积、年龄、施用的特定化合物、性别、施用时间和施用途径、总体健康状况以及其它同时施用的药物。

如医学领域熟知地，任意一名患者的剂量取决于许多因素，其中包括患者尺寸、身体表面积、年龄、施用的特定化合物、性别、施用时间和施用途径、总体健康状况以及其它同时施用的药物。一般剂量可以例如设定在本发明的实施方案和所附实施例的范围内，然而，尤其是考虑上述因素，低于或高于这个示例性范围的剂量是可以的。

如本文所述，先前研究优选使用大剂量输注来施用治疗性抗体。如本文所用，术语“大剂量输注”指的是在6小时之前被中断的输注，而“连续输注”指的是可以持久地进行至少6小时而不被中断的输注。“连续输注”指的是持久地施用的输注。因此，在本发明上下文中，术语“持久的”和“连续的”用作同义词。在本发明意义之内，术语“施用超过至少6小时”表示下列情形，即在本发明药学方式和方法所需的整个周期期间以持续、恒定的方式向患者身体连续施用用于根据本发明药学方式和方法的双特异性单链抗体。避免中断双特异性单链抗体的导入，即除了需要补充供给施用的双特异性单链抗体或医学调停等外，在本发明药学方式和方法所需的整个施用期间不因为其它原因出现或不显著地出现下列转变，所述转变为从这个抗体正向患者身体施用的状态转变为这个抗体不再向患者身体施用的状态。就此类必需的补充导致所施用抗体的导入短暂中止而言，仍

然将此类施用理解为本发明药学方式和方法意义内的“不间断的”或“持久的”。在大多数情况中，此类补充通常为如此短的持续时间以至于未向患者身体导入抗体的时间相比根据本发明药学方式和方法的整个施用方案的预期时间是非常小的。尤其优选双特异性单链抗体的施用方案不间断或持久地发生至少1周或2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周或者甚至更长。在大多数优选的实施方案中，双特异性抗体连续4-8周即4、5、6、7或8周地施用超过24小时。例如，它可以是在4周连续施用后分期治疗的患者，可诊断到对双特异性单链抗体治疗最小或部分的反应(如下定义)。在这种情况下，延长连续施用来完成甚至更好的治疗结果，例如完全的反应(complete response)。以根据本发明药学方式和方法的方式持续不间断地施用双特异性单链抗体以允许下述的有利的T细胞活化，从而使其发挥足够长时间的效果来有利地从身体清除所有患病细胞。由于将不间断施用的双特异性单链抗体的比率保持在很低，所以可以持续应用治疗剂更长时间，而没有对患者有害副作用的风险。

已发现，通过以每日每平方米身体表面积 $10\mu\text{g}$ 至 $80\mu\text{g}$ 的剂量施用双特异性单链抗体能获得本发明药学方式和方法有益和意外的效果。日剂量在施用期间保持恒定。然而，下列施用方式也在这个实施方案的范围之内，其中在本文所述药物方法之前，在输注周期的最初几天施用更低剂量(“初始剂量”)的双特异性单链抗体，而在剩余输注期应用更高剂量(“维持剂量”)。例如，可以在输注期的第一天施用每平方米身体表面积 $5\mu\text{g}$ 的双特异性单链抗体，然后在剩余阶段施用每平方米身体表面积 $15\mu\text{g}$ 的日剂量。或者在输注期的第一天施用每平方米身体表面积 $15\mu\text{g}$ 的双特异性单链抗体，然后在剩余阶段施用每平方米身体表面积 $45\mu\text{g}$ 的日剂量。也考虑下列方式，即在输注期的第一天施用每平方米患者身体表面积 $5\mu\text{g}$ 的双特异性单链抗体，然后输注期的第二天施用每平方米身体表面积 $15\mu\text{g}$ 的双特异性单链抗体，然后在剩余阶段施用每平方米身体表面积 $45\mu\text{g}$ 的每日(维持)剂量。因此，在治疗的第一天或在第一和第二天，本文所述的双特异性单链抗体构建体可以以低于每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ - $80\mu\text{g}$ 的(每日)

初始剂量施用来慢慢使患者组织适应治疗。此后，可以施用每平方米患者身体表面积 $10\mu\text{g}$ - $80\mu\text{g}$ 的实际维持剂量。因此，在根据本发明的方法、药盒或用途的上下文中计算的患者平均身体表面积在 $1,7$ - $2,2 \text{ m}^2$ 的范围。已发现，通过将不间断施用（即连续输注）的双特异性单链抗体比率维持在达到预期治疗效果的绝对最小值一段时间，可以最好地实现在上文描述为极其有利的 T 细胞活化增加。除了下文列举的与模拟天然 T 细胞活化相关的优点，应用更低比率的双特异性单链抗体使得施用的双特异性单链抗体绝对量更低。这导致个体患者更低的费用，使得根据本发明药学方式和方法的治疗是更大范围需要其的患者负担得起的。

在本发明含义内，术语“B 细胞非霍奇金淋巴瘤”或“B 细胞衍生的非霍奇金淋巴瘤”包含惰性和迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B NHL)。如本文所用，术语“惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B NHL)”表示恶性 B 细胞衍生的肿瘤性疾病。惰性 B NHL 为低恶性淋巴瘤。迅速蔓延性 BNHL 为高恶性淋巴瘤。B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B NHL)可以有利地为滤泡性淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、边缘区细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL/CLL)以及任意其它 B 细胞衍生的亚群。本文所用术语“B 细胞白血病”可以有利地为任意的 B 细胞白血病（例如慢性淋巴细胞白血病或急性淋巴细胞白血病）。进一步的参考见例如<http://www.cancer.org>。优选地，惰性非霍奇金 B 细胞淋巴瘤可以如下列实施例所述地用抗人 CD3 和人 CD19 两者的双特异性单链抗体治疗。

本文所用术语“防止”理解如下：在用化学疗法或放射治疗淋巴瘤病灶、完全减轻人类患者的淋巴瘤病灶后，情况是并非所有淋巴瘤细胞都能从身体清除。然而，这些剩余的肿瘤细胞可能产生再发的淋巴瘤。本发明的药学方式和方法可以用来杀死这些剩余的肿瘤细胞，从而防止淋巴瘤(起源于初始治疗后剩余在身体中的隐藏性淋巴瘤细胞)复发。以这种方式，本药学方式和方法帮助防止患者复发 B NHL 或 B 细胞白血病。

在体内的临床研究中，进一步评估了抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链

抗体的安全谱。作为结果，在向患顽固性 B 细胞肿瘤的患者以重复的大剂量输注相同剂量的双特异性单链抗体后发现不希望的首剂效应。如下文所示，CRS 强度在施用首剂量后最高，对随后输注的抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体的反应渐减。在 6 次输注后，与基线水平相比，几乎没有观察到对细胞因子水平的诱导。此外，当增加向患复发或顽固性 B 细胞慢性淋巴细胞白血病的患者施用的双特异性单链抗体的剂量时，在反复施用双特异性单链抗体后观察到 CRS 强度下降。不束缚于理论，所述现象最可能起因于 T 细胞对反复刺激的适应（“T 细胞沉默”）。此外，当在受治疗的患者中监控 T 细胞数量时，发现 T 细胞数量基于每次输注起伏很大，表明短期、爆发式的 T 细胞活化。抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体的生物学活性可以在这些研究中得到证明，导致 T 细胞活化、细胞因子释放以及 B 细胞计数下降，但未确定最佳的生物学剂量（OBD）。此外，观察到与 CRS 相关的副作用。

相反地并且在本发明上下文中令人惊讶地发现，例如通过以每平方米患者身体表面积 10 μ g-80 μ g 的日剂量施用至少 1 周的双特异性单链抗体，可以通过本文所述的双特异性单链抗体完成预期的生物学效果，即长期的 T 细胞活化和表达、以及对肿瘤细胞的毒性（同时降低、最小化或完全废止与大剂量施用治疗性抗体相关的不希望的副作用），其中所述的日剂量施用超过至少 6 小时。如后附的非限制性实施例所述，向患小淋巴细胞淋巴瘤(SLL/CLL)或滤泡性淋巴瘤的患者超过 24 小时地连续施用至少两周小量的双特异性单链抗体即 15 μ g/m² 的双特异性单链抗体对体内长期的 T 细胞活化和增殖是足够的，并且导致相当的抗肿瘤反应：两名患者具有部分的反应（PR），即相比六个参考淋巴瘤收缩高于 50%。此外，在一名这些患者中，证实从骨髓消耗了淋巴瘤细胞，这通过常规方法例如化学疗法是难以达到的。重要地，该低剂量的双特异性单链抗体在患者中导致比大剂量施用双特异性单链抗体更多的生理性 T 细胞反应。此外，本文提供的方法和用途不引起通常与 T 细胞活化相关的、显著的副作用，例如 CRS。这些低的剂量仍然能够在惰性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B

NHL)或 B 细胞白血病的患者中诱导有益的抗肿瘤反应。

在先前用重复性大剂量输注的施用方案中，即使在体内 I 期临床试验中施用最低的起始剂量，也观察到外周血中白细胞计数突然降低，其中所述白细胞包括 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞（见实施例）。这种降低的一个解释是活化的 T 细胞与其它活化的白细胞突然粘附、并至少部分迁移入组织。由大剂量施用双特异性单链抗体引起的这种爆发式 T 细胞活化导致局部细胞因子谱内皮功能异常和紊乱，这被认为是通常在 CRS 中观察到的副作用的主要原因。相反地，如下列实施例所述，根据本发明的药学方式和方法可以更加缓和地活化（并转换）T 细胞群体，表明释放的细胞因子数量是剧烈减少的。因此，根据本发明的药学方式和方法进行供应就避免了例如局部细胞因子网络突然紊乱的现象。所以，根据本发明方法和用途治疗的患者未见报道有显著的副作用。此外，根据本发明药学方式和方法施用双特异性单链抗体不引起任何如大剂量输注双特异性单链抗体所观察到的剧烈 T 细胞起伏。

如实施例中所示，虽然在输注期起始时能观察到 T 细胞数量轻微减少（最可能是因为共施用的类固醇），但根据本发明的治疗更导致血液中活化的 T 细胞数量增加。具体地，细胞毒性的 $CD8^+$ T 细胞数由于增殖而增加。这对显示不利效应细胞:靶细胞（E:T）比率的肿瘤性疾病是尤其适合的，其中所述肿瘤性疾病例如体内 E:T 比率达 1:100-1:1000 的 B 细胞淋巴瘤病灶。先前的体外实验表明，此类不利的 E:T 比率导致更加缓慢的 B 细胞杀伤。在此种条件下，必须假定相同 T 细胞具有重复的导致肿瘤块显著减小的 B 细胞杀伤潜力。此外，假定扩大定位在 B 细胞肿瘤中（例如在 B 细胞淋巴瘤中）的 T 细胞库来提高 E:T 比率对完成治疗结果也是必需的。因为根据本发明的药学方式和方法提供了血流中至少不变或者甚至增加的活化的 T 细胞数量，所以长期改善了对肿瘤细胞例如 B 细胞淋巴瘤中的肿瘤性 B 细胞的细胞毒性潜能。

此外，根据本发明的药学方式和方法导致 $CD8^+$ T 细胞如 T 细胞活化标记 HLA-DR（长期活化标记）与 CD69 或 CD25（短期活化标记）相比

所例证的长期活化。如上文指出地，持续施用低量的抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体足以在长时间内增加活化的 CD8⁺ T 细胞数量，如例如所附实施例和图 6-8 中所述。这与在大剂量施用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体中观察到的爆发式 T 细胞活化形成鲜明对比；参见例如图 1。因此，根据本发明药学方式和方法而延长存在的双特异性单链抗体允许平缓的、长期的 T 细胞活化和增殖，这尤其适合治疗表征为不利 E:T 比率的肿瘤性疾病，例如 B 细胞淋巴瘤。此外，观察到在重新开始连续输注后（例如在医学干涉后），发生更快并且更强的细胞毒性 CD8⁺ T 细胞活化和增殖。因此，优选在几轮输注循环后是无输注的期间。例如，患者可以接受连续四周的本文定义的双特异性单链抗体输注、然后四周的无输注期间，这也在本发明范围内。此后，这个顺序通常可以重复一次、两次、三次或者甚至更多次。

此外，虽然在根据本发明的药学方式和方法治疗的患者中能观察到长期的 T 细胞活化，但相关副作用显著降低或者甚至消除。因此，可以通过应用根据本发明药学方式和方法的双特异性单链抗体来最小化或防止 CRS 相关性副作用。

最后，要强调的是，虽然在本文所述用途、方法和药盒中仅施用了低量的双特异性单链抗体，但抗体治疗在消除肿瘤性 B 细胞、从而在体内引起可检测的抗肿瘤反应上是非常有效的。这通过图 9 和 11 中的 B 细胞计数以及通过图 10 和 13 中所示的淋巴瘤大小下降进行了例证。具体地，两名根据本发明药学方式和方法治疗的患者具有部分的反应，即比 6 个参考淋巴瘤病灶高于 50% 的收缩。此外，在一名这些患者中，证实从骨髓有效地消除了淋巴瘤细胞；参见图 12。因此，当应用本发明的药学方式和方法时，副作用得到降低或消除，但不伴随任何细胞毒性的下降。

相反，大剂量施用模式的抗体疗法导致大量、短期的 T 细胞活化和随后活化的 T 细胞向内皮和组织的重新定位/迁移，而在血流中仅剩下小量的有效 T 细胞。如本领域熟知地，内皮可以通过大量的 T 细胞活化、随后 T 细胞粘附于内皮细胞、并迁移入组织而致严重受损。在病理学条件下，可

以观察到此类突然的 T 细胞活化，例如在由细菌毒素引起的严重败血病中（见，例如 Li (2004), *Br. J. Pharmacol.* 141(4): 709-16; Matzen (2004), *Virus Res.* 104(2): 145-55; Jacob HS. (1980) *Arch. Pathol. Lab. Med.* 104(12): 617-20; Salyer (1990), *Am. J. Pathol.* 136(4): 831-41; Okajima (2004) *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2(2): 125-33; Ferrero (2004) *Methods Mol. Med.* 98: 127-36)。此外，这种爆发式的 T 细胞活化与细胞因子引起的副作用相关。在先前使用重复性大剂量输注的剂量研究中，甚至在体内 I 期临床试验中施用最低的起始剂量，也观察到外周血中白细胞计数突然降低，其中所述白细胞包括 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞。这种降低的一个解释是活化的 T 细胞与其它活化的白细胞突然粘附、并至少部分迁移入组织。假设该大量活化的 T 细胞群体（任意时间大约 70% 的人 T 细胞库存在于外周血中）的突然活化和迁移导致组织中 T 细胞稳态和局部细胞因子谱的紊乱。

因此，与比先前的 I 期研究相比，显著延长地暴露于双特异性单链抗体、以及每个时间单位所给剂量的显著下降潜在地增加了药物耐受性、并最大化了药物的抗肿瘤活性。

在先前调查重复性大剂量输注的双特异性单链抗 CD19 × 抗 CD3 抗体的安全性和耐受性的临床研究中，在每次输注后观察到不希望的 T 细胞数起伏现象，表明 T 细胞依赖于每次输注爆发式地活化。值得注意的是，施用相同和增加剂量的所述双特异性单链抗体都观察到这个效果。

根据本发明药学方式和方法进行的供给显示与大剂量输注更大量抗体获得的 T 细胞活化模式在性质上不同的 T 细胞活化模式。具体地，已经发现，施用根据本发明药学方式和方法的双特异性单链抗体导致体内初期缓慢增加、然后维持恒定、或者甚至增加的细胞免疫反应，所述免疫反应与在天然感染例如病毒感染过程中观察到的反应类似。在天然感染中，当致病性抗原特异的循环性 T 细胞在引流的淋巴组织中碰到该抗原时，其会活化。在天然感染中的此类活化之后，致病性抗原特异的 T 细胞亚群发生增殖。由于 CD8⁺T 细胞的增殖，这种增加与对入侵病原体或对被该病原体感染的细胞的细胞毒性潜能增加。因此，本发明的药学方式和方法刺激对天

然感染如病毒感染的免疫反应，因为发生缓慢和逐渐增加的活化的 T 细胞数。

总之，本发明提供下列主要优点：

- 模拟更加生理化的 T 细胞反应，没有剧烈的 T 细胞起伏现象，血流中的效应细胞（细胞毒性）T 细胞数量恒定或者甚至增加
- 细胞因子释放减少/没有由于低量双特异性单链抗体的首剂效应，具有有效的抗肿瘤（CTL）活性（两名患者有部分的反应，其中一人从骨髓有效地消除淋巴瘤细胞）
- 降低的不利副作用
- 最小化由反复的 T 细胞活化和失活周期引起的异常 T 细胞活化
- 细胞毒性 T 细胞的长期活化和增殖
- 药物的延长存在帮助克服通常存在于淋巴瘤病灶中的导致比原先预料的更慢的 B 细胞杀伤的不利 E:T 比率
- 药物的延长存在允许通过一个并且相同的 T 细胞发生反复的 B 细胞杀伤，并因此确保肿瘤块显著减小
- 增殖局部的 T 细胞库而提高 E:T 比率和治疗结果
- 在不同外周血单核细胞（PBMC）供体之间体外活性存在显著差异（反映在 EC_{50} 值的差异）。对药物延长的暴露时间在相当比例的患者中提高了抗 CD19 针对的细胞毒活性。

因此，与先前的 I 期研究相比，显著延长地暴露于药物和每个时间单位所给剂量的显著下降潜在地增加了耐受性、并最大化了药物的抗肿瘤活性，产生更好的安全谱。

根据本发明方案的施用可以每天超过 6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、或者甚至超过 24 小时。优选地，根据本发明方案的施用为超过 10 小时、更加优选超过 12 小时、或者甚至更加优选超过 24 小时。

在本发明的方法、用途或药盒的优选实施方案中，所述双特异性单链抗体构建体的日剂量为施用超过至少 8 小时、更加优选至少 10 小时。

在本发明的方法、用途或药盒甚至更加优选的实施方案中，日剂量为施用超过至少 12 小时、14 小时、16 小时、18 小时、20 小时或 22 小时。最优选地，日剂量为全天施用，即超过 24 小时。

在本发明的方法、用途或药盒的另一优选实施方案中，所述 CD3 特异的所述 V_H 和 V_L 区衍生自 CD3 特异的抗体，其中所述的 CD3 特异的抗体选自：OKT-3、X35-3、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT31、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2 和 F101.01。每个这些抗体都在现有技术进行了详细描述。

更加具体而言，所述 CD3 特异的所述 V_H 区包含至少一个 CDR3 区，所述 CDR3 区包含或为 SEQ ID NO. 11 所示氨基酸序列，所述 CD3 特异的所述 V_H 区包含至少一个 CDR2 区，所述 CDR2 区包含或为 SEQ ID NO. 10 所示氨基酸序列，和/或所述 CD3 特异的所述 V_H 区优选地包含至少一个 CDR1 区，所述 CDR1 区包含或为 SEQ ID NO. 9 所示氨基酸序列。

本发明的构建体也包含 V_L 区。所述 CD3 特异的所述 V_L 区包含至少一个 CDR3 区，所述 CDR3 区包含或为 SEQ ID NO. 14 所示氨基酸序列，所述 CD3 特异的所述 V_L 区包含至少一个 CDR2 区，所述 CDR2 区包含或为 SEQ ID NO. 13 所示氨基酸序列，和/或所述 CD3 特异的所述 V_L 区包含至少一个 CDR1 区，所述 CDR1 区包含或为 SEQ ID NO. 12 所示氨基酸序列。

理解为，在大多数优选实施方案中，将如上文定义的 CDR (CDR1、CDR2、CDR3) 包含在一个单独的双特异性构建体中进行根据本发明的施用。

在本发明的方法、用途或药盒的另一优选实施方案中，所述 CD3 特异的所述 V_H 区包含或者为 SEQ ID NO 17，所述 CD19 特定结构域的 V_H 区包含或者为 SEQ ID NO 15，所述 CD3 特异的所述 V_L 区包含或

者为 SEQ ID NO 18, 和 / 或所述 CD19 特定结构域的 V_L 区包含或者为 SEQ ID NO 16。

本发明的方法、用途或药盒也考虑利用包含选自下列序列的氨基酸序列的双特异性单链抗体构建体:

- (a) 在 SEQ ID NO 2、4、6 或 8 中描述的氨基酸序列;
- (b) 由 SEQ ID NO 1、3、5 或 7 中所示核酸序列编码的氨基酸序列;
- (c) 由与(b)的核酸序列具有至少 70%、80%、90%、95%或 99%同一性的核酸序列编码的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列能够(特异地)结合至 CD3 和 CD19; 并且

(d) 由与(b)的核苷酸序列遗传密码简并的核酸序列编码的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列能够(特异地)结合至 CD3 和 CD19。

任意特定核酸分子或多肽是否与本文定义的核苷酸或氨基酸序列为至少 70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性可以用已知的计算机程序有利地测定。测定查询序列(本文定义的序列)和目标序列之间最佳整体匹配、也称为整体序列比对的优选方法可以用基于 Brutlag 等人算法(Comp. App. Biosci. 6:237-245(1990))的 FASTDB 计算机程序来测定。在序列比对中, 查询和目标序列都为 DNA 序列。RNA 序列通过将 U 转换为 T 来进行比较。

在本发明的方法、用途或药盒的优选实施方案中, 所述可变结构域通过如上文定义的额外接头和/或间隔物序列连接, 并且如 WO 2004/106381 中所示。

在本发明的方法、用途或药盒的优选实施方案中, 日施用持续至少 2 周、至少 3 周、至少 4 周或者至少 8 周。因此, 施用也考虑以持久的基础进行, 每天至少 6 小时、优选每天至少 8 小时、更加优选每天至少 10 小时、最优选每天 24 小时, 进行至少 1、2、3、4、5、6、7 或 8 周或者甚至更长。也考虑在几轮输注循环后进行无输注的期间。例如, 患者可以接受四周连续输注的本文定义的双特异性单链抗体, 然后接受四周无输注的期间。此后, 这个顺序可以重复一次、两次、三次或者甚至更多次, 直至淋巴瘤病

灶低于通过常规方法例如计算的 X 射线断层术可检测的水平。有利地，延长施用直至达到完全的反应，即杀死所有或者基本所有的淋巴瘤细胞。此外，在重新开始连续输注后（例如在无输注期之后或在医学干涉后）观察到细胞毒性 CD8⁺ T 细胞发生更快并且更强的活化和增殖。因此，优选在几轮输注循环后进行无输注的期间。

在本发明的方法、用途或药盒的另一优选实施方案中，药物组合物联合一种或多种其它药物制剂施用。

本发明也用于联合治疗（co-therapy）方法和联合疗法的方案中。在一些实施方案中，本文定义的双特异性单链抗体与一种或多种其它疗法联合施用。在一些实施方案中，本文定义的双特异性单链抗体与一种或多种其它疗法同时施用于患者。优选地，此类疗法用于治疗如本文定义的 B NHL 或 B 细胞白血病。术语“同时地”不限制药物或治疗剂在确切相同的时间施用，而是表示本文定义的双特异性单链抗体和其它药剂按次序并在一定时间间隔内向受试者施用、以便本文定义的双特异性单链抗体能够和其它试剂一起提供比它们单独施用增加的效应。例如，每种药物或治疗剂可以在相同时间或在不同时间点以任意次序依次地施用；然而，如果不在相同时间施用，那么它们应当在足够接近的时间内施用以便提供预期的治疗或药物效果。

每种（联合）治疗剂可以单独地以任意适当的形式或者通过任意适当的途径施用。在其它实施方案中，本文定义的双特异性单链抗体在手术前、同时或之后施用。优选地，手术完全移去局部的淋巴瘤或者降低大肿瘤的大小。手术也可以作为预防性措施进行或者用来缓解疼痛。

本文提供的剂量数量和施用频率包含在术语“治疗有效的”中。剂量和频率一般进一步地根据每名患者的特定因素而不同，其中所述因素取决于施用的特定治疗性或药物制剂、B NHL 或 B 细胞白血病的严重程度和类型、施用途径、以及患者的年龄、体重、反应和过往医疗史。适当的方案可以由本领域技术人员通过考虑此类因素、并遵从例如文献中报道和 Physicians' Desk Reference(第59版，2005)中推荐的剂量来进行选择。

在一些实施方案中，施用本文所述双特异性单链抗体的疗法与施用一种或多种疗法例如化学疗法、放射疗法、激素疗法和/或生物疗法/免疫疗法联合。药物或治疗剂包括但并不限于蛋白质分子，其中包括但不限于肽、多肽、蛋白质、包括翻译后修饰的蛋白质、抗体等；或者小分子（少于1000道尔顿）、无机或有机化合物；或者核酸分子，其中包括但不限于双链或单链DNA、或双链或单链RNA、以及3股螺旋核酸分子。药物或治疗剂可以源自任意已知的生物（包括但不限于动物、植物、细菌、真菌和原生生物或病毒）或合成性分子文库。

所述联合疗法包括在不间断施用双特异性单链抗体之前、期间和/之后共同施用一种或多种治疗剂或药物制剂。与双特异抗体共同施用的所述治疗剂或药物制剂优选为用于标准非霍奇金淋巴瘤（NHL）疗法的化疗药物，如铂、蒽环类、烷化剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、抗生素、有丝分裂抑制剂和抗微管蛋白剂等。然而，联合疗法也旨在减少炎症。此处，尤其优选以上文列出的任意方式共同施用抗炎剂，例如糖皮质激素。如本文所附实施例所述，在连续施用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体之前，已经向患者施用了 100 mg 类固醇来抑制连续施用起始阶段的细胞因子生成。备选地，类固醇也可在连续施用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体第 1 天至第 4 天的起始阶段进行施用。施用类固醇的剂量如在第 1 天连续输注前的 1 小时为 500 mg、在第 2 天（连续输注 24 小时后）为 250 mg、在第 3 天（连续输注 48 小时后）为 125 mg，并且在第 4 天（连续输注 72 小时后）为 125 mg。然而，也考虑在连续施用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体之前、期间或之后不施用类固醇。当然，化疗药物和抗炎药物/药剂也可以共施用（co-administration）。在连续施用双特异性单链抗体期间发生共施用的事件中，此类共施用可以发生在施用所述抗体的整个持续时间、或者仅为其一个或多个部分。例如，此类共施用可以在施用双特异性单链抗体之前起始、并且可以在开始连续施用双特异性单链抗体后结束，这都在在本发明实施方案的范围内。在此种情况下，在不间断施用双特异性单链抗体的剩余阶段省略任何进一步的共施用是有利的，或者备选

地在不间断施用双特异性单链抗体期间和/或之后的稍后时间点重新共施用药物制剂也是有利的。将联合疗法设计成使任意共施用都仅发生在不间断施用双特异性单链抗体之前和/或之后、而不发生在不间断施用期间也是有利的。如此地，必须将在本发明实施方案意义内的“联合疗法方案”理解为在时序意义上包含连续施用双特异性单链抗体。这意味着在一些情况下联合疗法方案可以进行比不间断施用双特异性单链抗体更长的时间，因为可能在连续施用双特异性单链抗体之前和/或之后共同施用药剂作为联合疗法的一部分。相反地，联合疗法的方案可以进行比连续施用双特异性单链抗体更短的时间，因为共同施用联合疗法仅发生在连续施用双特异性单链抗体期间的时段内。优选地，所述类固醇跟据实施例中显示或上文所述的方案和剂量进行施用。

如果在不间断地施用根据本发明的双特异性单链抗体的整个时间段中都以连续输注进行共同施用，那么就可以将两种药剂 - 用于联合疗法的药剂和双特异性单链抗体 - 组合在一种溶液中。将用于联合疗法的药剂直接添加到应用于患者的双特异性单链抗体溶液/制剂中。进一步地，也可以将用于联合疗法的药剂和双特异性单链抗体作为单独的溶液在相同的时间平行施用。

在一些情况中，联合疗法是有利的或必需的，这取决于接受根据本发明药学方式和方法治疗的患者存在、怀疑有或预期有的其它疾病。此类共同施用可以在根据本发明药学方式和方法的不间断施用之前、期间或/和之后以一种或多种大剂量应用。备选地，如根据本发明方法、药盒或用途中所示，这种共同施用也可以是不间断性质的，并且在这种情况下可以同时、并且甚至可以在与不间断施用的双特异性单链抗体相同的施用载体中进行。

本文定义的双特异性单链抗体和其它的治疗剂可以协同作用。如本文所用，术语“协同的”指的是比任意两种或多种单独疗法（例如，一种或多种药物或治疗剂）的相加效应更加有效的联合疗法（例如，联合本文定义的双特异性单链抗体和（a）本文列出的其它药物或治疗剂）。联合疗法

(例如,本文定义的双特异性单链抗体和(a)本文列出的其它药物或治疗剂的联合)的协同效应允许使用更低剂量的一种或多种疗法(例如,一种或多种药物或治疗剂)和/或向患有本文定义的B NHL或B细胞白血病的患者更低频率地施用所述疗法。利用更低剂量的疗法(例如,药物或治疗剂)和/或更低频率地施用所述疗法的能力减少与向受试者施用所述疗法相关的毒性,而不降低所述疗法在预防或治疗疾病、例如本文定义的B NHL或B细胞白血病中的效力。此外,协同效应能产生在预防、管理、治疗和/或改善本文定义的B NHL或B细胞白血病中具改善疗效的疗法(例如,药物或治疗剂)。最后,联合疗法(例如,药物或治疗剂)的协同效应可以避免或减少与使用任何一种疗法相关的不利或不期望的副作用。

在另一实施方案中,联合疗法旨在降低炎症。此处,尤其优选以上文列出的任意方式共同施用抗炎剂,例如糖皮质激素。

本发明这项实施方案的联合疗法也有利地提供对免疫效应细胞、细胞增殖或细胞刺激的活化信号。

不间断施用双特异性单链抗体可以是静脉内的、肠胃外的、皮下的、经皮肤的、腹膜内的、肌内的或肺的。在大多数情况下,静脉内的施用模式为选择用来不间断施用双特异性单链抗体的模式,并且在这种情况下为选择用来共同施用作为联合疗法部分服法的药物制剂的模式。如此地,尤其优选静脉内的施用。在这种情况下,可有利地选择合适的计量设备如由Baxter制备的多治疗用输注泵模型6060。不论选择什么计量设备,其都应当设计和建造成最小化或更好地防止治疗剂施用在药筒交换和/或电池更换或充电过程中的中断。这可以例如通过选择具有与交换药筒分开的双特异性单链抗体二级容器的设备来实现,如此选择以便甚至当移去空的或几乎空的药筒、并换上新的药筒时也可以从二级容器持续输入患者。

静脉内施用的模式以及在共同施用联合疗法的部分服药法的情况中涉及向患者体内植入泵来计量此类施用。本领域普通技术人员知道此类计量泵,例如上文列出的由Baxter制备的模型6060。

作为非限制性实例,其可以是,不间断、即连续的施用通过携带或植

入患者体内计量治疗剂进入患者体内流入量的小型泵系统来实现。此类泵系统通常为本领域已知，并且通常依赖于定期交换的、含有待注入治疗剂的药筒。当在此泵系统中交换药筒时，不间断地流入患者体内的治疗剂会随之发生暂时中断。在这种情况下，仍然在本发明药学方式和方法的意义范围内认为更换药筒之前的施用阶段和更换药筒之后的施用阶段共同组成一种此类治疗剂的“不间断施用”。相同的系统将应用非常长的施用，其中需要不止一次地更换药筒、或者需要更换其中驱动泵的电池、这导致治疗剂暂时中断流入患者身体。

由于长期创伤特别容易感染，所以将采取适当措施来最小化施用进入患者身体的穿刺位点的感染危险。上文所述也应用于通过相似递送系统的肌肉施用。

连续施用可以为通过贴在皮肤上的贴片来经皮肤，并以一定时间间隔进行替换。本领域技术人员知道适合这个目的药物递送贴片系统。应当注意，经皮肤施用尤其适合连续施用，因为更换第一张用完的贴片可以通过同时将其替换为第二张新贴片来方便地实现，例如贴在紧邻第一张用完的贴片的皮肤表面上，并且在移去第一张贴片前立即进行。流动中断问题或电池衰竭问题都不会出现。

在进一步优选的实施方案中，连续施用通过肺途径来实现，例如通过戴在鼻子一个或两个鼻孔的导管，所述导管与加压罐连接，其含量被精确计量。

然而，如本文和所附实施例中所述，最优选的施用模式为在给定时间/时间段内的静脉内施用。

本文所用的双特异性单链抗体有利地以药物组合物的形式施用于人类患者。虽然可以仅施用本文所用的双特异性单链抗体，但优选在可药用载体中施用。合适的药物载体实例为本领域熟知，并且包括磷酸缓冲盐溶液、水、脂质体、多种类型的润湿剂、无菌溶液等。含有此类载体的组合物可以通过众所周知的常规方法进行制剂。这些药物组合物可以以合适的剂量施用于受试者。剂量方案由主治医师和临床因素决定。如医学领域众所周

知地，任何一名患者的剂量取决于许多因素，其中包括患者的尺寸、身体表面积、年龄、所施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、总体健康以及其它同时施用的药物。肠胃外施用的制剂包括无菌的含水或无水溶液、或者悬浮液。无水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇和可注射的有机脂例如油酸乙酯。含水的载体包括水、含水溶液或悬浮液，其中包括盐和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格右旋糖、右旋糖和氯化钠，或者乳酸化林格液。静脉内的载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂（例如基于林格右旋糖的电解质补充剂）等。也可存在防腐剂和其它添加物，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。此外，组合物可包含蛋白质性质的载体，像例如血清白蛋白或免疫球蛋白，其中优选人源的。还考虑了，组合物除了包含蛋白质性质的双特异性单链抗体外，还包含进一步的生物学活性试剂，这取决于药物组合物的预期用途。此类药剂可以是用作细胞生长抑制剂的药剂、预防高尿酸血的药剂、抑制免疫反应的药剂（例如糖皮质激素，FK506）、作用于循环系统的药物和/或诸如 T 细胞共刺激分子的药剂或者本领域已知的细胞因子。

优选地，将本文定义的双特异性单链抗体在缓冲液、稳定剂和表面活性剂中制剂。缓冲液可以是磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐或醋酸盐缓冲液。稳定剂可以是氨基酸和/或糖。表面活性剂可以是去污剂、PEG 等。更加优选地，本文定义的双特异性单链抗体制剂在柠檬酸盐、赖氨酸、海藻糖和吐温 80 中。优选等渗的盐和吐温 80 作为本发明药物组合物的稀释剂。

优选地，在本发明的用途、方法或药盒中，药物组合物向人类患者施用。

双特异性单链抗体疗法的成功可以通过已建立的对各种疾病的标准方法来监控：

对于 B 细胞白血病的治疗，可以使用例如白细胞计数、分化物（differentials）、荧光活化细胞分选术（FACS）、骨髓穿刺和多种白血病特异的临床化学参数以及其它已经建立的标准方法。对 B 细胞淋巴瘤的治疗，可以使用例如计算机辅助的 X 射线断层术、X 射线、核磁共振 X 射

线断层术(例如,用于基于国家癌症研究所标准的反应评估(Cheson (1999), *J. Clin. Oncol.*; 17(4):1244)、正电子发射 X 射线断层术扫描、白细胞计数、分化物、荧光活化细胞分选术、骨髓穿刺、淋巴结活体解剖/组织学和多种淋巴瘤特异的临床化学参数(例如乳酸脱氢酶)以及其它已建立的标准方法。

细胞毒性可以通过本领域已知的方法以及在下文和所附实施例所述的方法进行检测。

图 1: 向患有复发性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 的患者静脉内施用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体 (bscCD19 × CD3) 的剂量逐渐增加研究 - 对外周 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺淋巴细胞计数的影响。已诊断为患有复发性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B NHL) 的患者 0202 在每周两次的治疗方案中接受 6 次超过 4 小时由静脉内施用的 bscCD19×CD3。bscCD19×CD3 的剂量按以下剂量逐渐增加: 1、2、4、7、10 和 13μg/m² 身体表面积。CD3⁺T 淋巴细胞(灰色菱形)、CD4⁺T 淋巴细胞(黑色方块)和 CD8⁺T 淋巴细胞(黑色三角形)的数目分别在第 0、2、7、9、14 和 16 天的 4 小时输注前和结束时通过流式细胞计量术测定,其中所述得各种 T 淋巴细胞数目以占总淋巴细胞数的百分数表示。4 小时的输注期间用箭头和灰色条带标示。

图 2: 对患有顽固性 B 细胞恶性肿瘤的患者静脉内施用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体 (bscCD19×CD3) 的剂量逐渐增加研究 - 对 TNF α 血清浓度的影响。已诊断患有套细胞淋巴瘤 (MCL) 的患者 1003 在研究的第 0、2、4、14、16 和 18 天接受 6 次、超过 4 小时、1.5μg (在第 0 天的起始剂量) 和 3μg (在随后研究时间的维持剂量) 的 bscCD19×CD3 输注。在 4 小时输注期间之前和之后测定 TNF α 的血清浓度。4 小时输注期间用箭头和灰色条带标示。

图 3: 如图 2 图例中所述地向患者 1003 静脉内施用 bscCD19×CD3 的剂量逐渐增加研究 - 对 IFN γ 血清浓度的影响。

图 4: 如图 2 图例所示地向患者 1003 静脉内施用 bscCD19×CD3 的剂

量逐渐增加研究 - 对 IL6 血清浓度的影响。

图 5: 如图 2 图例所示地向患者 1003 静脉内的施用 bscCD19×CD3 的剂量逐渐增加研究 - 对 IL10 血清浓度的影响。

图 6: CD3⁺/CD8⁺ 和 CD3⁺/CD4⁺ T 细胞计数分析。在开始输注 bscCD19×CD3 后, CD8⁺和 CD4⁺T 细胞从外周血大量消失, 这解释为: bscCD19×CD3 介导外周血 T 细胞和 B 细胞交联, 导致 T 细胞活化, 从而触发分布现象。然而, 治疗半周后, CD8⁺和 CD4⁺T 细胞重新出现在血液中, 并且数量进一步分别增加直至第 7 天和第 21 天。与起始值相比, CD8⁺和 CD4⁺T 细胞显示为在血液中增加了 3.5 到 4 倍。在 T 细胞数量于治疗的第 4 周开始减少之前, CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞的数量在治疗的第 2 和 3 周保持高。在输注 bscCD19×CD3 4 周后, 当诊断出相当的肿瘤缩小满足部分的反应的标准时, CD8⁺和 CD4⁺T 细胞计数仍高于相应的治疗前数值。

图 7: CD8⁺T 细胞亚群分析。效应细胞记忆亚群 TEM 几乎是负责由 bscCD19×CD3 诱导的 CD8⁺ T 细胞增殖的唯一亚群。CD8⁺ T 细胞负责所有 T 细胞大多数的细胞毒性, 并且 TEM 细胞和 TEMRA 亚群一起负责 CD8⁺ T 细胞的大多数细胞毒性。除了 TEM 亚群外, 在其它 CD8⁺ T 细胞亚群间未能观察到细胞计数上的显著变化, 如幼稚 T 细胞不能基于 bscCD19×CD3 提供的单个活化信号增殖, 或者 TEMRA 亚群完全不能增殖。因此, 能增殖的 CD8⁺ TEM 细胞的选择性增殖可明确地归因于应答肿瘤内受 bscCD19×CD3 修饰的 CD8⁺ TEM 细胞与 B 淋巴瘤细胞接触的细胞分裂和增殖。由于循环性 B 淋巴瘤细胞在第 3 天、即在观察的 T 细胞增殖前已经从外周血中耗竭, 所以可以排除血液中循环的 bscCD19×CD3 修饰的 B 淋巴瘤细胞对 T 细胞增殖的显著贡献。

图 8: CD8⁺ T 细胞活化标记分析。在高度活化 CD8⁺ T 细胞之后, CD8⁺ T 细胞增殖, 其中 CD8⁺ T 细胞的高度活化通过持续上调的活化标记 HLA-DR 表示。其它活化标记例如 CD69 和 CD25 仅在起始输注 bscCD19×CD3 后显示短暂的上调, 这可以通过外周血中循环性 bscCD19×CD3 修饰的 B 淋巴瘤细胞的活化来解释, 只要循环性 B 淋巴瘤

细胞在治疗的第一个 3 天期间就耗竭了。相反, 超过 3 周的持续上调 HLA-DR 反映了肿瘤内 $CD8^+$ T 细胞通过与肿瘤固有 B 淋巴瘤细胞接触而引起的活化, 其中所述的 B 淋巴瘤细胞受 bscCD19×CD3 的修饰。瘤内 T 细胞的活化产生肿瘤内的增殖性 T 细胞反应, 进而导致 T 细胞增殖, 这继而也出现在循环血中。这些在肿瘤中活化并随后迁移入血液的 T 细胞仍然显示长期活化标记 HLA-DR, 但短期活化标记 CD69 和 CD25 已经下调了。

图 9: 患者#105003 的 B 细胞计数。患者以治疗前大约每毫升血液 140 个 B (淋巴瘤) 细胞开始。在起始输注后, 循环性 B (淋巴瘤) 细胞在治疗的第一个 3 天内迅速下降, 并最终在第一周治疗末完全从外周血中消失。因此, 由于 bscCD19×CD3 对所述细胞的细胞毒性, 所以其能够完全清除循环性 B (淋巴瘤) 细胞。

图 10: (A): 在用 bscCD19×CD3 治疗 4 周之前 (左边; 05 年 9 月 26 日) 和之后 (右边; 05 年 10 月 31 日) 通过计算辅助的 X 射线断层术 (CT) 测定淋巴瘤病灶#2 的大小 (如图 10(B)表中所示)。(B): 对(A)中所示淋巴瘤以及 5 个其它选来进行功效判定的淋巴瘤病灶在大小上的下降进行了量化, 如(B)中所示的表所述。总淋巴瘤大小下降表示为这 6 个所选淋巴瘤病灶最大横截面直径产物总和 (即总产物直径或 SPD) 的百分数下降。因此, 将淋巴瘤收缩 58.0% 诊断为达到部分的反应 (PR) 的标准。

图 11: 患者#102003 的 B 细胞计数。患者以治疗前大约每毫升血液 920 个 B (淋巴瘤) 细胞开始。在起始输注 bscCD19×CD3 后, 循环性 B (淋巴瘤) 细胞在治疗的第一个 3 天内显示与细胞重新分布一致的迅速下降, 然后在每毫升 600 个细胞处短期的有限恢复。在进一步的治疗过程中, B (淋巴瘤) 细胞从循环中完全耗竭、直至在治疗两周后诊断到部分的反应 (PR)。这些数据肯定了, 作为其部分临床效果, bscCD19×CD3 能够完全地清除循环性 B (淋巴瘤) 细胞。

图 12: 在用 bscCD19×CD3 治疗之前和两周之后患者#102003 的骨髓组织病理学。

左图为在用 bscCD19×CD3 治疗前: 骨髓显示小淋巴细胞性淋巴瘤细

胞 40-50%的骨髓迁移。右图为用 bscCD19×CD3 治疗两周后：不再能发现小淋巴细胞性淋巴瘤细胞迁移的证据，而观察到 T 细胞显著增加。

图 13: (A): 在用 bscCD19×CD3 治疗之前 (左图; 05 年 5 月 2 日) 和 2 周之后 (右图; 05 年 5 月 31 日) 通过计算机辅助的 X 射线断层术(CT) 测定患者#102003 的 4 个纵隔淋巴瘤病灶的大小(如图 13(B)中表的表所示)。(B): 对(A)中所示淋巴瘤以及 2 个其它选来进行有效判定的淋巴瘤病灶(腹膜后的和隔膜的) 在大小上的下降进行了量化, 如(B)中所示的表所述。总淋巴瘤大小下降表示为这 6 个所选淋巴瘤病灶最大横截面直径产物总和 (即总产物直径或 SPD) 的百分数下降。因此, 将淋巴瘤收缩 57.2% 诊断为达到部分的反应 (PR) 的标准。

图 14: CD8⁺ T 细胞增殖与不同临床反应相关。显示了 2 名患者 CD8⁺ TEM 亚群的细胞过程, 其中所述患者即达到不同临床反应的患者 #109002(完全的反应)和#105003 (部分的反应)。也分别描述了第一和第二个 4 周对整体临床反应的贡献、以及第一个 4 周在 TEM 亚群曲线(AUC) 下的面积。对患者临床反应最大的贡献发生在治疗的第一个 4 周内, 并且很好地和 CD8⁺ TEM 亚群的增殖相关。这些高度细胞毒性 T 细胞的增殖似乎是临床效果的前提条件, 这基于下列观察, 即增殖时达到的绝对细胞数和相比处理前的水平的相对增加两者都有助于最佳的临床反应。

图 15: 在患者#109002 中通过 CT 扫描检测到的髂(Iliacal)淋巴瘤(用圆圈标记): 抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体治疗前的大小为: $3.2 \times 2.2 \text{ cm}^2$ 。在 4 周连续输注抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体后, 同一淋巴瘤病灶缩小到 $1.7 \times 1.2 \text{ cm}^2$ 的大小。在 8 周连续输注抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体后, 淋巴瘤消失, 即大小正常到正常的淋巴结大小 ($0.8 \times 0.8 \text{ cm}^2$)。

图 16: 向患者# 109002 连续输注抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体使治疗前急剧增大的脾脏大小正常化。

现在, 本发明将通过参考下列仅为示例性、并且不解释为限制本发明范围的实施例来进行描述。

实施例 1:**1. 构建包含各种结构域重排的 CD19 × CD3 和 CD3 × CD19 双特异性单链抗体**

一般地，包含特异性结合人 CD3 抗原的结构域以及特异性结合人 CD19 抗原的结构域的每一双特异性单链抗体分子如下文表 1 所述命名。

表 1: 包含抗 CD3 特异性和抗 CD19 特异性的双特异性单链抗体分子的形式

构建体 编号	SEQ ID No: (核苷酸/蛋白质)	蛋白质构建体的形式 (N → C)
1	1 / 2	VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3)
2	3 / 4	VH(CD19)-VL(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3)
3	5 / 6	VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19)
4	7 / 8	VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19)

根据标准的 PCR 方法(Orlandi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 3833-7)克隆 HD37 杂交瘤的可变轻链(VL)结构域和可变重链(VH)结构域(Pezzutto, J. Immunol. 138 (1997), 2793-9)。用寡聚 dT 引物和 Taq 聚合酶进行 cDNA 合成。基于 Dübel, J. Immunol. Methods 175 (1994), 89-95 所述的引物用与 VL 结构域侧翼的引物 5' L1 (SEQ ID NO: 19)和 3' K (SEQ ID NO: 20)以及用于重链的 5' H1 (SEQ ID NO: 21)和 3' G (SEQ ID NO: 22)引物通过 PCR 扩增抗 CD19 V 结构域。抗 CD3 scFv 片段的 cDNA 由 Traunecker 惠赠(Traunecker, EMBO J. 10 (1991) 3655-9)。

表 1 所示的构建体 1 如下文所述产生。将相应的 VL 和 VH 区域克隆到分别的质粒载体中，用作分别用寡核苷酸引物对 5'VLB5RRV (SEQ ID NO: 23) / 3'VLGS15 (SEQ ID NO: 24)和 5'VHGS15 (SEQ ID NO: 25) / 3'VHBspE1 (SEQ ID NO: 26)进行 VL 和 VH 特异性 PCR 的模板，以获得抗 CD19 scFv 片段。在 PCR 产物中引入重叠互补序列，其组合以形成随

后融合 PCR 中的 15-氨基酸(Gly₄Ser₁)₃-接头的编码序列。用引物对 5'VLB5RRV (SEQ ID NO: 23) / 3'VHBspE1 (SEQ ID NO: 26)进行扩增步骤,用限制性酶 EcoRV 和 BspE1 切割得到的融合产物(或者抗 CD19 scFv 片段)并且从而克隆入 bluescript KS 载体中(Statagene),其含有(EcoR1/SalI 克隆的)抗 17-1A/抗 CD3 双特异性单链抗体(实际上是不含 Flag 标签的形式)的编码序列(Kufer, Cancer Immunol. Immunother. 45 (1997) 193)。因此,抗 17-1A 特异性由抗 CD19-scFV 片段替代,保留连接 C 末端抗 CD3 scFv 片段的 5 个氨基酸的 Gly₄Ser 接头。随后,将编码具有 VL_{CD19}-VH_{CD19}-VH_{CD3}-VL_{CD3} 结构域排列的抗 CD19/抗 CD3 双特异性单链抗体的 DNA 片段亚克隆到所述表达载体 pEF-DHFR 的 EcoR1/SalI 位点(Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-5)。通过电穿孔将得到的质粒 DNA 转染到 DHFR 缺陷的 CHO 细胞中。如上文所述进行选择、基因扩增和蛋白质生产(Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-5)。对应于如上文表 1 所述构建体 1 的 DNA 序列示于 SEQ ID NO: 1。此 DNA 序列(具有前导序列)的蛋白质翻译示于 SEQ ID NO: 2。

如下所述构建上文表 1 所述的其它构建体。在设计上述表 1 所示的各种抗 CD3/抗 CD19 单链双特异性抗体时用对应于 SEQ ID NO: 1 (构建体 1)的 DNA 序列(其蛋白质翻译示于 SEQ ID NO: 2)作为 PCR 模板。

用分别的引物组合 5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36) 和 3'VHCD19GS15 (SEQ ID NO: 37)或者 5'VLCD19GS15 (SEQ ID NO: 38) 和 3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39)进行 PCR 以在位点 A1 和 A2 中(如 WO2004/106381 中的图 1A 和 1B 所定义)产生 CD19 的 VH-VL 排列。在这些 PCR 循环过程中,在 PCR 产物中引入重叠互补序列以形成随后融合 PCR 中的 15 个氨基酸接头的编码序列。在第二个 PCR 反应中(融合 PCR)融合扩增的 VL 和 VH 结构域,其中仅使用外侧引物(即 5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36)和 3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39))并且需要这两种扩增子。

使用利用其它引物组合的类似方法构建其它结构域排列。设计一组适

当引物以进行基于多重 PCR 的克隆步骤, 最终得到各种 VL-VH 结构域排列。所用的引物组合列于下表:

表 2: 构建表 1 所示的构建体 1-4 的位点 A1 和 A2 所使用的基于 PCR 的克隆步骤概述

PCR 步骤	所用引物		PCR 步骤	所用引物	得到的 N 端结构域顺序
PCR A1	5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36)	3'VHCD19GS15 (SEQ ID NO: 37)	融合 PCR A1+A2	5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36)	CD 19 VH-VL
PCR A2	5'VLCD19GS15 (SEQ ID NO: 38)	3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39)		3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39)	
PCR A1	5'VHBsrGI (SEQ ID NO: 32)	3'VHL2KGS15 (SEQ ID NO: 33)	融合 PCR A1+A2	5'VHL2KBsrGI (SEQ ID NO: 32)	抗 CD3 VH-VL
PCR A2	5'VLL2KGS15 (SEQ ID NO: 34)	3'VLL2KBspEI (SEQ ID NO: 35)		3'VLL2KBspEI (SEQ ID NO: 35)	
PCR A1	5'VLL2KBsrGI (SEQ ID NO: 40)	3'VLL2KGS15 (SEQ ID NO: 41)	融合 PCR A1+A2	5'VLL2KBsrGI (SEQ ID NO: 40)	抗 CD3 VL-VH
PCR A2	5'VHL2KGS15 (SEQ ID NO: 42)	3'VHL2KBspEI (SEQ ID NO: 43)		3'VHL2KBspEI (SEQ ID NO: 43)	

设计包含所述限制性酶识别位点的下列引物进行基于 PCR 的克隆步

骤以改变 C 端位置的 VH-VL 结构域排列，即 WO2004/106381 的图 1A 和 1B 所定义的位点 B1 和 B2。

表 3: 构建表 1 所示的构建体 1-4 的位点 B1 和 B2 所使用的基于 PCR 的克隆步骤概述

PCR 步骤	所用引物		得到的 C 端结构域顺序
PCR B1 + B2	5' VLCD19BspEIGS (SEQ ID NO: 31)	3' VHCD19BspEI (SEQ ID NO: 44)	CD 19 VL-VH
	5' VHCD19BspEIGS (SEQ ID NO: 29)	3' VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 30)	CD19 VH-VL
	5' VLL2KBspEIGS (SEQ ID NO: 27)	3' VHL2KBspEI (SEQ ID NO: 28)	抗 CD3 VL-VH

将侧翼为两个 BspEI 位点的相应 PCR 产物克隆到用 BspEI 和 XmaI 限制性酶消化的称为 BS-CTI 的质粒中。用限制性酶切割位点 XbaI 和 Sall 在之前将称为 CTI (SEQ ID NO: 45) 的多接头插入 Bluescript KS 载体中 (GenBank 登录号 X52327) 以提供其它切割位点以及编码 G₄S 接头的序列、6 个连续的组氨酸残基和终止密码子。在此克隆步骤中，VH 结构域的 BspEI 位点与质粒的 XmaI 位点融合从而破坏这两个位点。根据标准的方法测序验证可变结构域的正确方向。

上文所述的所有分子生物学方法根据 Sambrook, Molecular Cloning (实验手册, 第 3 版, 冷泉港实验出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 纽约, 冷泉港 (2001) 所述的标准方法进行。

将编码表 1 的双特异性单链抗体的 DNA (SEQ ID NO: 1、3、5、7) 转染到 DHFR 缺陷的 CHO 细胞中以如 Mack 等人所述 (Mack, Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995), 7021-25) 在 DHFR 缺陷的 CHO 细胞中进行真核蛋

白质表达。通过将氨甲蝶呤(MTX)的浓度增加到 20 nM 的终浓度诱导构建体的基因扩增。然后扩大所转染的细胞并产生 1 升上清液。

2. 表达和纯化抗 CD3 和 CD9 的双特异性单链抗体

在中国仓鼠卵巢细胞中 (CHO) 表达双特异性单链抗体。根据细胞的磷酸钙处理(“Molecular Cloning”, Sambrook 等人, 1989)进行表达载体转染。在滚瓶中用改良的 CHO DMEM 培养基(HiQ®, HiClone)培养细胞 7 天然后收获。通过离心去掉细胞, 将含所表达蛋白质的上清液存于-20℃。

用 Äkta® FPLC System(Pharmacia)和 Unicorn® Software 进行层析。所有的化学试剂为研究级的并且购自 Sigma(Deisenhofen) 或 Merck(Darmstadt)。根据制造商提供的方法用载有 ZnCl₂ 的 Fractogel® 柱 (Merck)进行固定的金属螯合亲和层析(“IMAC”)。用缓冲液 A2 (20 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.5, 0.4 M NaCl) 平衡柱并以 3 毫升/分钟的流速将细胞培养上清液 (500 ml) 加入柱(10 ml)中。用缓冲液 A2 洗柱以去除未结合的样品。用两步梯度的缓冲液 B2 (20 mM 磷酸钠缓冲液 pH 7.5, 0.4 M NaCl, 0.5 M 咪唑) 洗脱结合的蛋白质, 如下所述:

步骤 1: 6 个柱体积的 20%缓冲液 B2;

步骤 2: 6 个柱体积的 100%缓冲液 B2。

合并步骤 2 的洗脱蛋白质级分用于进一步纯化。

在用 PBS(Gibco)平衡的 Sephadex S200 HiPrep 柱(Pharmacia)上进行凝胶过滤层析。洗脱的蛋白质样品 (流速 1 毫升/分钟) 进行标准的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹检测。纯化之前用分子量测定 (分子量标准试剂盒, Sigma MW GF-200) 校准柱。用蛋白质测定染料(MicroBCA, Pierce) 和 IgG(Biorad)作为标准蛋白质确定蛋白质浓度。

在 IMAC 和凝胶过滤的两步纯化方法中分离双特异性单链抗体。通过在 PBS 中凝胶过滤确定主要的产物在天然条件下具有大约 52 kDa 的分子量。此分子量对应于双特异性单链抗体。所有的构建体根据此方法纯化。

纯化的双特异性单链抗体蛋白质通过用预制 4-12% Bis Tris 凝胶

(Invitrogen)在还原条件下进行 SDS PAGE 分析。根据制造商提供的方法进行样品制备和应用。用 MultiMark 蛋白质标准(Invitrogen)测定分子量。凝胶用胶体考马斯(Invitrogen 方法)染色。通过 SDS-PAGE 测定,分离的蛋白质的纯度大于 95%。

根据制造商提供的方法用 Optitran® BA-S83 膜和 Invitrogen Blot Module 进行蛋白质印迹。所用的抗体为抗 His Tag(Penta His, Qiagen)抗体和碱性磷酸酶(AP)标记的山羊抗小鼠 Ig(Sigma),用 BCIP/NBT(Sigma)作为底物。双特异性单链抗体可通过蛋白质印迹特异性地检测。在对应于纯化的双特异性分子的 52 kD 处检测到单一的条带。

3. CD19×CD3 特异性多肽的流式细胞术结合分析

进行 FACS 分析以检测构建体结合 CD19 和 CD3 能力相关的功能。为此目的使用了 CD19 阳性 NALM-6 细胞(人 B 细胞前体白血病)和 CD3 阳性 Jurkat 细胞(人 T 细胞白血病)。200,000 个 NALM-6 细胞和 200,000 个 Jurkat 细胞分别与 50 μ l 表达具有 CD19 和 CD3 的不同 VH 和 VL 结构域排列的双特异性抗体的 CHO 细胞培养物纯细胞上清液(如上文第二部分所述)在冰上孵育 30 分钟。在 PBS 中洗涤细胞两次并如下检测构建体的结合。如上所述处理的细胞与未标记的鼠 Penta His 抗体(1:20 稀释于含 2% FCS 的 50 μ l PBS 中)接触,其中所述未标记的鼠 Penta His 抗体通过构建体的 C 端组氨酸标签与结合细胞的构建体特异性结合。之后进行洗涤步骤以去除未结合的鼠 Penta His 抗体。用 1:100 稀释于含 2% FCS 的 50 μ l PBS 的缀合有藻红蛋白的 Fc γ 特异性抗体(Duanova)检测结合的抗 His 抗体。新鲜培养基用作阴性对照替代培养物上清液。

通过流式细胞术在 FACS-Calibur 仪器(Becton Dickinson, Heidelberg)上分析细胞。如 Current Protocols in Immunology(Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach 和 Strober, Wiley-Interscience, 2002)所述进行 FACS 染色和荧光强度测定。几种结构域排列的结合能力如 WO2004/106381 所示清晰地可检测到。在 FACS 分析中,具有 CD19 和 CD3 特异性的 VH 和

VL 结构域不同排列的所有构建体与用培养基和 1、2 检测抗体的阴性对照相比都显示与 CD3 的结合。在表 1 提到的构建体中观察到强结合活性造成的荧光强度变化 $>5 \times 10^1$ 。

4. CD19 和 CD3 双特异性单链抗体的生物活性

用基于荧光色素释放的细胞毒活性测定法测定 VH 和 VL 结构域重排的双特异性抗体的细胞毒活性。CD19 阳性 NALM-6 细胞用作靶细胞 (1.5×10^7 个)，其于 37°C 在细胞培养基中用 10 μ M 钙黄绿素 AM (Molecular Probes, Leiden, Netherland, 编号 C-1430) 标记 30 分钟。在细胞培养基中洗涤两次之后，对细胞进行计数并与 CD4 阳性 T 细胞克隆 CB15 细胞 (德国 University of Erlangen/Nuernberg 的 Fickenscher 博士惠赠) 混合。每毫升混合 2×10^6 个 CB15 细胞和 2×10^5 个 NALM-6 细胞 (E:T = 1:10) 并且 96 孔圆底板的每个孔中使用 50 μ l 此悬液。将抗体在 RPMI/10% FCS 中稀释到所需浓度并将 50 μ l 此溶液加到细胞悬液中。在 37°C/5% CO₂ 中孵育标准的反应 2 小时。细胞毒性反应之后，孵育培养基中释放的染料可在荧光读数器中 (Tecan, Crailsheim, 德国) 定量并与对照反应 (不含双特异性抗体) 的荧光信号和全部裂解细胞的荧光信号 (在 1% 皂苷中孵育 10 分钟) 比较。在这些读数的基础上，根据下式计算比细胞毒性: [荧光值 (样品) - 荧光值 (对照)]: [荧光值 (全部裂解) - 荧光值 (对照)] $\times 100$ 。

Prism 软件 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) 确定的 S 形剂量反应曲线一般具有 >0.97 的 R² 数值。由分析程序计算的 EC₅₀ 值用于比较生物活性。

如 WO2004/106381 所示，所有构建体针对表达 CD19 的 NALM-6 细胞显示细胞毒性。在上文表 1 所示的构建体中检测到了 EC 50 值 < 500 pg/ml 的最强生物活性。

实施例 2:

在 B 细胞淋巴瘤患者中临床应用 bscCD19 \times CD3

在批准的应用中，患有 B 细胞衍生的慢性淋巴白血病(B-CLL)的患者（女性，1937 年生）如 WO 99/54440 中详述用双特异性单链抗体 bscCD19×CD3(SEQ ID NO.2)治疗。FACS 分析显示患者的 95%的外周血细胞为 CD19 阳性细胞，而 77%的细胞表达 CD20 抗原。将患者的外周血细胞与 bscCD19×CD3 孵育显示了 CD19 阳性 B 细胞的显著耗竭。为防止任何急性细胞因子反应和肿瘤裂解并发症，给患者施用预防的 IV 剂量的 2 mg 氯马斯汀(Tavegil®)和 200 mg 西咪替丁(Tagamet®)以及 300 mg 别嘌醇和 20 mg 奥美拉唑(Antra®)。

患者初次给药为 20 分钟输注溶于含 5%人血清白蛋白(HSA)的等渗磷酸盐缓冲液的 3µg bscCD19×CD3。在输注过程中患者不显示任何不良反应。输注后大约 1 小时患者发冷约 5 分钟然后出汗，血压适度降低约 10 mm Hg 和体温适度增加(+ 0.5℃)数小时。此外，她的头痛症状轻度恶化。患者用另外的 2 mg Tavegil®和 200 mg Tagamet®、250 mg 强的松龙(Solu-Decortin®)和 50 mg 哌替啶(Dolantin®)治疗。所有症状都在同一天得到释放，而没有后遗症。

一天后在上述相同条件下施用第二剂，为 10µg bscCD19×CD3。输注后大约 1 小时患者明显发冷、发烧(39.2℃)、轻度喘气和低血压反应。患者用 2 mg 氯马斯汀、200 mg 西咪替丁、300 mg Solu-Decortin 和 15 mg 氟苯双哌酰胺(Dipidolor®)治疗。为稳定她的心血管功能，患者接受多巴胺输注并进行容积替换。此治疗之后症状显著减少。

接下来的 3 天中，患者继续为微热体度（大约 37.2℃），在第二剂给药后 1 天出现轻微的胸膜积液和下端轻度浮肿。

第二剂施用 bscCD19×CD3 之后的 1 天和 4 天进行脾、5 个腹淋巴结和腋淋巴结的超声检查。10µg 剂量给药之后的 1 天淋巴结和脾与治疗前的淋巴结和脾相比已经缩小大约 20 %。此观察在第二次超声评价中得到了验证。脾的重量降低了 350 g（从治疗前的 1630 g 降低到治疗后的 1280 g）。

在治疗过程中和之后的几天中，白细胞（包括大多数恶性 B 细胞）的数量减少。C 反应蛋白(CRP)为反映 T 细胞活化和促炎细胞因子效应的急

性期反应蛋白。其在施用 10 μ g bscCD19 \times CD3 之后显著增加，之后在接下来的 3 天观察中持续减少。

在施用化合物之前和施用化合物之后的多个间隔期测定反映施用化合物之后急性免疫反应的血清细胞因子水平。根据制造商的说明通过定量 ELISA 测定法测定血清细胞因子水平。施用 bscCD19 \times CD3 之后的第一个小时内肿瘤坏死因子 TNF- α 以剂量依赖的方式显著增加。白细胞介素 6(IL-6) 和白细胞介素 8(IL-8) 也表现显著和剂量依赖的增加。它们的最高水平在施用 bscCD19 \times CD3 之后 2-4 小时观察到。

总之，bscCD19-CD3 可安全地给患有顽固性 B-CLL 的患者施用。虽然不利的副作用很可能是由于观察到的细胞因子释放，但是 3 μ g 和 10 μ g 剂量的 bscCD19 \times CD3 的耐受性是可以接受的并可通过预防性测定和症状的治疗很好地控制。重要的是，如超声检查所示 bscCD19 \times CD3 造成患者之前变大的脾和淋巴结的缩小。既然脾和淋巴结的增大由于恶性 B 细胞浸润造成，那么缩小反映了由于施用 bscCD19 \times CD3 造成恶性 B 细胞的破坏。

实施例 3:

剂量递增 I 期研究-患者 0202

这个剂量递增 I 期研究的目的是研究复发的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 患者肿瘤靶组织中免疫活性变化的剂量依赖性。为此目的，给每一位患者静脉内施用 6 次抗 CD19 \times 抗 CD3 双特异性抗体 (SEQ ID NO. 2; 也见于 WO 99/54440)，在第 0, 2, 7, 9, 14 和 16 天的每周一次或两次的治疗方案中超过 4 小时施用。在个体内以下列剂量逐渐增加抗 CD19 \times 抗 CD3 抗体的剂量：1、2、4、7、10 和 13 微克/平方米体表面积。

收集施用过程之前和过程中的全血样品以评价增加 bscCD19 \times CD3 剂量对循环淋巴细胞亚群的数量和分布的影响。通过血细胞分类计数分析法测定淋巴细胞的总数并通过 FACS 分析测定淋巴细胞亚群的数量，并如实施例 2 所述表述为总淋巴细胞百分数。特别地，通过流式细胞仪 (FACS) 测定了外周血单核细胞中 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞数量。

如图 1 例示的完成药物治疗期的一位患者（即患者 0202），即使施用最低起始剂量的双特异性抗体，在 4 小时的输注期间内仍观察到 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞数量（以总淋巴细胞百分数显示）的骤然降低。T 细胞数量在 24-38 小时恢复到大约给药前的数值。在本研究包括的其它患者中观察到 T 细胞计数的类似曲线进程。这种降低的一种解释为 T 细胞和其它活化的淋巴细胞突然黏附和至少部分地迁移到组织中。一种假设是大量活化的 T 细胞群体（人 T 细胞库的大约 80%在任何时间都停留在外周血中）的此种突然活化和迁移造成 T 细胞稳态失调以及组织中局部细胞因子组成的破坏。确实地，根据图 1 所示的方式给患者施用药物导致不利的副作用。这个结果表明 T 细胞的逐步活化和迁移更接近生理免疫反应并可避免如局部细胞因子网络骤然失调和由此造成不利副作用的现象。

实施例 4:

I 期临床试验-患者 1003

在另一个临床试验中，在顽固性情性或迅速蔓延性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B NHL)和 B 细胞白血病患者中检测反复静脉内输注双特异性单链抗 CD19 × 抗 CD3 抗体（SEQ ID NO.2；也见于 WO 99/54440 中）的安全性、最大耐受剂量和最佳生物剂量。在研究的第 0、2、4、14、16 和 18 天给每一位患者输注 6 次抗 CD19 × 抗 CD3 抗体超过两个小时或超过四个小时。共 15 位患者用 3.0 μ g/m²的剂量治疗。

在施用药物之前或者施用过程中的不同时间点取血液样品以跟踪生物化学的、血液学和免疫学参数。如上所述测定 T 细胞数量。此外，使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)和流式细胞小球微阵列术(CBA)测定患者细胞因子的血清水平。

当监测受治疗的患者中的 T 细胞数量时，每一次输注之后观察到 T 细胞数量的剧烈波动，表明也观察到了以前的研究中的短期、突发样的 T 细胞活化；见实施例 3。此外，如图 2-5 所示的一例诊断为套细胞淋巴瘤(MCL)的患者（即患者 1003），经输注双特异性抗体后，在治疗的患者中发现

TNF α 、干扰素 γ 、白细胞介素-6 和白细胞介素-10 的剧烈细胞因子释放。在施用初次剂量后的细胞因子释放强度最高，随后输注抗 CD19 \times 抗 CD3 双特异性抗体的反应降低（首剂效应）。6 次输注之后几乎没有观察到细胞因子水平的诱导。如实施例 3 所示的研究，突然的 T 细胞活化和细胞因子释放导致对患者的不利的副作用。这些事件中的大多数具有温和或者适度的严重性，并且所有都是暂时的。最经常观察到血液参数和凝固参数的实验室异常，同样时暂时的，并且大多在性质和临床显著性上是温和到适度的。在本研究中获得的结果表明较渐进的 T 细胞活化是避免如上述临床试验中观察到的局部细胞因子网络骤然紊乱的现象所必需的。

实施例 5:

1. 用抗 CD19 \times 抗 CD3 双特异性单链抗体(SEQ ID NO. 2)连续输注治疗非霍奇金淋巴瘤(B NHL)患者的研究

通过长期输注施用化合物来评价抗 CD19 \times 抗 CD3 双特异性单链抗体（bscCD19 \times CD3；SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列）的安全性和耐受性。两例复发的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B NHL)患者示于下文的第 2 部分和第 3 部分（患者#105003 和患者#102003）。在治疗的第一天，两个患者以连续静脉内输注（i.v.）接受“初始暴露剂量”的 5 μ g/m²/24 小时的抗 CD19 \times 抗 CD3 双特异性抗体。之后将剂量逐渐增加到 15 μ g/m²/24 小时的“维持剂量”，所述剂量在余下的 2 周（患者#102003）或 4 周（患者#105003）的输注期间内以连续静脉内输注施用。所研究药物的日剂量在 500 ml 含 5 % HAS 的等渗 NaCl 溶液中施用。开始输注双特异性抗体之前每一位患者接受浓度为 1 x 100 mg 的糖皮质激素（甲基强的松龙）的联合治疗(i.v.) 1 小时以抑制输注初始阶段的细胞因子释放。

本实施例 5 的第 4 部分提供了用“初始暴露剂量”（0.5-5 μ g/m²/24 小时）和 15 μ g/m²/24 小时的“维持剂量”治疗的患者的其它概括数据。

2. 诊断为滤泡性淋巴瘤(B 细胞非霍奇金淋巴瘤)的患者#105003

这位 44 岁的男性患者在 2000 年诊断为滤泡性淋巴瘤。患者以前接受多次化疗(CHOP; Bendamustin)和免疫治疗(利妥昔单抗; 抗 CD20 单克隆抗体)。参与两年的接种试验后疾病一度更加严重。2005 年秋季, 患者经历骨髓浸润, 造成贫血; 肺浸润引起呼吸机能损伤。此外, 这位患者的生活质量由于 B-症状(脾大、夜间盗汗增加和 3 周体重下降 3 kg)的恶化明显降低。这种临床状况使新的疗法成为必需。

在下文中, 患者如上文详述连续输注 4 周以 $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时的剂量水平接受抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体(SEQ ID NO.2)。治疗从 2005 年 10 月 3 日开始并且很好的耐受, 即没有观察到显著不利的副作用。

2.1 抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体引起的 T 细胞活化和增殖

用下面 4 种不同抗体或表面标志物组合染色之后通过四色流式细胞术分析根据研究方法在不同时间点的患者 #105003 外周血样品中的单核细胞:

第 1 组: CD2 × CD3 × CD4 × CD8 (T 细胞)

第 2 组: CD3 × CD16 × CD19 × CD56 (淋巴细胞计数: B 细胞、T 细胞和 NK 细胞)

第 3 组: CD8 × CD25 × CD69 × HLA-DR (CD8⁺ T 细胞活化)

第 4 组: CD8 × CD28 × CD45RA × CCR7 (CD8⁺ T 细胞亚群)

由第 2 组计算绝对淋巴细胞亚群 (即分别定义为 CD19⁺/CD3⁻、CD3⁺和 CD3⁻/CD56⁺ 细胞的 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞) 数, 表示为 (B 细胞、T 细胞或 NK 细胞) / (%B 细胞 + %T 细胞 + %NK 细胞) 乘以常规试验测定的各个血液样品的总淋巴细胞数。由第 1 组计算绝对 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞数, 分别表示 %CD3⁺CD4⁺CD8⁻ 细胞 / %CD3⁺ 细胞 或者 %CD3⁺CD4⁻CD8⁺ 细胞 / %CD3⁺ 细胞, 乘以由第 2 组计算的绝对 T 细胞数。CD8⁺ T 细胞亚群的绝对细胞计数通过从第 4 组获得的下列百分数比例乘以从第 2 组计算的绝对 CD8⁺ T 细胞计数来计算:

%CD8⁺CD45RA⁺CD28⁺ 细胞 / %CD8⁺ 细胞 (对应于幼稚 CD8⁺ T 细胞),

%CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁺ 细胞 / %CD8⁺ 细胞 (对应于中枢记忆 CD8⁺ T 细胞=

T_{CM}),

$\%CD8^+CD45RA^-CCR7^+$ 细胞/ $\%CD8^+$ 细胞(对应于效应记忆 $CD8^+$ T 细胞= T_{EM}), 和

$\%CD8^+CD45RA^+CD28^-$ 细胞/ $\%CD8^+$ 细胞(对应于终末分化的 CTL(细胞毒性 T 细胞) = $CD45RA$ 阳性效应记忆 $CD8^+$ T 细胞 = T_{EMRA})。

此患者中的 T 细胞活化测定为表达所有 $CD8^+$ T 细胞的细胞表面活化标志物 $CD25$ 、 $CD69$ 或 $HLA-DR$ (流式细胞术的第 3 组) 的 $\%CD8^+$ T 细胞。

首先, 分析了 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞计数。如图 6 所示, $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞从开始输注抗 $CD19 \times$ 抗 $CD3$ 双特异性单链抗体之后很大程度上从外周血消失, 其解释为 T 细胞通过抗 $CD19 \times$ 抗 $CD3$ 双特异性单链抗体介导的外周血 T 细胞和 B 细胞交联引发的分布。然而, 治疗半周之后, $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞在血液中重新出现并进一步增加数量分别直到第 7 天和第 21 天。与它们的初始值相比, $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞在血液中显示 3.5-4 倍的扩增。 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞计数在治疗第 2 周和第 3 周期间和第 4 周治疗 T 细胞数量开始减少之前居高不下。如下文所述当诊断实质的肿瘤缩小满足部分的反应标准时, 输注抗 $CD19 \times$ 抗 $CD3$ 双特异性单链抗体 4 周之后 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞计数仍然高于相应的治疗前数值。

接下来, 更加详细地分析了 $CD8^+$ T 细胞亚群。如图 7 所示, $CD8^+$ T 细胞亚群分析表明, 效应记忆亚群 TEM 几乎专门地负责由抗 $CD19 \times$ 抗 $CD3$ 双特异性单链抗体诱导的 $CD8^+$ T 细胞的增殖。 $CD8^+$ T 细胞负责所有 T 细胞中大多数的细胞毒活性, 并且 TEM-细胞和 TEMRA 亚群一起负责 $CD8^+$ T 细胞中的大多数细胞毒活性。除了 TEM-亚群外, 在其它 $CD8^+$ T 细胞亚群间未能观察到细胞计数上的显著变化, 如幼稚 T 细胞不能基于抗 $CD19 \times$ 抗 $CD3$ 双特异性单链抗体提供的单个活化信号增殖, 或者 TEMRA-亚群完全不能增殖。因此, 能增殖的 $CD8^+$ TEM 细胞的选择性增殖可以明确地归因于应答肿瘤内受抗 $CD19 \times$ 抗 $CD3$ 双特异性单链抗体修饰的 $CD8^+$ TEM 细胞与 B 淋巴瘤细胞接触的细胞分裂和增殖; 也见图 14。

由于循环性 B 淋巴瘤细胞在第 3 天、即在观察 T 细胞增殖前已经从外周血中耗竭，所以可以排除血液中循环性抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体修饰的 B 淋巴瘤细胞对 T 细胞增殖的显著贡献。

最后，分析了 CD8⁺ T 细胞的活化，因为 T 细胞活化的标记物如图 8 所示。在高度活化 CD8⁺ T 细胞之后 CD8⁺ T 细胞增殖，其中 CD8⁺ T 细胞的高度活化通过持续上调的活化标记 HLA-DR 表示。其它活化标记例如 CD69 和 CD25 仅在起始输注本发明构建体后显示短暂的上调，这可以通过外周血中循环性抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体修饰的 B 淋巴瘤细胞的活化来解释，因为循环性 B 淋巴瘤细胞在治疗的第一个 3 天期间就耗竭了。相反，超过 3 周持续上调 HLA-DR 反映了肿瘤内 CD8⁺ T 细胞通过与肿瘤固有 B 淋巴瘤细胞接触而引起的活化，其中所述的 B 淋巴瘤细胞受抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体的修饰。瘤内 T 细胞的活化导致肿瘤内的增殖性 T 细胞反应，进而导致 T 细胞增殖，这继而也出现在循环血中。这些在肿瘤中活化并迁移进入血液的 T 细胞仍然显示长期活化标记 HLA-DR，但短期活化标记 CD69 和 CD25 已经下调了。

作为结论，使用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体的治疗引起长期的 T 细胞活化和增殖。具细胞毒性表型的 T 细胞主要归因于 CD8⁺ T 细胞的增殖。T 细胞活化和增殖在肿瘤内由抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体修饰的 B 淋巴瘤细胞诱导。在输注的第三周期间 T 细胞活化减少、并且在第四周期间 T 细胞数减少可以通过抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体在这名患者中的效力来解释，这导致肿瘤在用抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体治疗 4 周后诊断为收缩 58.0%（见下文）、并因此降低了 B 淋巴瘤细胞总数，这能诱导由抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体介导的 T 细胞活化和增殖。

2.2 通过抗 CD19 × 抗 CD3 双特异性单链抗体消耗外周血 B（淋巴瘤）细胞

用针对下列四种细胞表面标志物的抗体组合染色之后根据标准的方法通过四色流式细胞术分析在不同时间点直到最佳临床反应获取的研究患者 #105003 的外周血样品的单核细胞：CD3（T 细胞标志物）× CD16（NK 细

胞/巨噬细胞标志物) × CD19 (B细胞标志物) × CD56 (NK细胞标志物)。

分别定义为 $CD19^+/CD3^-$ 、 $CD3^+$ 和 $CD3^-/CD56^+$ 细胞的淋巴细胞亚群即 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞的绝对细胞计数通过 $\%(B、T \text{ 或 } NK \text{ 细胞})/(\%B + \%T + \%NK \text{ 细胞})$ 乘以常规实验室测定的各个血液样品的总淋巴细胞计数计算。因此，B (淋巴瘤) 细胞的绝对数量计算为 $CD19^+/CD3^-$ 细胞的总数。

如图 9 所示，患者以治疗前大约每毫升血液 140 个 B (淋巴瘤) 细胞开始。在开始输注抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体后，循环性 B (淋巴瘤) 细胞在治疗的第一个 3 天内迅速下降，并最终在第一周治疗末完全从外周血中消失。此外，B (淋巴瘤) 细胞保持在外周血中不存在，直至在治疗 4 周后诊断到部分的反应；见下文。这些数据表明，由于抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体对所述细胞的细胞毒活性，所以其能够完全清除循环性 B (淋巴瘤) 细胞。

2.3 通过抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体减小淋巴瘤的尺寸

使用非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 反应评价的标准化反应标准评价抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体治疗的功效。根据这些标准需要选择 6 个代表性淋巴瘤病灶。将淋巴瘤病灶最大横截面直径的产物总和定义为基线 SPD (Sum Product Diameters)。然后用此 SPD 的变化评价整个治疗过程中和研究后期的规律基础 (regular base)。例如，部分的反应定义为 SPD 降低 50% 或者以上。如图 10 所示，治疗 4 周之后的再分期 (restaging) 发现根据上文所述的 NHL 反应评价淋巴瘤块明显减小：诊断到 6 个参考淋巴瘤病灶中 58% 的 SPD 降低，对应于 X 射线计算机断层术 (CT) 评价的肿瘤反应中的部分的反应 (PR)。用抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体治疗 8 周后通过 X 射线计算机断层术验证了部分的反应，显示了 66% 的肿瘤缩小 (SPD)。

3. 诊断为小淋巴细胞性淋巴瘤 (B-CLL) 的患者 #102003

这例 60 岁的男性患者在 1999 年 4 月诊断为小淋巴细胞性淋巴瘤。在患者病史的相关发现有睡眠呼吸暂停综合征、急性肾功能衰竭、带状疱疹、间歇性支气管炎和间歇性肝病。患者有多次化疗（苯丁酸氮芥、氟达拉滨、Knospe、环磷酰胺）、免疫治疗（利妥昔单抗；抗 CD20 单克隆抗体）和腹部区放疗的历史。

在 7 年的病史中，患者接受 7 种不同的化疗方案以及利妥昔单抗作为单一疗法或联合疗法以及未显示任何主要反应的放疗。

施用抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体是此患者的第 13 种治疗方案。患者以上文详述的连续输注以 $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时的剂量接受抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体(SEQ ID NO.2) 2 周。治疗从 2005 年 5 月 9 日开始。治疗后两周发生了完全的再分期，其结果在下文展示。

3.1 抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体引起的外周血 B（淋巴瘤）细胞耗竭

如上文 2.2 部分所述确定 B 细胞数。如图 11 所示，治疗前患者每毫升血液中有 920 个 B（淋巴瘤细胞）细胞。开始输注抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体之后，循环 B（淋巴瘤）细胞迅速下降，之后是最初 3 天内有限恢复到每毫升 600 个细胞的暂时阶段，这与细胞重新分布一致。在进一步的治疗过程中，B（淋巴瘤）细胞从循环中完全耗竭直到治疗两周后诊断为部分的反应。这些数据证明作为其部分的临床功效，抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体能完全消除循环的 B（淋巴瘤）细胞。

3.2 抗 CD19×CD3 双特异性单链抗体消除骨髓的淋巴瘤浸润

此外，在用抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体治疗前和治疗后进行骨髓组织病理学实验。如图 12 左图所示，治疗前可观察到小淋巴细胞性淋巴瘤 40-50%的骨髓浸润。证明了小淋巴细胞性淋巴瘤/CLL 的诊断。

如图 12 右图所示，用抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体治疗后没有发现明显的小淋巴细胞性淋巴瘤浸润，而观察到 T 细胞的显著增加。这些

数据表明抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体从骨髓中消除了淋巴细胞，其中所述淋巴细胞在检测限下。这个发现与完全骨髓反应一致，这例如在常规化疗下是难以实现。

3.3 抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体引起的淋巴瘤大小降低

此外，在 2 周治疗后的再分期观察到淋巴瘤块明显减小：如图 13 所示，X 射线计算机断层术(CT)诊断到 6 个参考淋巴瘤病灶的大小降低了 57.2%，对应于肿瘤反应评价中的部分的反应(PR)。

在 7 年的病史中，患者接受 7 种不同的化疗方案以及免疫疗法和放疗，没有显示任何主要的反应，第一次用抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体治疗患者提供了一个成功的治疗法，因为实现了参考淋巴瘤病灶缩小 50% 以上。

4. 临床数据总结

根据经典的 3+3 剂量递增方案以 $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时的初始剂量治疗复发的惰性 NHL 的患者。开始施用类固醇以缓解提到的细胞因子释放症状。通过 CTC-AE (常见不良事件标准) 评价安全性和耐受性。NCI (美国国家癌症研究所) 常见不良事件标准为可用于不良事件 (AE) 分类的描述性术语。为每一种 AE 标准提供了分级 (严重性) 范围、并且只在数据查看委员会 (data review committee) 从 14 天的具有 DLT (剂量限制性毒性 (dose limiting toxicity)) 的先前剂量所总结的安全性后才允许剂量提高。通过用特异性 ELISA 研究体内细胞因子水平以及通过 FACS 分析对外周免疫细胞进行定量和描述监测生物学活性。抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体治疗 4 周之后进行对照 CT (X 射线计算机断层术) 扫描。如果根据标准化的 Cheson 标准 (由中心放射科调查) 患者至少是稳定的，那么对患者再进行额外的 4 周抗 CD19×抗 CD3 双特异性单链抗体周期。Cheson 标准由国家癌症研究所和国际药理学工业会建立来提供评价 NHL 临床反应的指导。根据这个标准，当所有疾病和疾病相关症状的可检测临床和放射迹象完全消

失，所有的淋巴结恢复正常大小，脾恢复大小和骨髓中没有淋巴瘤时获得了完全的反应。对部分的反应来说，6个最大的明显淋巴结的大小必需降低50%，其它淋巴结、肝和脾的大小不增加，脾结节、肝结节必需缩小至少50%并且必需没有新的疾病位置。

至今，已经包括了具有4个之前的化学疗法/免疫疗法的中位数的19名患者。在从DL1(0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时)(DL=剂量水平)至DL3(5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时)的剂量扩大期间，观察到剂量限制性毒性，并且AE(副作用)通常为中等的。在DL4(第一天5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时，维持剂量15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时)，治疗了7名患者，其中的2位接受少于14天的治疗(1 DLT，每次调查人决定时中断1次)。

在14名可评估患者(治疗>2周，并且在输注抗CD19×抗CD3双特异性单链抗体之前，外周血中的B细胞是可检测的)中，有9名在结束CD19×CD3双特异性单链抗体输注后观察到循环性B(淋巴瘤)细胞完全耗竭。在DL4，剂量依赖性增加的频率达到100%。在DL4，7名患者中的3名具有相关的骨髓(BM)浸润(>10%)，其中1名患者显示改善，并且2名患者显示淋巴瘤细胞从BM完全消失。在14名评估患者(治疗>2周，并且扫描所有相关区域)中，最好的整体肿瘤反应(overall tumour response)为1名CR(在患者#109002中完全的反应，所述患者为诊断为滤泡性淋巴瘤1级、IIIa期的61岁男性患者)、2名PR(部分的反应)、1名MR(小的反应(minor response))、7名SD(稳定的疾病)和3名PD(恶化的疾病)。特别地，患者#109002显示了进一步给人深刻印象的结果，即完全消除(CR)；见图14-16。这种完全的消除在所述患者中通过4周在治疗第一天5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时的初始剂量和15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时的后继剂量实现。这4周之后，患者#109002显示部分的反应，并且患者立即接受另外4周进一步的15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 小时剂量，进而导致完全的反应。

不受下文限制，本领域如下定义“完全的反应”、“部分的反应”、“恶化的疾病”和“小的反应”：

如果通过CT成像和其它测试检测不到病灶，那么就通常称为完全的

反应。如果 CT 成像和骨髓测试显示没有疾病迹象，那么其就更加严格地定义了完全的反应。

部分的反应描述其中检测到可测定肿瘤负荷至少下降 50%的疗法的反应。

当患者经历症状（发烧、夜间出汗等）、并且当淋巴结大小增加或者观察到新扩大的淋巴结，那么就认为其患有恶化的疾病。

当患者不经历症状、并且当淋巴结不增长、或者观察到在退化，那么就认为其患有稳定或退化的疾病。有时将这种病症或该疾病在临床上观察到的不活动性描述为缓解。

“小的反应”大致表示小量的收缩。小的反应不是真正标准的术语，但其越来越多地被使用。大致说来，小的反应是高于肿瘤总体积的 25%但低于 50%，后者为部分的反应（PR）。

<110> 麦克罗梅特股份公司
 <120> 治疗肿瘤性疾病的方式和方法
 <130> L1410 PCT S3
 <160> 45
 <170> PatentIn 版本 3.3
 <210> 1
 <211> 1587
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 双特异性 scFv CD 19 x CD3
 <400> 1
 gaattccacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt 60
 ccaactccgat atccagctga cccagtctcc agcttctttg gctgtgtctc tagggcagag 120
 ggccaccatc tcctgcaagg ccagccaaag tgttgattat gatggtgata gttatttgaa 180
 ctggtaccaa cagattccag gacagccacc caaactcctc atctatgatg catccaatct 240
 agtttctggg atcccaccca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact tcaccctcaa 300
 catccatcct gtggagaagg tggatgctgc aacctatcac tgtcagcaaa gtactgagga 360
 tccgtggacg ttcggtggag ggaccaagct cgagatcaaa ggtggtggtg gttctggcgg 420
 cggcggctcc ggtggtggtg gttctcaggt gcagctgcag cagtctgggg ctgagctggt 480
 gaggcctggg tcctcagtga agatttctct caaggcttct ggctatgcat tcagtagcta 540
 ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acagggtctt gagtggattg gacagatttg 600
 gcctggagat ggtgatacta actacaatgg aaagttcaag ggtaaagcca ctctgactgc 660
 agacgaatcc tccagcacag cctacatgca actcagcagc ctagcatctg aggactctgc 720
 ggtctatttc tgtgcaagac gggagactac gacggtaggc cgttattact atgctatgga 780
 ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctccgga ggtggtggat ccgatatcaa 840
 actgcagcag tcaggggctg aactggcaag acctggggcc tcagtgaaga tgcctgcaa 900
 gacttctggc tacaccttta ctaggtagac gatgcactgg gtaaaacaga ggctggaca 960
 gggctctggaa tggattggat acattaatcc tagccgtggt tataactaatt acaatcagaa 1020
 gttcaaggac aaggccacat tgactacaga caaatcctcc agcacagcct acatgcaact 1080
 gagcagcctg acatctgagg actctgcagt ctattactgt gcaagatatt atgatgatca 1140

```

ttactgcctt gactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcag tcgaaggtgg 1200
aagtggaggt tctggtggaa gtggagggtc aggtggagtc gacgacattc agctgaccca 1260
gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc accatgacct gcagagccag 1320
ttcaagtgta agttacatga actggtacca gcagaagtca ggcacctccc ccaaaagatg 1380
gatttatgac acatccaaag tggtctctgg agtcccttat cgcttcagtg gcagtgggtc 1440
tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct gaagatgctg ccacttatta 1500
ctgccaacag tggagtagta acccgctcac gttcgggtgct gggaccaagc tggagctgaa 1560
acatcatcac catcatcatt agtcgac 1587

```

<210> 2
<211> 523
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 双特异性 scFv CD 19 x CD 3

<400> 2

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15

```

```

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val
          20           25           30

```

```

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
          35           40           45

```

```

Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
          50           55           60

```

```

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly
65           70           75           80

```

```

Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
          85           90           95

```

```

Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln
          100           105           110

```

```

Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
          115           120           125

```

```

Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

```

130 135 140
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser
 165 170
 Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 180 185 190
 Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
 195 200 205
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
 210 215 220
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 225 230 235 240
 Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met
 245 250 255
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro
 275 280 285
 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 290 295 300
 Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 305 310 315 320
 Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln
 325 330 335
 Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 340 345 350
 Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 355 360 365
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly

370 375 380

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly
385 390 395 400

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr
405 410

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
420 425 430

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
435 440 445

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val
450 455 460

Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
465 470 475 480

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
485 490 495

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
500 505 510

Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His His
515 520

<210> 3

<211> 1533

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> CD 19 VH/VL x CD3 VH/VL (BsrG I 至 Sal I)

<400> 3

tgtacactcc caggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc 60

agtgaagatt tcttgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt 120

gaagcagagg cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttggcctg gagatgggtga 180

tactaactac aatggaaagt tcaagggtaa agccactctg actgcagacg aatcctccag 240

cacagcctac atgcaactca gcagcctagc atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc 300

aagacgggag actacgacgg taggccgtta ttactatgct atggactact ggggccaaagg 360

gaccacgggc accgtctcct ccggtggtgg tggttctggc ggcggcggct ccggtggtgg 420
tggttctgat atccagctga cccagtctcc agcttctttg gctgtgtctc tagggcagag 480
ggccaccatc tcctgcaagg ccagccaaag tgttgattat gatggtgata gttatttgaa 540
ctggtaccaa cagattccag gacagccacc caaactcctc atctatgatg catccaatct 600
agtttctggg atcccaccca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact tcaccctcaa 660
catccatcct gtggagaagg tggatgctgc aacctatcac tgtcagcaaa gtactgagga 720
tccgtggacg ttcggtggag ggaccaagct cgagatcaaa tccggaggtg gtggatccga 780
tatcaaactg cagcagtcag gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 840
ctgcaagact tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 900
tggacagggc ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtgggtata ctaattacaa 960
tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat 1020
gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1080
tgatcattac tgccttgact actggggcca aggaccact ctcacagtct cctcagtcga 1140
agggtggaagt ggaggttctg gtggaagtgg aggttcaggt ggagtcgacg acattcagct 1200
gaccagctct ccagcaatca tgtctgcac cccaggggag aaggcacca tgacctgag 1260
agccagttca agtgtaagtt acatgaactg gtaccagcag aagtcaggca cctccccaa 1320
aagatggatt tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc ccttatcgtc tcagtggcag 1380
tgggtctggg acctcact ctctcacaat cagcagcatg gaggtgaag atgctgccac 1440
ttattactgc caacagtgga gtagtaacc gctcacgttc ggtgctggga ccaagctgga 1500
gctgaaacat catcaccatc atcattagtc gac 1533

<210> 4
<211> 505
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> CD 19 VH/VL x CD3 VH/VL (成熟的蛋白质 w/o 前导序列)

<400> 4

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35					40					45					
Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
50					55					60					
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Arg	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr
	130					135					140				
Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile
145					150					155					160
Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu
				165					170					175	
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
			180					185					190		
Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
		195					200					205			
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Lys	Val
	210					215					220				
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr
225					230					235					240
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				245					250					255	
Asp	Ile	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala
			260					265					270		
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr

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

<210> 5

<211> 1531
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> CD3 VH/VL x CD19 VH/VL (BsrG I 至 Sal I)

<400> 5

```

tgtacactcc gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc      60
agtgaagatg tcttgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcaactggg      120
aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatecta gccgtgggta      180
tactaattac aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag      240
cacagcctac atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc      300
aagatattat gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt      360
ctcctcaggt ggtggtgggt ctggcgggcg cggtccgggt ggtggtgggt ctgacattca      420
gctgaccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggtca ccatgacctg      480
cagagccagt tcaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag cagaagtcag gcacctcccc      540
caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtcccttacc gcttcagtgg      600
cagtggtgct gggacctcat actctctcac aatcagcagc atggaggctg aagatgctgc      660
cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg ttcggtgctg ggaccaagct      720
ggagctgaaa tccggaggtg gtggatccca ggtgcagctg cagcagtctg gggctgagct      780
ggtgaggcct gggtcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag      840
ctactggatg aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat      900
ttggcctgga gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag ccactctgac      960
tgacagcaga tctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc     1020
tgcggtctat ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggtg ggccgttatt actatgctat     1080
ggactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctcc ggtggtgggt gttctggcgg     1140
cggcggctcc ggtggtgggt gttctgatat ccagctgacc cagtctccag cttctttggc     1200
tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatctc ctgcaaggcc agccaaagtg ttgattatga     1260
tggtgatagt tatttgaact ggtaccaaca gattccagga cagccacca aactcctcat     1320
ctatgatgca tccaatctag tttctgggat cccaccaggt ttagtgga gtgggtctgg     1380
gacagacttc accctcaaca tccatcctgt ggagaagggt gatgctgcaa cctatcactg     1440
tcagcaaagt actgaggatc cgtggacggt cgggtggagg accaagctcg agatcaaata     1500
cgggcatcat caccatcacc attgagtcga c                                     1531

```

<210> 6
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> CD3 VH/VL x CD19 VH/VL

 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 130 135 140

 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160

 Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 165 170 175

 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
 180 185 190

 Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

	195		200		205														
Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp				
	210					215					220								
Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys				
	225				230					235					240				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu				
				245					250					255					
Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly				
			260					265					270						
Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly				
		275					280					285							
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr				
	290					295					300								
Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu				
	305				310					315					320				
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp				
				325					330					335					
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Arg	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Gly	Arg				
			340					345						350					
Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val				
		355					360						365						
Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly				
	370					375					380								
Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu				
	385				390					395					400				
Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr				
				405					410					415					
Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro				
			420					425					430						
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro				

435 440 445

Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
 450 455 460

His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser
 465 470 475 480

Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 485 490 495

Ser Gly His His His His His His
 500

<210> 7
 <211> 1528
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> CD3 VH/VL x CD19 VL/VH (BsrG I 至 Sal I)

<400> 7
 tgtacactcc gatatacaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc 60
 agtgaagatg tcctgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt 120
 aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta 180
 tactaattac aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag 240
 cacagcctac atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc 300
 aagatattat gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt 360
 ctctcaggt ggtggtggtt ctggcgccgg cggctccggt ggtggtggtt ctgacattca 420
 gctgaccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggtca ccatgacctg 480
 cagagccagt tcaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag cagaagtcag gcacctcccc 540
 caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtcccttata gcttcagtgg 600
 cagtgggtct gggacctcat actctctcac aatcagcagc atggaggctg aagatgctgc 660
 cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg ttcggtgctg ggaccaagct 720
 ggagctgaaa tccggaggtg gtggatccga tatccagctg acccagtctc cagcttcttt 780
 ggctgtgtct ctagggcaga gggccacat ctctgcaag gccagccaaa gtggtgatta 840
 tgatggtgat agttatttga actggtacca acagattcca ggacagccac ccaaactcct 900
 catctatgat gcatccaatc tagtttctgg gatcccacc aggttttagtg gcagtgggtc 960

tgggacagac ttcaccctca acatccatcc tgtggagaag gtggatgctg caacctatca 1020
 ctgtcagcaa agtactgagg atccgtggac gttcgggtgga gggaccaagc tcgagatcaa 1080
 aggtgggtggg ggttctggcg gcgggcggtc cggtgggtggg ggttctcagg tgcagctgca 1140
 gcagtctggg gctgagctgg tgaggcctgg gtcctcagtg aagatttctt gcaaggcttc 1200
 tggctatgca ttcagtagct actggatgaa ctgggtgaag cagaggcctg gacagggctt 1260
 tgagtggatt ggacagattt ggctgggaga tggtgatact aactacaatg gaaagttcaa 1320
 gggtaaagcc actctgactg cagacgaatc ctccagcaca gctacatgc aactcagcag 1380
 cctagcatct gaggactctg cggctctatt ctgtgcaaga cgggagacta cgacggtagg 1440
 ccgttattac tatgctatgg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctccgg 1500
 gcatcatcac catcatcatt gagtcgac 1528

<210> 8
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> CD3 VH/VL x CD19 VL/VH (成熟的蛋白质 w/o 前导序列)

<400> 8

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115	120	125																		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile					
130						135						140								
Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser					
145					150						155						160			
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser					
				165						170						175				
Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro					
			180						185						190					
Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile					
		195						200						205						
Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp					
		210						215						220						
Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys					
225					230						235						240			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser					
				245						250						255				
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser					
			260						265						270					
Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln					
			275						280						285					
Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu					
		290						295						300						
Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp					
305					310						315						320			
Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr					
				325						330						335				
His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr					
			340						345						350					
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly					

```

          355                360                365

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
   370                375                380

Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
  385                390                395

Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
          405                410                415

Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
          420                425                430

Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser
          435                440                445

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala
          450                455                460

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr
  465                470                475                480

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          485                490                495

Gly His His His His His His
          500

```

```

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

```

```

<220>
<223> CD3 CDR-H1

```

```

<400> 9

```

```

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
1          5                10

```

```

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

```

```

<220>
<223> CD3 CDR-H2

```

<400> 10

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

Asp

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> CD3 CDR-H3

<400> 11

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> CD3 CDR-L1

<400> 12

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> CD3 CDR-L2

<400> 13

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> CD3 CDR-L3

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗CD19 VH

<400> 15

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗CD19 VL

<400> 16

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
50 55 60

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

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

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

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗 CD3 VH

<400> 17

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

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

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

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

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗CD3 VL

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物 5'L1

<400> 19
gaagcagcgcg tagatatactt gmtaccacaa wctcca

<210>	20	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 3'K	
<400>	20	
	gaagatggat ccagcggccg cagcatcagc	30
<210>	21	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 5'H1	
<400>	21	
	cagccggcca tggcgcaggt scagctgcag sag	33
<210>	22	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 3'G	
<400>	22	
	accaggggcc agtggataga caagcttggg tgtcgtttt	39
<210>	23	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 5'VLB5RRV	
<400>	23	
	aggtgtacac tcctgatatc cagctgaccc agtctcca	38
<210>	24	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 3'VLGS15	

<400> 24 ggagccgccc cccagagaac caccaccttt gatctcgagc ttggtccc	48
<210> 25 <211> 53 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物 5'VHGS15	
<400> 25 ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggttct caggtsmarc tgcagsagtc wgg	53
<210> 26 <211> 39 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物 3'VHBspE1	
<400> 26 aatccggagg agacgggtgac cgtggtcctt tggccccag	39
<210> 27 <211> 38 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物 5'VLL2KBspEIGS	
<400> 27 cttccggagg tgggtgatcc gacattcagc tgaccag	38
<210> 28 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物 3'VHL2KBspEI (C端)	
<400> 28 cctccggagg agactgtgag agtgg	25
<210> 29 <211> 38 <212> DNA <213> 人工的	
<220>	

<223> 引物 5'VHCD19BspEIGS	
<400> 29	
cttccggagg tggatggatcc caggtgcagc tgcagcag	38
<210> 30	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 3'VLCD19BspEI (C 端)	
<400> 30	
cctccggatt tgatctcgag cttgg	25
<210> 31	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 5'VLCD19BspEIGS	
<400> 31	
cttccggagg tggatggatcc gatatccagc tgacc	35
<210> 32	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 5'VHL2KBsrGI	
<400> 32	
aggtgtacac tccgatatca aactgcagca g	31
<210> 33	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 3'VHL2KGS15	
<400> 33	
ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc tgaggagact gtgagagtgg	50
<210> 34	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工的	

<220>		
<223>	引物 5'VLL2KGS15	
<400>	34	
	ggcggcggcg gctccggtgg tggtggttct gacattcagc tgacccagtc tcc	53
<210>	35	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 3'VLL2KBspEI	
<400>	35	
	aatccggatt tcagctccag cttgg	25
<210>	36	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 5'VHCD19BsrGI	
<400>	36	
	aggtgtacac tcccaggtgc agctgcagca g	31
<210>	37	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 3'VHCD19GS15	
<400>	37	
	ggagccgcgcg ccgccagaac caccaccacc ggaggagacg gtgaccgtgg	50
<210>	38	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 5'VLCD19GS15	
<400>	38	
	ggcggcggcg gctccggtgg tggtggttct gatatccagc tgacccagtc tcc	53
<210>	39	
<211>	25	
<212>	DNA	

<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 3'VLCD19BspEI	
<400> 39	
aatccggatt tgatctcgag cttgg	25
<210> 40	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 5'VLL2KBsrGI	
<400> 40	
aggtgtacac tccgacattc agctgacca gtctc	35
<210> 41	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 3'VLL2KGS15	
<400> 41	
ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc tttcagctcc agcttggtcc	50
<210> 42	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 5'VHL2KGS15	
<400> 42	
ggcggcgccg gctccggtgg tgggtggttct gatatacaaac tgcagcagtc agg	53
<210> 43	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物 3'VHL2KBspEI	
<400> 43	
aatccggatg aggagactgt gagagtgggtg	30
<210> 44	

<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 3'VHCD19BspEI (C 端)	
<400>	44	
	cctccggagg agacggtgac cgtgg	25
<210>	45	
<211>	73	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 CTI 多接头	
<400>	45	
	tctagaattc ttcgaatccg gaggtggtgg atccgatatc cccgggcatc atcaccatca	60
	tcattgagtc gac	73

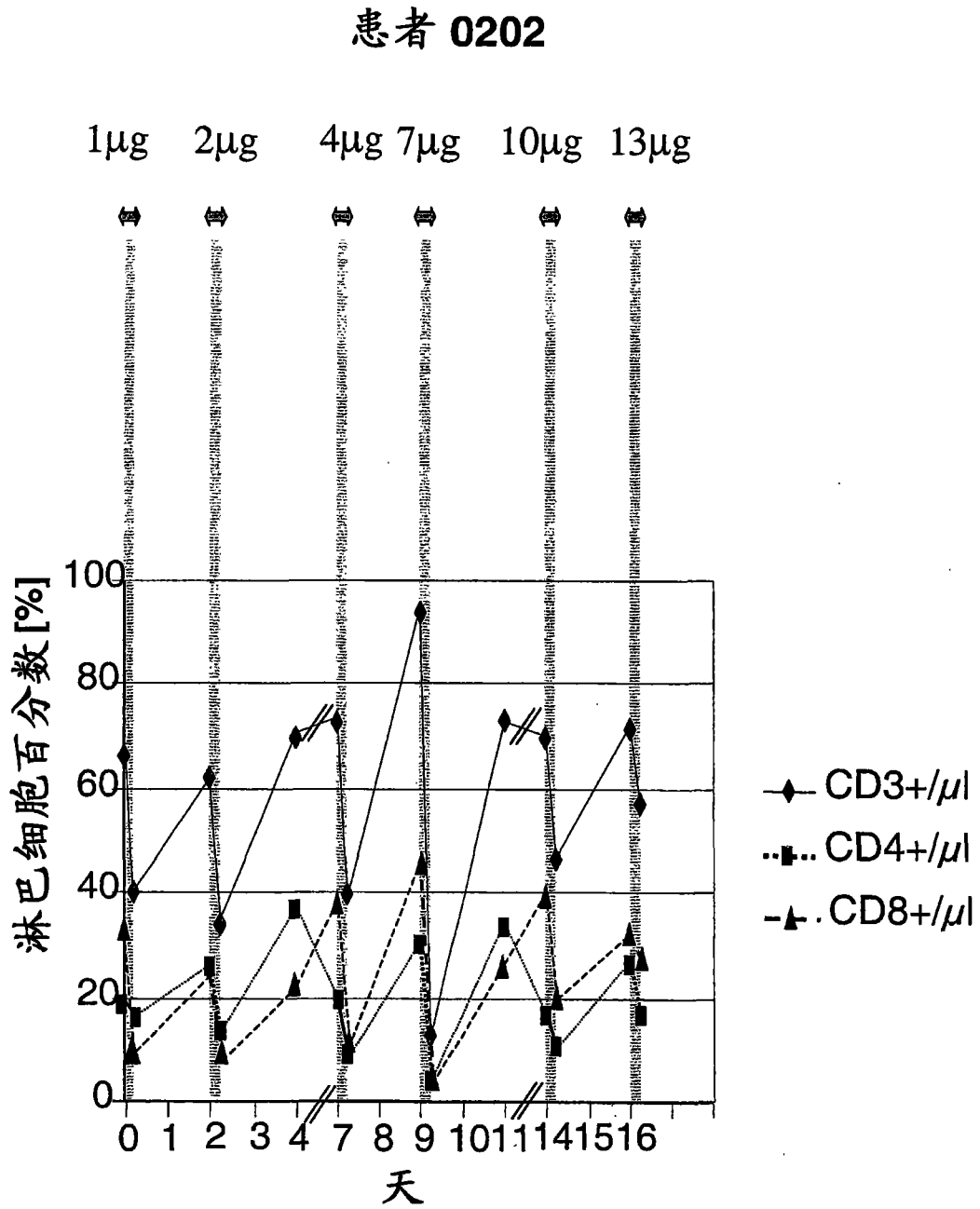


图 1

患者 1003/TNF- α

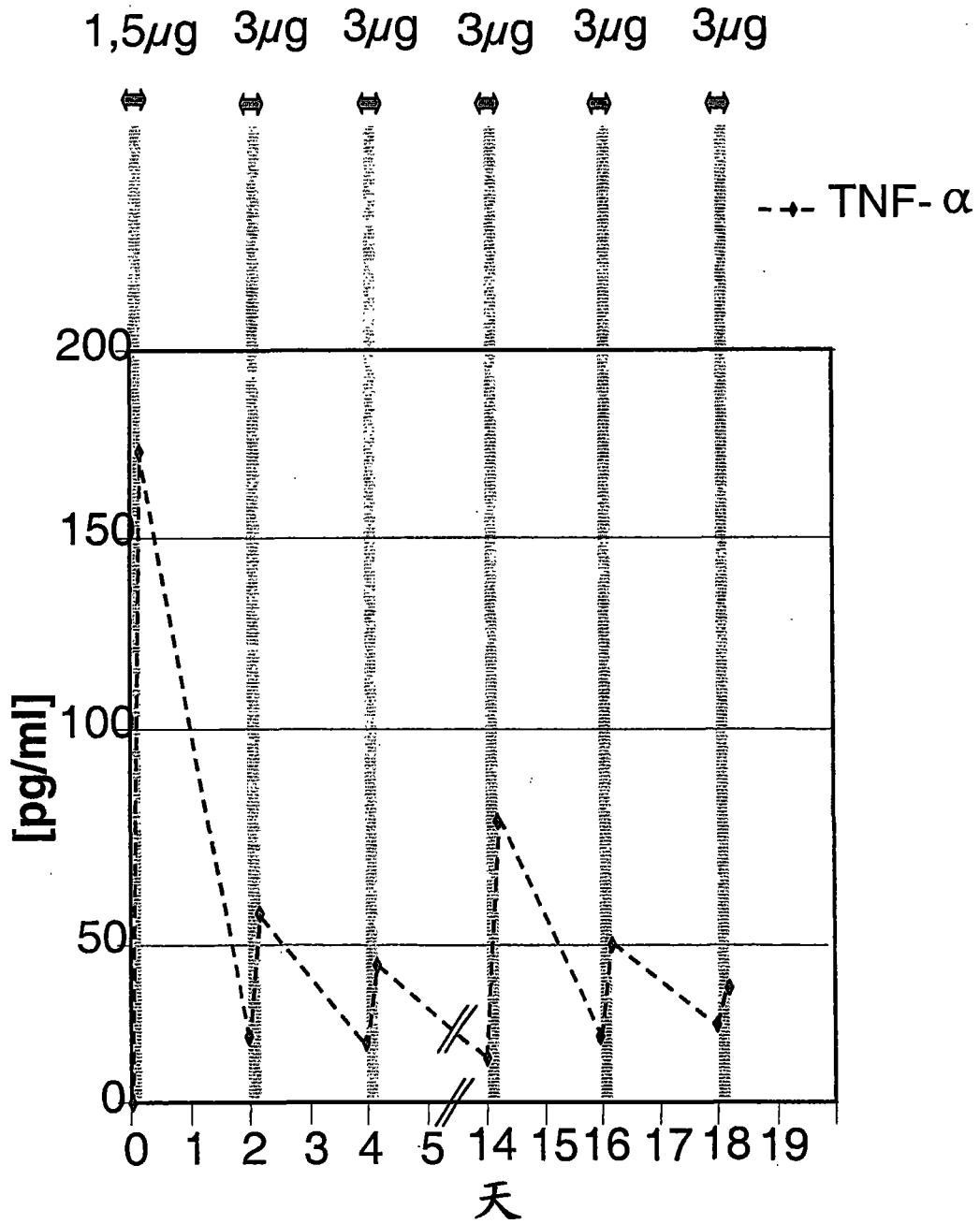


图 2

患者 1003/IFN- γ

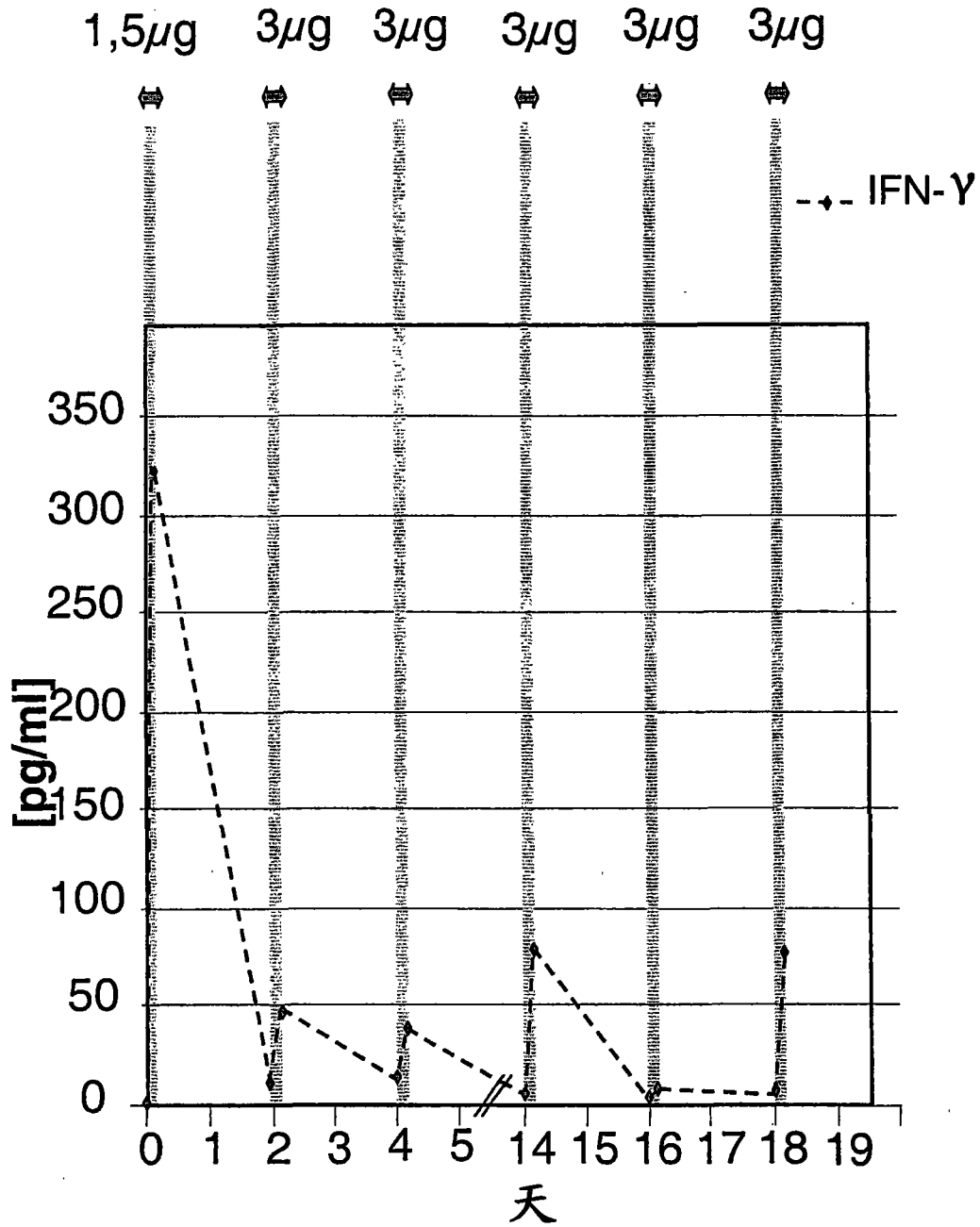


图 3

患者 1003/IL-6

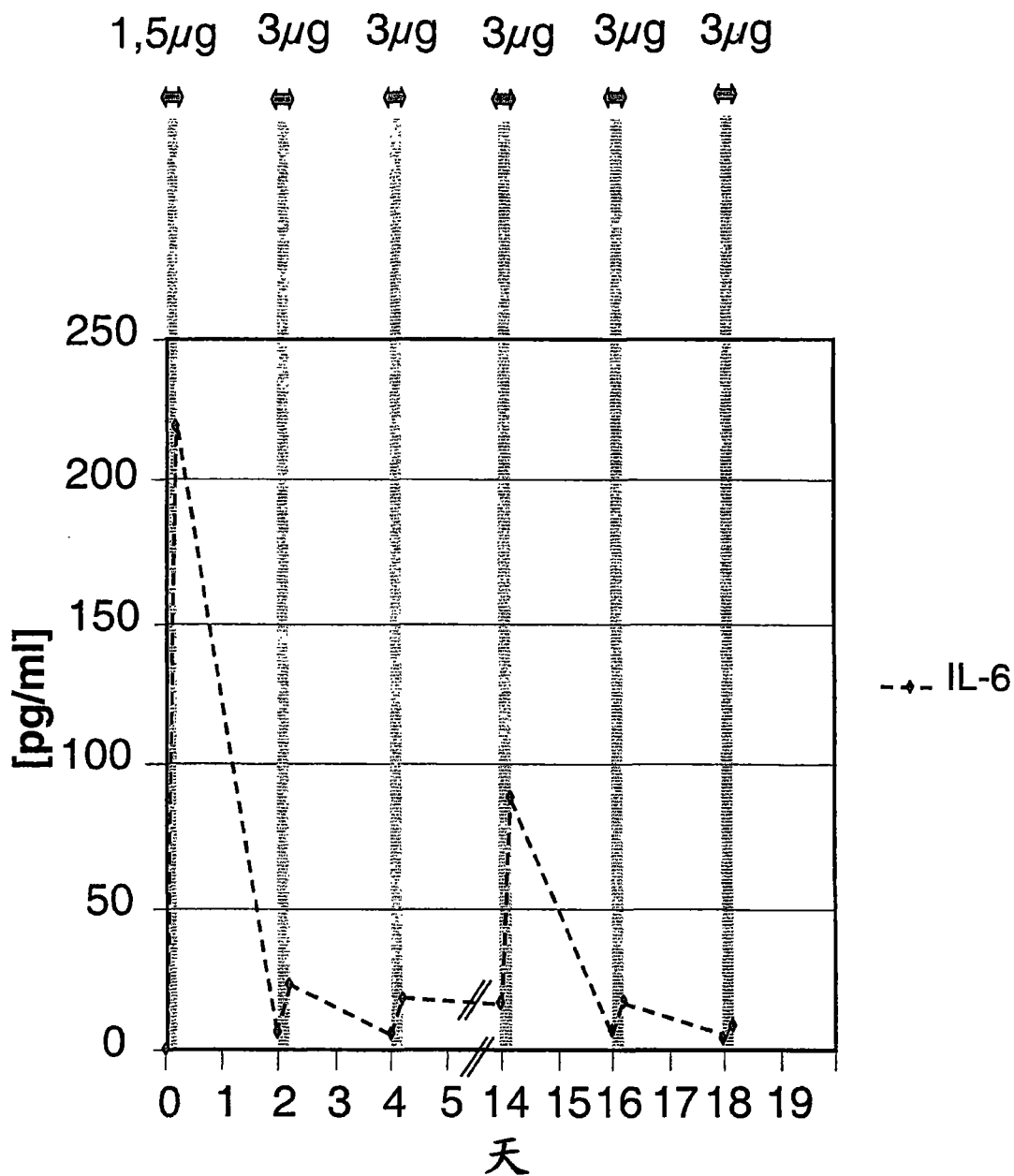


图 4

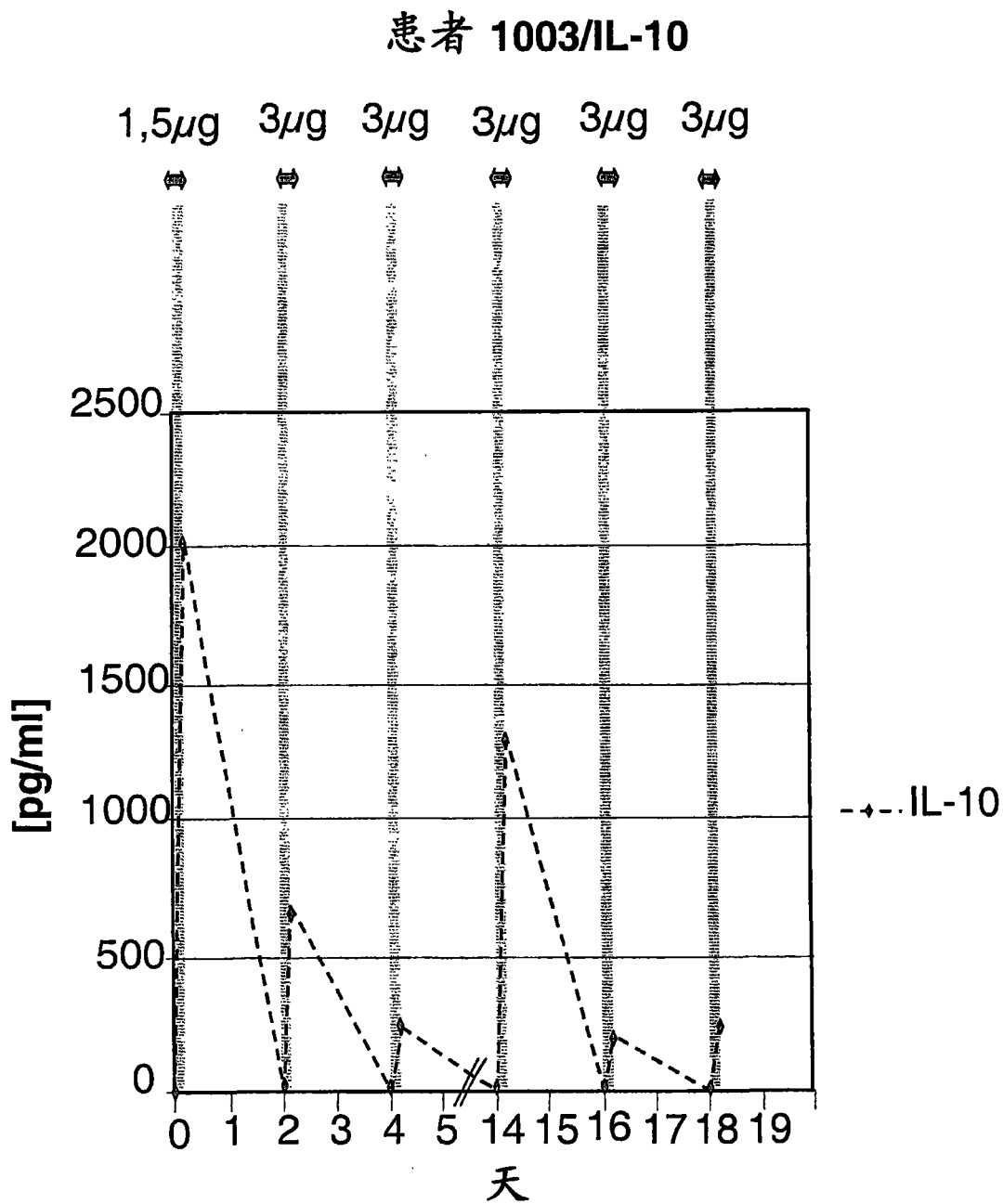


图 5

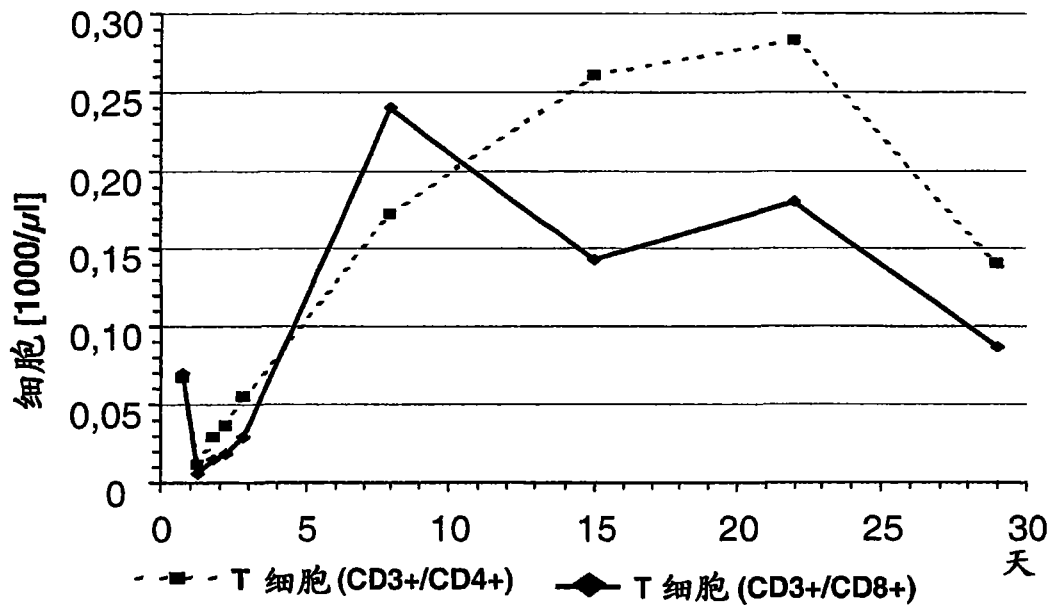


图 6

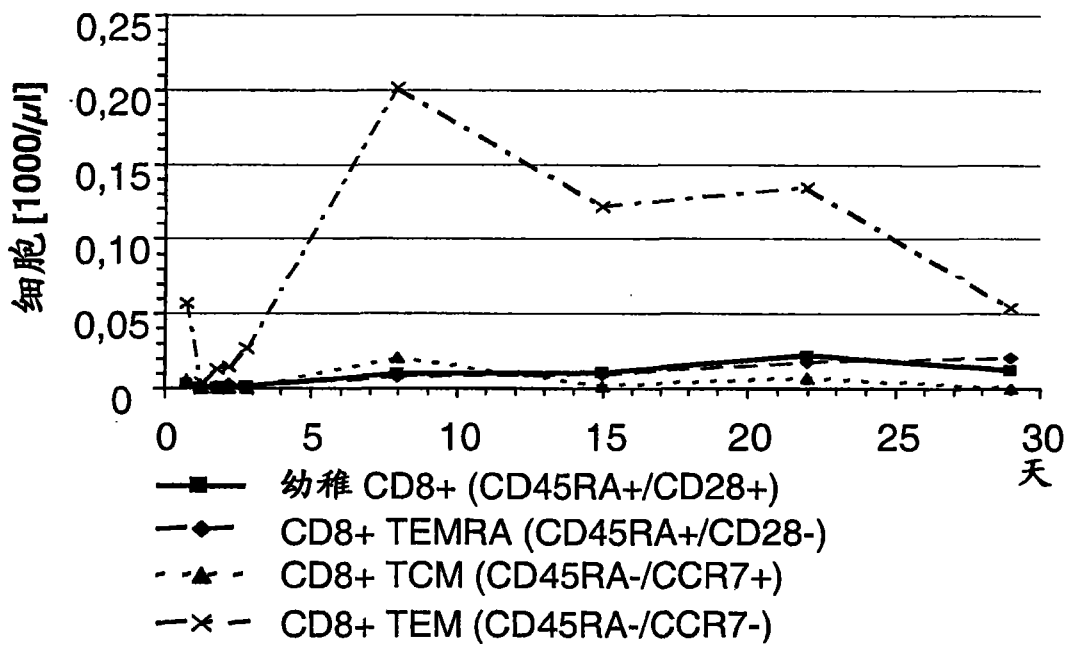


图 7

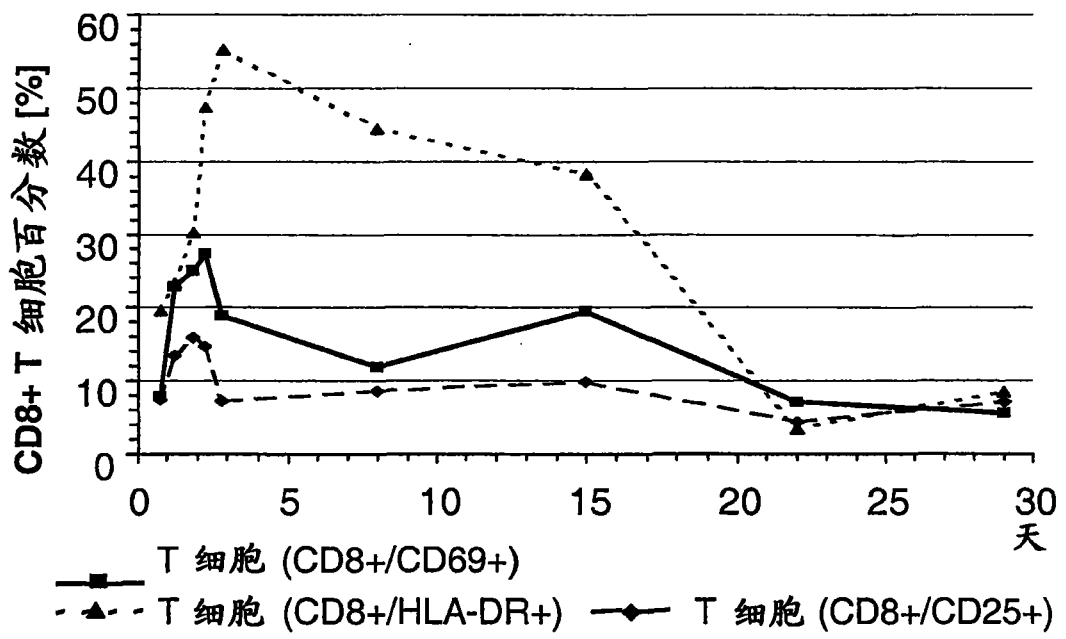


图 8

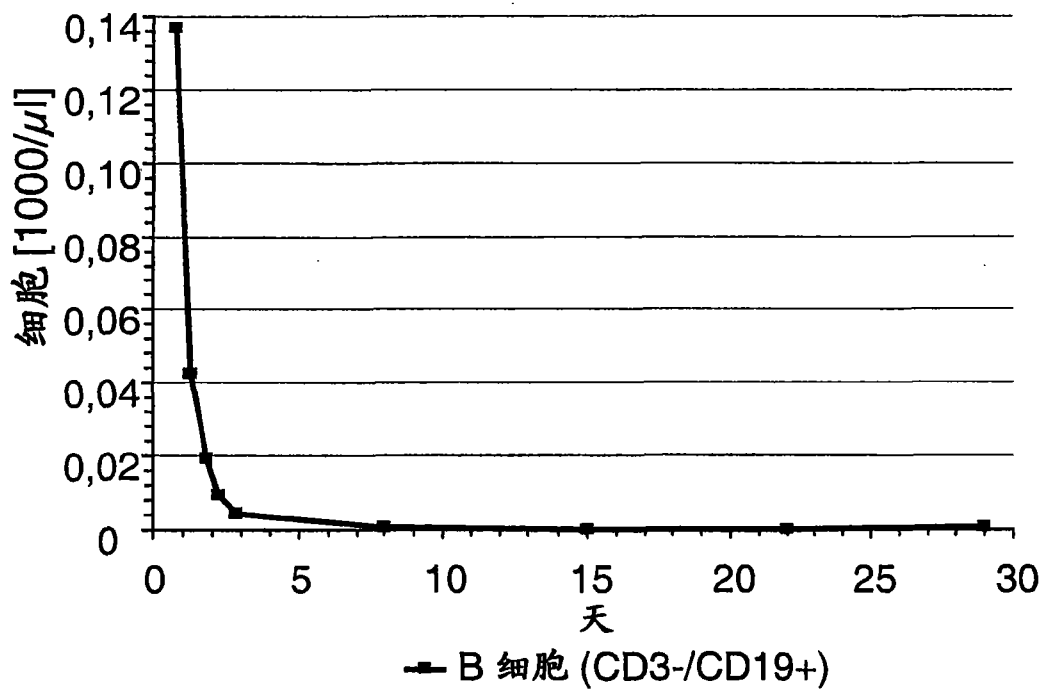
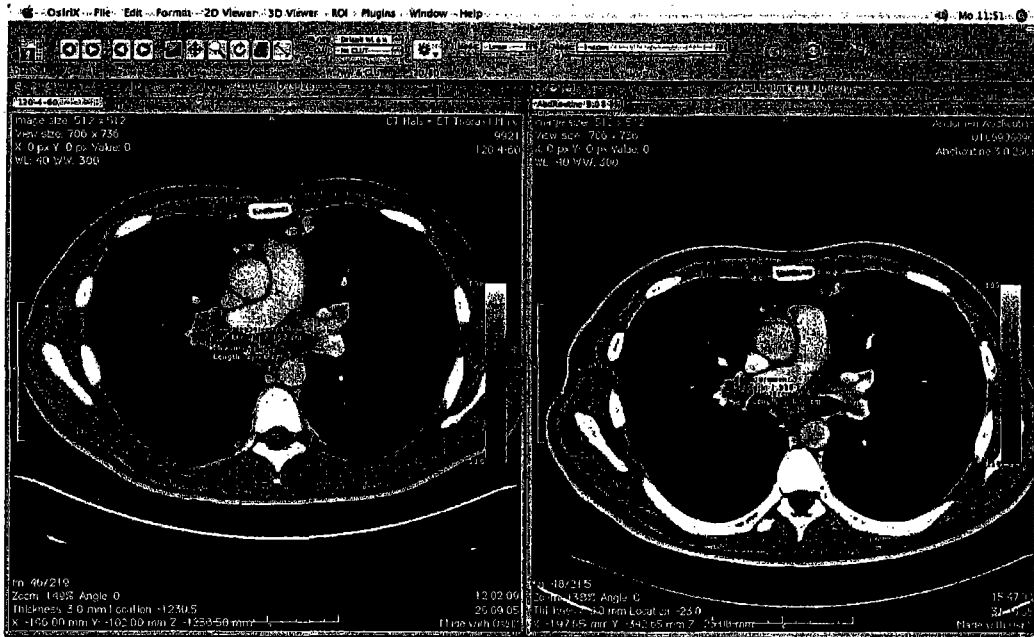


图 9

A

治疗前

治疗4周后



B

病灶	定位	日期 26.09.			日期 31.10.		
		a	b	产物	a	b	产物
1	纵隔	2,8	1,4	3,92	2,1	1,1	2,31
2	脐	2,8	2,5	7,00	2,1	1,9	3,99
3	肺	3,4	1,5	5,10	1,8	1,0	1,80
4	腹膜后的	2,1	1,6	3,36	1,2	1,0	1,20
5	髂	3,6	2,4	8,64	2,1	1,2	2,52
6	颈	1,3	1,0	1,30	0,8	0,6	0,48
			总和	29,32		总和	12,30
		SCR			第29天		-58,0 %

图 10

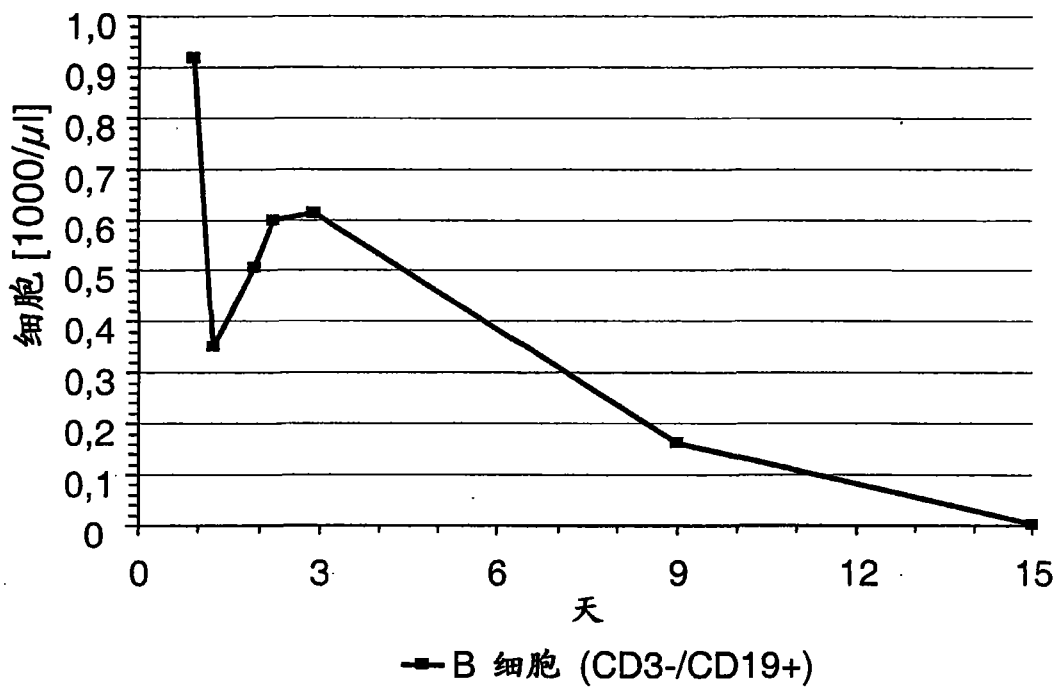
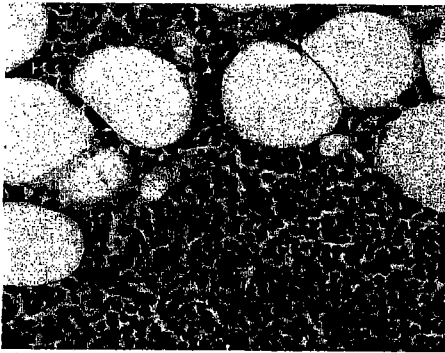


图 11

治疗前



治疗2周后

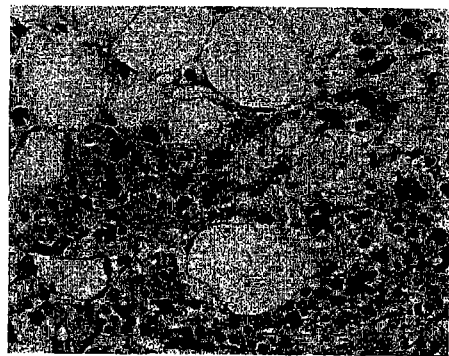
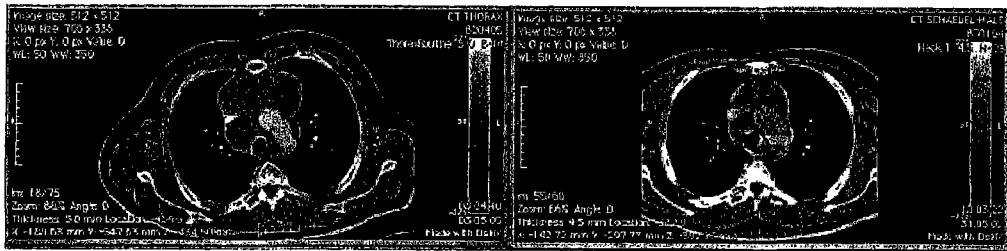


图 12

A

治疗前

治疗 2 周后



B

病灶	定位	日期 02.05			日期 31.05		
		a	b	产物	a	b	产物
1	纵隔 (1)	12,0	3,0	36,00	7,0	2,8	19,60
2	纵隔 (2)	4,1	4,0	16,40	3,4	2,2	7,48
3	纵隔 (3)	6,5	5,1	33,15	4,0	2,1	8,40
4	纵隔 (4)	3,3	3,0	9,90	2,1	1,5	3,15
5	腹膜后的	3,0	2,7	8,10	2,3	2,4	5,52
6	隔膜	1,9	1,5	2,85	1,0	1,3	1,30
			总和	106,40		总和	45,45
		SCR			第21天		-57.2 %

图 13

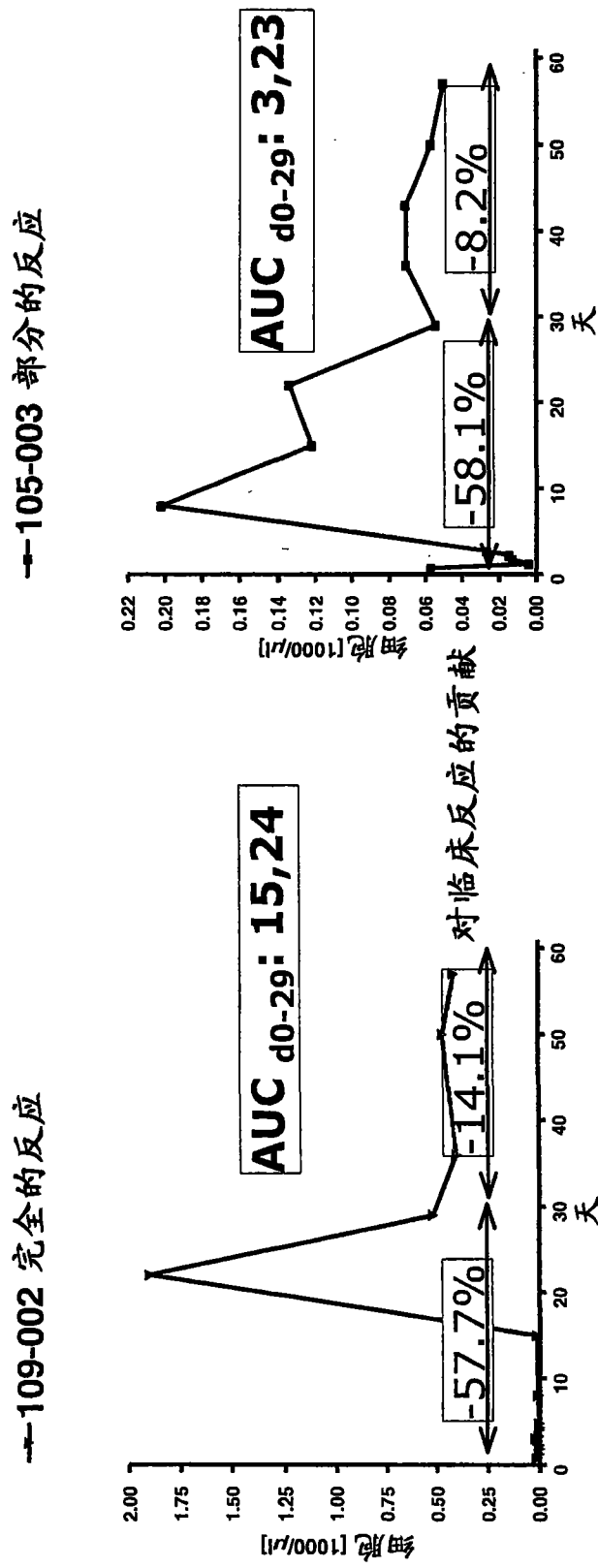


图 14

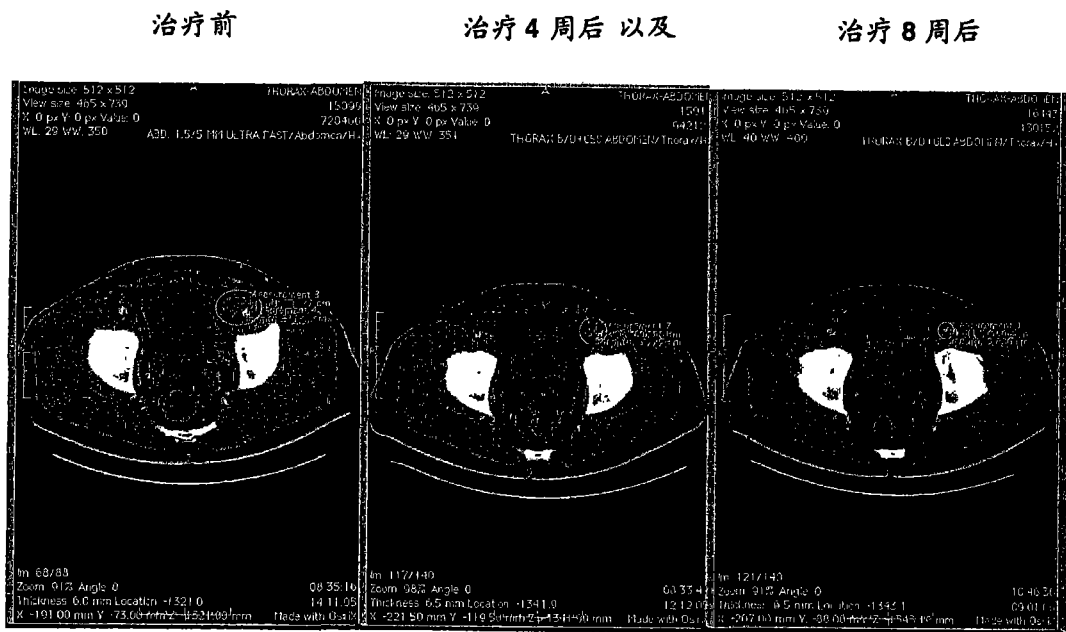
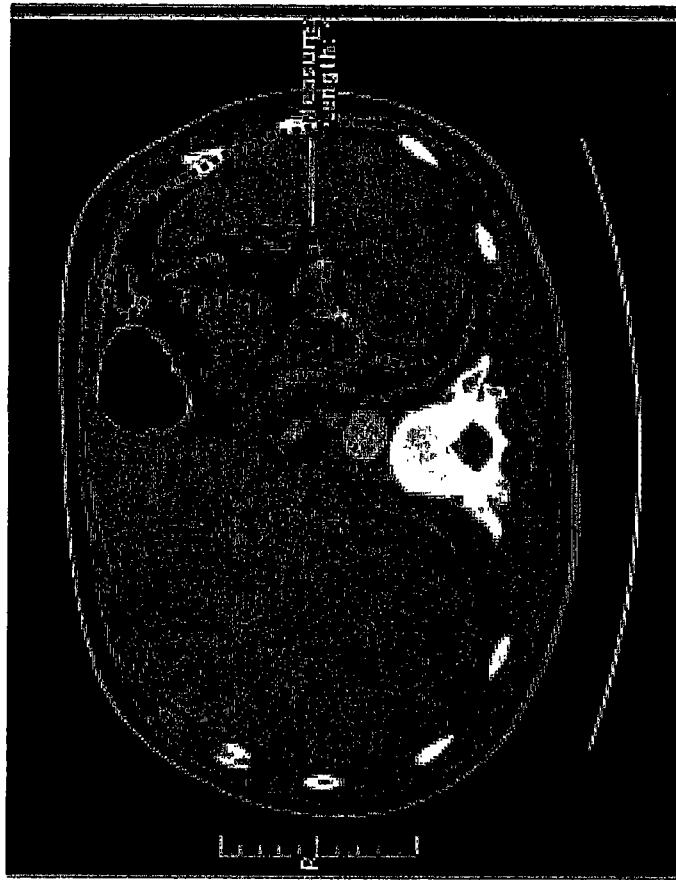


图 15

治疗后



治疗前

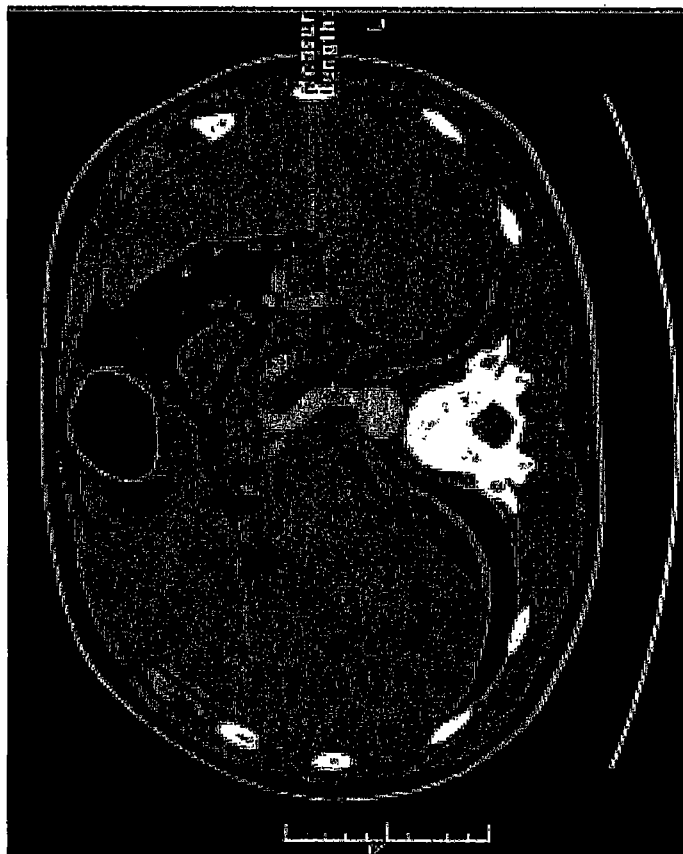


图 16