



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102209729 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 05

(21) 申请号 200980144400. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 11. 06

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/112, 323 2008. 11. 07 US

61/183, 291 2009. 06. 02 US

61/221, 269 2009. 06. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/007969 2009. 11. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02010/052013 EN 2010. 05. 14

(71) 申请人 米克罗麦特股份公司

地址 德国慕尼黑

(72) 发明人 格哈德·祖格迈尔

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

权利要求书 2 页 说明书 26 页

序列表 9 页 附图 5 页

(54) 发明名称

小儿急性淋巴细胞白血病的治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的方法, 该方法包括向需要其的小儿 ALL 患者给予包含 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的药物组合物。

1. 一种用于治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的方法,所述方法包括向需要其的小儿 ALL 患者给予包含 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的药物组合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 是小儿 B-系急性淋巴细胞白血病 (ALL),优选小儿 B-前体急性淋巴细胞白血病 ALL,更优选小儿祖 B 细胞 ALL、前 B 细胞 ALL 或普通 ALL (cALL)。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述急性淋巴细胞白血病 (ALL) 是难治性和 / 或复发性 ALL。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,所述急性淋巴细胞白血病 (ALL) 是复发性 ALL,优选为在诊断后 3 年内复发的 ALL。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中,所述方法用于治疗、改善或消除小儿 ALL 患者的微小残留病变 (MRD)。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中,所述小儿 ALL 患者在完全血液缓解期为 MRD- 阳性。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法,其中,所述方法将 MRD 阳性 ALL 转变成 MRD 阴性状态。

8. 根据权利要求 5 至 7 中任一项所述的方法,其中,MRD 通过定量检测至少一种细胞遗传学异常或重排来测量,所述细胞遗传学异常或重排选自以下组成的组中:

t(12 ;21) [TEL-AML1] ;

t(1 ;19 ;) [E2A-PBX] ;

t(4 ;11) [AF4-MLL] ;

t(9 ;22) [BCR-ABL] ;

超二倍体或 4、10 和 17 号染色体的三体 ;

亚二倍体 ;

免疫球蛋白基因重排 ;和

T- 细胞受体 (TCR) 重排。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述小儿 ALL 患者显示高于检测限的细胞遗传学异常的信号,和 / 或至少一种灵敏度 $\geq 10^{-4}$ 通过重排的标记。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中,相应可变重链区 (VH) 和相应可变轻链区 (VL) 在所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体中从 N- 末端至 C- 末端以 VL (CD19) -VH (CD19) -VH (CD3) -VL (CD3) 的顺序排列。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体包含 SEQ ID NO. 1 中给出的氨基酸序列,或与 SEQ IDNO. 1 具有至少 90%、优选至少 95% 同一性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法,其中,包含 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的所述药物组合物将通过连续输注给药至少 4 周,在此之后是 2 周的无治疗间隔期。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,在确定 MRD 阴性状态之后,所述给药重复至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中,所述方法在同种异体干细胞移植 (HSCT)

之前,将MRD阳性ALL转变成MRD阴性状态。

15. 根据权利要求12或13所述的方法,其中,所述方法在同种异体干细胞移植(HSCT)之后。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中,CD19xCD3双特异性单链抗体构建体诱导移植物抗白血病(GvL)效应。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中,按每平米患者身体表面积 $10\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}$ 的每日剂量,给予所述CD19xCD3双特异性单链抗体构建体。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中,按每平米患者身体表面积 $15\mu\text{g}\sim 30\mu\text{g}$ 的每日剂量,给予所述CD19xCD3双特异性单链抗体构建体。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中,所述方法是用于根据急性淋巴细胞白血病的COGAALL03B1分类具有高复发风险的小儿ALL患者。

20. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述患者是不符合同种异体干细胞移植条件的患者。

21. 一种用于治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病(ALL)的CD19xCD3双特异性单链抗体构建体。

小儿急性淋巴细胞白血病的治疗方法

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的方法,该方法包含向需要其的小儿 ALL 患者给予包含 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的药物组合物。

背景技术

[0002] 对于现在的儿童 ALL 治疗,无事故 (event-free) 存活率为约 75%。所以,复发仍然频繁。ALL 复发处理中的问题是:白血病细胞的抗性,和患者在已经接受第一线强化治疗之后对第二轮治疗的耐受性降低,导致缓解率降低、随后复发的发病率升高和总体疗效下降。强化综合化疗因而是目前诱导第二次完全缓解所必需的。根据各种预后因素,可用单独的化疗和脑照射维持缓解,或者可用于干细胞移植的强化治疗维持缓解 (Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. 在: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486)。

[0003] 虽然对患有急性淋巴细胞白血病 (ALL) 儿童的治疗已取得巨大进展 (参见,例如 Moricke 等人, Blood 111(2008), p. 4477; Moghrabi 等人, Blood 109(2007), p. 896),但是复发性 ALL 仍然是第四种最常见的小儿恶性肿瘤 (Gaynon, Cancer 82(1998), p. 1387)。尤其对于在诊断后三年内伴有早期骨髓复发的患者而言,用于这些患者的疗法不能令人满意,并且到目前为止同种异体干细胞移植是唯一已知的治愈方法。虽然移植后供体淋巴细胞输注 (DLI) 可通过诱导移植物抗白血病 (GvL) 效应而诱导少数患者的缓解 (Loren 等人, BMT 41(2008), p. 483),但是造血干细胞移植 (HSCT) 之后的化疗难治性复发与不良预后相关。第二次 HSCT 可能是一种选择,已经报道了一些长期存活者。但是,在 HSCT 之前的疾病状态对移植后的疗效有预测作用,已知患有形态学疾病或 MRD 水平持续大于 10^{-4} 个白血病原细胞 (leukemic blasts) 的患者复发风险很高,且疗效很差 (Bader 等人, J Clin Oncol. 27(2009), p. 377-84)。由此可知,第二次 HSCT 之前的疾病状态最重要,应尽一切努力获得另一个缓解期。虽然可使用最近推出的难治性白血病的化疗剂 (Jeha, Semin Hematol. 46(2009), 76-88),但是在 HSCT 之后复发的患者经常患有化疗难治性疾病,这些患者对化疗相关的毒性非常敏感。对于这些患者,需要用非化疗和低毒性策略诱导此类患者的缓解。

[0004] 由于常规小儿 ALL 疗法存在上述缺陷,所以仍需要改进的治疗方案。

发明内容

[0005] 本发明涉及治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的方法,该方法包含向需要其的小儿 ALL 患者给予包含 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的药物组合物。这种使用 T 细胞结合抗体的免疫学方法首次提供了小儿 ALL 的非化疗性和低毒性疗法。

[0006] 最近, I 期研究已证明, CD19xCD3 双特异性单链抗体 (blinatumomab) 对复发性 CD19- 阳性 B- 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 有显著的临床活性,因为已观察到引人注目的肿瘤部分消退和全部消退 (Bargou 等人, Science 321(2008): 974-7)。

[0007] 在进一步、仍在进行的临床试验中,用所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗消除了非移植性 MRD- 阳性 CD19⁺ALL 成人患者的化疗难治性白血病细胞。

[0008] 现已在两个同情性使用 (compassionate-use) 情况下意外地发现,所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体不仅适于治疗非移植性成人患者的 ALL,而且适于治疗包括化疗和同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 在内的常规 ALL 疗法难以治疗的小儿 (或儿童) 复发性 ALL。

[0009] 在此,本发明人报道了 CD19xCD3 双特异性抗体对两名儿童 (以下称为患者 1 和 2) 的有效的抗白血病作用,该两名儿童是在接受来自匹配的无关 (matched unrelated) 及半相合 (haploidentical) 供体的同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 之后,经受化疗难治性复发的 B- 前体急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者。

[0010] 在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗之前,患者 1 已经用同种异体 HSCT 和多种化疗进行预处理。然而,这些常规小儿 ALL 疗法未能成功,致使该患者反复发作,其结果是该患者预后极差。之后,该小儿 ALL 患者以连续输注的方式接受 15 微克 /m²/24hr 的 CD19xCD3 双特异性单链抗体五周。在抗体治疗期间,该患者中供体来源的 CD8⁺T- 淋巴细胞扩增,但没有出现任何移植物抗宿主病 (GvHD) 征象。这种 T- 细胞扩增与患者白血病原细胞的迅速消除相关,并且在开始抗体治疗后 10 天,在该患者骨髓中未检测到超出 1 个细胞 /10000 个细胞,即微小残留病变 (MRD) 检测水平的原细胞 (母细胞,blasts)。该患者在整个抗体治疗中一直是 MRD- 阴性的。在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗结束后 2 周,对该患者进行来自其半相合母亲 (haploidentical mother) 的第二次干细胞移植,并从那之后该患者一直是 MRD- 阴性的 (2009 年 11 月的状态)。

[0011] 年龄为 15 岁的患者 2 在 2001 年 4 月被诊断患有费城染色体 - 阳性和 CD19- 阳性 B- 前体 ALL。在化疗之后,他在 2001 年 10 月接受了来自 HLA 相合同胞 (HLA-identical sibling) (兄弟姐妹) 的 HSCT。在 2002 年诊断出骨髓复发并用伊马替尼 (imatinib) 和化疗获得另一个缓解期。然后他在 2004 年 10 月接受了来自 HLA 相合无关供体 (HLA-identical unrelated donor) 的第二次 HSCT。在 2008 年 3 月,诊断出第二次复发,并用低剂量化疗和达沙替尼 (Dasatinib) 进行治疗,因为其对伊马替尼有抗性。在用氯法拉滨 (Clofarabin) 和胞嘧啶 / 阿拉伯糖苷 (Cytosin/Arabinosid) 进行另外的化疗之后,他获得分子缓解并接受来自其 3/6HLA 等位基因不匹配的半相合父亲 (HLA-allele-mismatched haploidentical father) 的第三次同种异体 HSCT,并在移植后用达沙替尼治疗。由于胃肠道出血和扩张型心肌病,在移植后 5 个月中断了达沙替尼。在 2009 年 4 月,诊断出中枢神经系统 (CNS) 复发,加上 CNS 中有 7x10⁹/L 的原细胞且骨髓中有 3% 的原细胞。该患者然后用尼罗替尼 (Nilotinib)、鞘内化疗和以 18Gy 对 CNS 分次照射进行治疗。这种治疗后 3 个月,该患者的骨髓仍然为 1.1x10⁻³ 水平的 MRD- 阳性,但 CNS 中无原细胞。外周血嵌合状态分析揭示供体来源的造血完全来自其半相合父亲 (haploidentical father)。

[0012] 该患者然后通过连续输注 15 μg/m²/ 天的单药剂 blinatumomab 治疗 4 周,而没有产生任何副作用。治疗结束时的骨髓穿刺显示完全缓解,骨髓中不可检测的 MRD 小于 1×10⁻⁴。如同患者 1,患者 2 在用 blinatumomab 治疗期间或之后也没有表现出任何 GvHD 征象。他目前健康,并在上学。

[0013] 这个数据有力地证明,T- 细胞结合的双特异性抗体可以在不存在 GvHD 的情况下,对在同种异体 HSCT 之后患有复发性和治疗难治性 B- 前体 ALL 的小儿患者诱导有效的移植

物抗白血病 (GvL) 效应。因此,在本文描述的小儿患者的治疗中,优选 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体诱导移植物抗白血病 (GvL) 效应。另外,该小儿患者对该治疗有很好的耐受性。鉴于这点,本发明的方式和方法为小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL),特别是包括化疗和/或同种异体 HSCT 在内的常规小儿 ALL 疗法难以治疗的小儿 ALL 病例提供了惊人的改进的治疗选择。因此,在本发明的进一步实施例中,本文所采用的 T- 细胞结合的双特异性单链构建体 (抗 CD19xCD3) 还可以供已经接受 (同种异体) 造血干细胞移植 (HSCT) 的小儿患者使用。如本文所说明的,甚至在接受来自匹配的无关 (matched unrelated) 或半相合供体 (haploidentical donor) 的 HSCT 之后复发的小儿患者,和/或化疗难以治疗的小儿患者也可以利用本文公开的方式和方法成功治疗。如本文证明的示例患者通过如本文公开的药物干预而表现出引人注目的抗白血病反应,并且在不存在任何 GvHD (移植物抗宿主病) 征象的情况下变成 MRD 阴性。虽然 ALL 儿童的存活率在过去几十年里已显著提高,但复发性 ALL 仍然是治疗失败的主要原因。对于第二次复发的患者,同种异体 HSCT 是迄今为止唯一的治愈途径。HSCT 的主要抗白血病作用之一是诱导 GvL 效应。不幸地,GvL 的产生通常与 GvHD 相关联,GvHD 仍是 HSCT 之后的发病率和死亡率的主要原因。所以,在不存在 GvHD 的情况下诱导 GvL 是集中研究的课题。诱导 GvL 效应的一个途径是移植后供体淋巴细胞输注 (DLI),其优选用于治疗 HSCT 之后复发的 ALL。虽然 DLI 对治疗 CML 非常有效 (Kolb, Blood 76 (1990), 2462),但它对复发性 ALL 移植后治疗的效果较小 (Loren, BMT 41 (2008), 483) 并且经常导致 GvHD 的产生。

[0014] 本发明药学及医学方法和方式提供了在不存在 GvHD 的情况下诱导 GvL 的新方法。这种方法是在 HSCT 之后使用低剂量 T- 细胞结合的 CD19xCD3 双特异性单链抗体在体内激活供体来源的淋巴细胞,该抗体指导 T- 淋巴细胞对抗该患者的 CD19+ALL 原细胞。这种抗体在自体移植的情况下表现出引人注目的抗淋巴瘤活性和抗白血病活性,但在 HSCT 之后复发的小儿 ALL 中的活性从未被测试。以下实施例中描述的两名小儿患者在接受来自匹配的无关供体或半相合供体的 HSCT 之后 ALL 复发,化疗难以治疗。该患者在开始治疗之后表现出引人注目的抗白血病反应,并在不存在任何 GvHD 征象的情况下变成 MRD 阴性。CD19xCD3 双特异性单链抗体的免疫作用不依赖于肽抗原呈递,最可能的原因是尽管体内供体来源的 T- 细胞发生大规模扩增,但没有诱导 GvHD。低剂量 CD19xCD3 双特异性单链抗体足以消除患者中超出 MRD 检测水平的 ALL 原细胞。因而,这种抗体作用的 T- 细胞结合模式与常规抗体的区别非常大,常规抗体需要大得多的剂量并且由于缺少 T- 细胞上的 Fc 受体而无法经其抗体分子的 Fc 部分与 T- 细胞结合。经 CD19xCD3 双特异性单链抗体,高度有效的效应物 (效应子, effector) T 细胞可以对所有 ALL 原细胞产生细胞毒作用,而不诱导导致 GvHD 的同种反应性 (alloreactivity) 免疫应答。在患者 1 变成 MRD 阴性之后,本发明人决定对他进行来自半相合供体的第二次同种异体 HSCT。到目前 (2009 年 11 月) 为止,该患者仍然是 MRD 阴性的。

[0015] 从两个移植后化疗难治性复发的 ALL 患者中的初步临床经验,得出的结论是 CD19xCD3 双特异性单链抗体可以在不产生 GvHD 的情况下诱导引人注目的完全缓解。因此,在移植前用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗可以免疫性减轻白血病负荷和治疗移植后的复发,所以为后期 ALL 小儿患者提供了新的治疗机会。

[0016] 本发明方法提供了下列主要优势:

[0017] 1. 如以下实施例所证明的, 给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体可以用于治疗复发性和 / 或难治性小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL)。CD19xCD3 双特异性单链抗体不但可以代替常规小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 疗法 (如化疗) 治疗不符合同种异体干细胞移植条件的小儿患者。而且它还可以用来使符合所述移植条件的小儿 ALL 患者转变成 MRD 阴性状态。本发明的这个方面是重要的, 因为 MRD- 阴性患者移植之后复发的风险比 MRD- 阳性患者低。在最好的情况下, 用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的小儿 ALL 疗法使得化疗和 / 或 HSCT 多余。

[0018] 2. 已知患有形态学疾病或 MRD 水平持续大于 10^{-4} 个白血病原细胞的患者复发风险很高, 且疗效很差 (Bader 等人, J Clin Oncol. 27 (2009), p. 377-84)。用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗的儿童在开始治疗后表现出引人注目的抗白血病反应并在治疗期间变为 MRD 阴性, 而不存在任何 GvHD 征象。本发明的药学方法和方式因此提供了治疗、改善或消除小儿 ALL 的 MRD 的治疗方法, 从而减轻或甚至消除患者复发的风险。同种异体 HSCT 的治愈潜能 (curative potential) 取决于移植之前的 MRD 水平。用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗可以用于将所述高风险小儿患者转变成 MRD- 阴性状态。因此, 难治性儿童 ALL 的 MRD 首次可以通过 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗。

[0019] 3. 本发明药学方法和方式不但表现出有效的抗白血病作用, 而且它们的毒性和所引起的不良反应也比包括化疗和 / 或同种异体 HSCT 在内的常规小儿 ALL 疗法小。到目前为止, 在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗之后未观察到长期副作用。相比之下, 常规小儿 ALL 疗法侵袭性 (aggressive) 强, 因此与小儿患者相当多的健康风险相关。另外, 已报道常规 ALL 疗法之后对儿童的后遗影响 (late effect) (参见, 例如 Hudson MM, Late complications after leukemia therapy. 在: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 750-773; Schmoll, Hoffken, Possinger: Kompendium Internistische Onkologie, S. 2660ff. ; 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg; <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/lateeffects/HealthProfessional>)。实际上, 常规小儿 ALL 治疗使用甚至比成人 ALL 所采用的治疗途径更具侵袭性 (aggressive) 的治疗方案。然而, 从约 25% 的小儿 ALL 复发率明显可以看出, 甚至这些侵袭性疗法也不足以最终治愈所有患者。鉴于此, 更令人吃惊的是, 用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗难治性和 / 或复发性小儿 ALL 患者可以使所述患者变为 MRD 阴性状态, 这为这种高风险患者提供了新的治疗机会。用常规小儿 ALL 疗法如化疗和 / 或 HSCT 无法获得这种结果。

[0020] 4. ALL 亚型 (见下文) 的所有患者当中, 例如, Ph+ALL (bcr/ab1) 小儿患者具有非常高的复发风险。虽然同种异体 HSCT 目前被认为是小儿 Ph+ALL 选择的治疗方法, 但是近三分之一的移植患者会复发。另外, 如以下更详细陈述的, 用常规或标准 ALL 疗法治疗 ALL 幼儿 (< 12 个月) 失败的风险较高, 其中具有 MLL (t (4 ; 11)) 基因重排的那些患者预后最差。以下实施例示出的患者 2 的结果和上述正在进行的、治疗成人 (非移植性) ALL 患者的临床试验所获得的数据揭示, 甚至 Ph+ALL (bcr/ab1) 和带有 MLL 基因重排的 ALL 也可以通过给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体成功地治疗。所以, 给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体为小儿 Ph+ALL 或带有 (t (4 ; 11)) 易位的 ALL, 尤其为微小残留病变 (MRD) 的小儿 ALL 患者提供了新的治疗方法。这解决了例如由 PCR 或 FACS 分析限定的微小残留病变 (MRD) 问题。

[0021] 5. 由于其具有很高的细胞毒活性,所以低剂量的 CD19xCD3 双特异性单链抗体就足以成功治疗小儿 ALL,这可以消除甚至骨髓中的白血病细胞。

[0022] 6. 用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗的持续时间较常规小儿 ALL 疗法短。常规小儿 ALL 化疗通常需要 2 ~ 3 年,而在以下实施例给出的小儿患者中可以观察到对 CD19xCD3 双特异性单链抗体的非常迅速的反应。而且,该反应持久:移植后患者 1 已保持多于 12 个月的 MRD- 阴性;见以下实施例。

[0023] 7. 复发的小儿 ALL 患者经常患有化疗难治性疾病,且这些患者对化疗相关的毒性非常敏感。对于这些患者,用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗首次提供了诱导此类患者缓解的非化疗且毒性较低的策略。

[0024] 8. 从上述正在进行的成人患者 ALL 的临床试验中发现,用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗消除了非移植性 MRD- 阳性 CD19+ALL 成人患者的化疗难治性白血病细胞。然而在这些患者中所使用的细胞毒 T- 细胞是患者来源的,到目前为止还不存在关于在所使用的 T- 细胞是供体来源的情形下,在同种异体 HSCT 后使用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的数据。在此,本发明人首次报道,在不存在 GvHD 的情况下,对同种异体 HSCT 之后化疗难治性复发的两个 CD19+ALL 小儿患者极强地诱导了 GvL 效应,其是通过结合供体来源的 T 细胞的 CD19xCD3 双特异性单链抗体所诱导的。

[0025] 总之,用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗为小儿 ALL,特别是难治性和 / 或复发性小儿 ALL 提供了新的和改进的疗法。

[0026] 在本发明药学方法和方式的优选实施例中,该小儿或儿童急性淋巴细胞白血病 (ALL) 是小儿 B 系 ALL,优选小儿 B- 前体急性淋巴细胞白血病 ALL,更优选小儿祖 B 细胞 ALL (pro-B ALL)、前 B 细胞 ALL (pre-BALL)、或普通 ALL (cALL)。甚至更优选该小儿 B- 前体 ALL 是普通 ALL (cALL)。

[0027] 绝大多数小儿或儿童 ALL 病例 (> 85%) 为 B 前体细胞表型 (Schultz 等人, Blood 109 (2007) :926-935)。因为本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体是针对 B 细胞关联的标记 CD19,所以所述抗体特别适合用作小儿 B- 系急性淋巴细胞白血病的治疗剂,更优选用作小儿 B- 前体 ALL 的治疗剂。小儿 B- 前体 ALL 可以进一步地再分为小儿祖 B 细胞 ALL、前 B 细胞 ALL 和普通 ALL (cALL) (参见,例如 Behm F. G., Immunophenotyping. 在: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 150-209)。包括小儿 B- 前体急性淋巴细胞白血病和其它类型的小儿 B(细胞)系 ALL 在内的小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL),及其治疗方法综述在以下文献中,例如, Pui CH, Clin Adv Hematol Oncol. 4 (2006) :884-6; Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006) :166-178; Pui CH et al., Lancet 371 (2008) :1030-1043; Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007) :149-165)。关于小儿 ALL 的进一步信息可以在例如 <http://www.cancer.gov> 或 <http://www.leukemia-lymphoma.org> 中找到。

[0028] 从历史考虑,1993 年儿童肿瘤组 (Pediatric Oncology Group) 和儿童癌症组 (Children's Cancer Group) 在美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute) (Smith M 等人, J Clin Oncol 14 (1996), 18-24) 支持的国际会议上采纳了一组常用的风险标准。该 NCI 标准基于国际接受并可重现的因素:年龄、初始白细胞计数 (WBC) 和诊断时存在的髓外 (extramedullar) 疾病。为了进一步完善 (refine) 治疗,POG 和 CCG 也都采用

了已显示对患者疗效有影响的另外的风险因素（例如，倍数性、原细胞染色体组型 (blast karyotype) 和早期的形态响应）。在 2000 年,CCG 和 POG 合并形成儿童肿瘤组 (COG)。这种合并允许分析预测急性淋巴细胞白血病 (ALL) 无事故存活 (EFS) 的临床、生物和早期响应数据,从而形成新分类体系和治疗原则。从 CCG(1988 年 12 月~1995 年 8 月,n = 4986) 和 POG(1986 年 1 月~1999 年 11 月,n = 6793) 连续登记的 11779 个初次诊断的 B- 前体 ALL 儿童 (1 ~ 21.99 岁) 中,该研究利用信息化细胞遗传学数据回顾分析了 6238 个患者 (CCG, 1182 ;POG,5056) (Schultz 等人,Blood 109(2007) :926-935)。定义了四个风险组:非常高的风险 (VHR ;5- 年 EFS,45% 或以下)、较低风险 (5- 年 EFS,至少 85%),以及标准风险和高风险 (仍然在美国国家癌症研究所 [NCI] 各个风险组中的那些)。VHR 标准包括极端的亚二倍体 (hypodiploidy) (少于 44 个染色体)、t(9 ;22) 和 / 或 BCR/ABL,以及诱导失败。较低风险的患者是携带 t(12 ;21) (TEL/AML1) 或同时发生 4、10、17 号染色体三体的 NCI 标准风险。即使治疗方式不同,但 CCG 和 POG 分析之间还是存在高度的一致性。利用 COG 风险分类方案,通过 COG 试验中的流式细胞仪,基于年龄、白细胞 (WBC) 计数、细胞遗传学、14 天的骨髓反应和结束诱导时 (end induction) 微小残留病变 (MRD),将 B- 前体 ALL 分成较低风险组 (27%)、标准风险组 (32%)、高风险组 (37%),和非常高的风险组 (4%)。

[0029] 目前,基于风险的治疗分配 (treatment assignment) 已用于儿童或小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL)。这种方法使历史上疗效良好的儿童可以用温和疗法治疗并可以省去更加强化和有毒的治疗,同时使历史上长期存活概率较小的儿童接受可增加其治愈几率的更加强化的治疗。已发现,在诊断时年长儿童和青少年 (≥ 10 岁) 及幼儿 (< 12 个月) 的有利疗效比 1 ~ 9 岁的儿童小,一般对这些患者采取较具侵袭性的治疗 (Nachman J, Br JHaematol 130(2005) :166-73)。用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗目前为此类小儿患者人群,即利用常规 ALL 疗法如化疗和 / 或 HSCT 治疗疗效较差的年长儿童和青少年 (≥ 10 岁) 及幼儿 (< 12 个月) 提供了改进的、毒性较低的治疗。

[0030] ALL 儿童的成功治疗需要对全身疾病加以控制 (例如,骨髓、肝和脾、淋巴结) 以及预防或治疗髓外疾病,特别是中枢神经系统 (CNS) 的疾病。诊断时按常规标准,仅 3% 的患者可检测到 CNS 受牵连 (≥ 5 WBC/微升,存在淋巴母细胞 (lymphoblast cell))。然而,除非针对 CNS 进行特异性治疗,否则 50% 至 70% 或更多儿童将最终发展成明显的 CNS 白血病。所以,目前建议所有 ALL 儿童应当接受全身联合化疗和一些形式的 CNS 预防。当前,大部分组用鞘内疗法和随后的脑照射,对诊断时记录的 CNS 白血病患者 (> 5 WBC/uL,存在原细胞 ; CNS3) 和诊断时带有 T- 细胞表型和 WBC 计数高的那些患者进行治疗。因此,用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的治疗优选联合诸如鞘内疗法和 / 或脑照射的 CNS 预防实施。

[0031] ALL 儿童的常规或标准治疗分为以下几个阶段:诱导缓解、巩固或强化、和维持 (或继续) 治疗,其中 CNS 避难所治疗 (sanctuary therapy) 一般提供在每个阶段。在诱导缓解之后的强化治疗阶段适用于所有患者。诱导治疗和诱导后治疗的强度都由基于风险的治疗分配和一些类型的早期反应评估所采用的临床和生物预后因素确定。这种评估可包括 7 天和 / 或 14 天骨髓原细胞百分数、8 天外周血原细胞计数,以及在诱导期间或结束时在骨髓和 / 或外周血中的微小残留病变测定 (Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354(2006) : 166-78)。ALL 儿童的治疗持续时间为 2 ~ 3 年。相比之下,在以下实施例给出的小儿患者中可以观察到对 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗的非常迅速的反应。另外,患者 1 到目前

为止(2009年11月)仍为MRD阴性,表明获得了长期的治愈。

[0032] 根据现行标准或常规疗法预后不良的患者亚群可能需要不同的治疗方式。例如, ALL 幼儿治疗失败的风险较高,其中带有 MLL 基因重排的那些预后最差(Rubnitz JE 等人: Blood 84(1994):570-3;Biondi A 等人, Blood 96(2000):24-33;Pui CH 等人, Lancet 359(2002):1909-15;SilvermanLB 等人: Cancer 80(1997):2285-95)。这些儿童一般用针对幼儿特别设计的方案治疗(Silverman 等人, (1997), loc. cit., Chessells JM 等人, J Haematol117(2002):306-14;Reaman GH 等人, J Clin Oncol 17(1999):445-55;PietersR 等人, Lancet 370(2007):240-50)。现行的幼儿方案采用强化治疗方法,并可以提供较先前较弱的强化方法有所改进的疾病控制方式,但长期疗效和毒性未知(Reaman(1999), loc. cit.;Pieters(2007), loc. cit.;Kosaka Y 等人, Blood 104(2004):3527-34;Hilden JM 等人, Blood 108(2006):441-51)。利用现行疗法,某些 ALL 儿童(大于1岁)长期缓解的可能性小于50%(例如, t[9;22] 费城染色体阳性 ALL、亚二倍体患者,和初步诱导失败的那些)。对于这些疾病,在第一缓解期中考虑来自人白细胞抗原(HLA)-匹配的同胞的同种异体骨髓移植(Snyder DS 等人, Leukemia 13(1999):2053-8;Arico M, et al., N Engl J Med 342(2000):998-1006;Schrauder A, et al., J Clin Oncol 24(2006):5742-9)。然而,仅通过 WBC 计数、性别和年龄,还不能证明 HLA-匹配的同胞供体移植对定义为高风险的患者有益(Ribera JM 等人, J Clin Oncol 25(2007):16-24)。

[0033] 因为骨髓抑制和全身免疫抑制是白血病及其利用化疗的治疗方法的预期结果,所以在常规小儿 ALL 治疗期间必须密切监测患者。在白血病治疗的所有阶段中,对于血液支持以及感染性和其它并发症的治疗,足够的设施必须是立即可用的。近1%患者在诱导治疗期间死亡,另外的1%~3%在第一缓解期死于治疗相关的并发症(Christensen MS 等人, Br J Haematol131(2005):50-8)。

[0034] 利用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的治疗为小儿 ALL,特别为难治性和/或复发性小儿 ALL 提供了替换的毒性较小的疗法。所述治疗避免了常规儿童 ALL 疗法如治疗失败、毒性和长期不利影响的缺陷。所以,它是化疗和/或同种异体 HSCT 的高效但毒性和健康风险较小的替换方式。

[0035] 因此,在本发明药学方法和方式的另一个实施例中,所述急性淋巴细胞白血病(ALL)是难治性和/或复发性 ALL。

[0036] 该小儿 ALL 可以是化疗或同种异体造血干细胞移植(HSCT)难以治疗的,或者化疗和同种异体造血干细胞移植(HSCT)均难以治疗的。该 ALL 可以是复发性 ALL,或用包括化疗和/或同种异体造血干细胞移植(HSCT)在内的常规 ALL 疗法难以治疗的复发性 ALL。然而,在本发明范围内,该 ALL 也可以是初次诊断的 ALL。在这种情况下,利用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的治疗可以单独或联合 HSCT 用作首次(第一线)治疗。

[0037] 如本文使用的,术语“难治性小儿 ALL”是指该小儿 ALL 对常规或标准小儿 ALL 疗法,如化疗和/或 HSCT 有抗性。目前,小儿 ALL 的复发率为约 25%。换言之:常规或标准小儿 ALL 疗法无法最终治愈所有小儿患者。

[0038] 如本文使用的,术语“复发性小儿 ALL”是指在小儿患者已进入缓解期之后 ALL 疾病的征象和症状重现。例如,在使用化疗和/或 HSCT 的常规 ALL 治疗之后,小儿 ALL 患者可进入没有 ALL 征象或症状的缓解期,保持缓解期几年,但随后复发,不得不再次治疗 ALL。

[0039] 复发的小儿 ALL 患者经常患有化疗难治性疾病。这些患者对化疗相关的毒性非常敏感,这可通过利用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的治疗加以避免。

[0040] 如本文使用的,术语“标准疗法”或“常规疗法”是指使用化疗和 / 或 HSCT 的小儿 ALL 疗法。包括小儿 B- 前体急性淋巴细胞白血病和其它类型的小儿 B(细胞)系 ALL 在内的小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL),及其治疗方式综述在以下文献中,如:Pui CH, Clin Adv Hematol Oncol. 4(2006):884-6;Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354(2006):166-178;PuiCH et al., Lancet 371(2008):1030-1043;Pui CH, Jeha S, N at Rev Drug Discov 6(2007):149-165;Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. 在:Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge:Cambridge University Press;2006, p. 473-486)。关于小儿 ALL 的进一步信息也可以在例如 <http://www.cancer.gov> 或 <http://www.leukemia-lymphoma.org> 中找到。

[0041] 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中存在的恒定和 / 或 Fc 部分 (或多个部分) 的单个多肽链中而产生的抗体构建体。本文提到的双特异性单链抗体作为单体具有功能性,即,细胞毒活性,因此与本领域中描述的仅作为二聚体或多聚体才具有功能性的 diabody 或 tandab 有着明显的区别。本文使用的“接头 (linker)”连接相同特异性的 V 结构域,而本文使用的“间隔物 (spacer)”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总共具有两个抗体可变区例如两个 VH 区的构建体,每个可变区均能够特异地结合到单独的抗原上,并通过短的 (通常少于 10 个氨基酸) 合成多肽间隔物彼此连接,使得该两个抗体可变区与插入其中的间隔物以单个的连续多肽链形式存在。双特异性单链抗体的另一个实施例可以是具有三个抗体可变区的单个多肽链。此处,两个抗体可变区例如一个 VH 和一个 VL 可以组成 scFv,其中该两个抗体可变区经由合成多肽接头彼此连接,通常对该多肽接头进行基因设计以便使免疫原性最小化、同时保持对蛋白水解作用最大的抗性。这种 scFv 能够特异地结合到特定抗原上,并且连接到此外的抗体可变区例如 VH 区上,该抗体可变区能够结合于与 scFv 所结合的抗原不同的抗原。双特异性单链抗体的又一个实施例为具有四个抗体可变区的单个多肽链。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到一个抗原上的 scFv,而第二个 VH 区和 VL 区可以形成第二个能结合到另一个抗原上的 scFv。在单个连续多肽链中,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隔开。双特异性单链抗体的非限制性实例以及制造它们的方法在以下文献中给出:WO 99/54440, WO 2004/106381, WO2007/068354, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-70; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-5;Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-7; Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-103;Briihl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426。

[0042] 如本文所使用的,“CD3”表示在 T 细胞,优选在人 T 细胞上作为多分子 T 细胞受体复合体的一部分而表达的抗原,CD3 由五种不同的链组成:CD3- ϵ 、CD3- γ 、CD3- δ 、CD3- η 和 CD3- ζ 。CD3 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 细胞亚型克隆特异性的激活。因此,如本文所使用的,术语“CD19xCD3 双特异性单链抗体”涉及能够结合到在 T 细胞上表达的人 CD3 复合体上、并能够诱导靶细胞消除 / 裂解的 CD3 特异性构建体,其中此种靶细胞携带 / 展示与双特异性单链抗体的其它非 CD3 结合部分

结合的抗原。如本领域已知的, CD3 复合体与 CD3 特异结合物(例如根据本发明药学方式和方法给予的双特异性单链抗体)的结合导致 T 细胞激活;参见,例如 WO 99/54440 或 WO 2007/068354。因此,适合本发明药学方式和方法的构建体可以有利地在体内和/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,该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、WO 2004/106381 或 WO 2007/068354 中描述的对人 CD19 的特异性。根据这个实施例,双特异性单链抗体的每个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:

[0043] $V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ 。

[0044] 在本发明含义内,术语“特异地结合”或相关术语如“特异性”应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,或这个抗体与其结合位置的结合有多强)。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(peptide-spot epitope mapping)或质谱法测定。抗体结合到特定表位上的强度可以有利地通过例如已知的 Biacore 和/或 ELISA 法测定。这些技术的联合使得可以将信号:噪声比(信/噪比)计算为结合特异性的代表量度。在此种信号:噪声比中,该信号代表抗体结合感兴趣表位的强度,而该噪声代表抗体结合其它不同于感兴趣表位的非相关表位的强度。将各个感兴趣表位的、例如至少为 50,但优选大约为 80 的信号:噪声比作为所评估抗体以特异方式结合感兴趣表位、即为“特异结合物”的指标,其中该信号:噪声比例如通过 Biacore、ELISA 或 FACS 测定。术语“结合到/与……相互作用”也涉及由人靶分子或其部分的两个或甚至更多区域组成的构象表位、结构表位或非连续表位。构象表位由两个或多个从一级序列中分离的不连续氨基酸序列限定,其中当多肽折叠成天然蛋白质时该不连续氨基酸序聚集在分子表面上(Sela, (1969)Science 166, 1365 和 Laver, (1990)Cell 61, 553-6)。术语“非连续表位”表示由多肽链间隔部分的残基组装成的非线性表位。当该多肽链折叠成三维结构时,这些残基聚集在分子表面上从而构成构象/结构表位。

[0045] 如本文使用的术语“治疗”在广义上表示旨在减轻疾病的医学方法或应用。在本发明的情况下,给予如本文描述的(制备用于给予小儿 ALL 患者的)CD19xCD3 双特异性单链抗体是为了治疗、改善或消除小儿 ALL 疾病。

[0046] 如本文使用的术语“改善”与改进是同义词。如果小儿 ALL 患者病况得到改善,则该患者明显变好——她或他的临床病况有一些改进。例如,如果可以使 ALL 疾病稳定,即 ALL 疾病不再发展,则该 ALL 患者病况可以有所改进。这个疾病阶段也称为病情稳定。改善还可以是小儿 ALL 患者的 MRD 状态的改进。例如,在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗之前,可在该小儿 ALL 患者的每 10^4 个骨髓细胞中检测到 100 个白血病细胞。由于用 CD19xCD3 双特异性单链抗体进行治疗,在这个示例情况下每 10^4 个骨髓细胞中的白血病细胞数目可减少到 10 个白血病细胞或甚至更少的白血病细胞(例如,少于 1 个白血病细胞)。

[0047] 如本文使用的术语“消除”表示从小儿 ALL 患者身体内除去白血病细胞。如以下实施例所示,给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体可以将 MRD 阳性急性淋巴细胞白血病(ALL)转变成 MRD 阴性状态,即,未检测到 MRD 的状态($< 10^{-4}$,即,每 10^4 个骨髓细胞中可检测到少于 1 个的白血病细胞)。在这种情况下,达到完全分子缓解。

[0048] 如本文使用的术语“给予（或给药）”表示向个体，即人类小儿患者，给予治疗有效剂量的前述 CD19xCD3 双特异性单链抗体（优选 SEQ IDNO. 1 中示出的抗体）。“治疗有效量”表示对给予其的对象产生效果，即足以杀灭急性淋巴细胞白血病细胞的剂量。优选地，CD19xCD3 双特异性单链抗体的给予剂量消除了该小儿患者身体内的所有急性淋巴细胞白血病细胞，形成如本文限定的 MRD- 阴性 ALL 状态。确切剂量依赖于治疗目的，并且可通过本领域技术人员利用已知技术确定。主治医生和临床因素决定给药方案。如医学领域所熟知的，任一个小儿患者的剂量都取决于许多因素，包括小儿患者尺寸、身体表面积、年龄、体重、待给予的特定化合物、性别、给予时间和给予途径、总体健康状态以及其它同时给予的药物。

[0049] 典型的剂量可以例如设定在本发明方法和方式的实施方式，以及所附实施例列出的范围内；但是，尤其是考虑前述因素，设计了低于或高于这个示例范围的剂量。

[0050] 术语“连续输注”指的是允许在一段时间内持久进行的输注，即没有中断。“连续输注”指的是持久给予的输注。因此，在本发明上下文中，术语“持久的”和“连续的”用作同义词。在本发明的含义内，例如术语“通过连续输注给予（至少）4 周”等表示下列情形，即在本发明药学方式和方法所需的整个持续时间内，以持续、恒定的方式向小儿患者身体连续给予根据本发明药学方式和方法中使用的 CD19xCD3 双特异性单链抗体（至少）4 周的时间。CD19xCD3 双特异性单链抗体的连续给予方案更详细地描述在 WO 2007/068354 中。避免中断 CD19xCD3 双特异性单链抗体的导入，也就是说除了补充供给所给予的 CD19xCD3 双特异性单链抗体或必要的医学干预等之外，在本发明药学方式和方法所需的整个给予持续时间内不因为其它原因出现或显著出现下列转变，所述转变为从正向小儿患者身体给予这个抗体的状态转变为不再向小儿患者身体给予这个抗体的状态。就此种必需的补充导致所给予抗体的导入短暂中止而言，此种给予在本发明的药学方式和方法含义内仍应理解为“不中断的”或“持久的”。在大部分情况中，此种再给予的持续时间一般如此短，以致于未向小儿患者身体导入抗体的时间相比按照根据本发明药学方式和方法的整个给予方案计划的时间是非常小而趋于零的。根据本发明，一个治疗周期可以理解为向该 ALL 患者连续输注 CD19xCD3 双特异性单链抗体（至少）4 周时间，在此之后是 2 周无治疗间隔期。如本文使用的术语“至少”表示该连续输注也可以进行长于 4 周的时间，例如 5、6、7、或 8 周或甚至更长，在此之后是 2 周无治疗间隔期。可能有这样的情况，即在（至少）4 周连续给予（或一个治疗周期）之后对受治疗小儿患者（或多个小儿患者）进行 MRD 分期时，可以获得最低或部分的响应，但无法获得 MRD 阴性。在此种情况下，该连续给予可以延长另外的一、二、三、四、五或甚至多达十个治疗周期，以便获得更好的治疗结果，例如，完全血液响应或甚至完全分子响应。优选地，所述完全分子响应是 MRD 阴性（如以下限定的），其降低了该 ALL 疾病反复出现的风险。例如，已发现，小儿 ALL 患者在同种异体 HSCT 之前的 MRD- 阴性或低 MRD 水平降低了复发风险 (Bader P, et al., J Clin Oncol 27(2009) :377-384)。如以下实施例所示，MRD 阴性可以通过用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗小儿 ALL 患者获得。

[0051] 所以，在本发明药学方法和方式的一个实施方式中，一个或多个治疗周期之后将进行同种异体 HSCT，在该治疗周期中将 CD19xCD3 双特异性单链抗体连续给予小儿 ALL 患者。换言之：在这个优选的实施方式中，本发明方法在同种异体干细胞移植 (HSCT) 之前进行，以便将 MRD 阳性 ALL 转变成 MRD 阴性状态。这样，显著降低了复发风险。

[0052] 在本发明方法的另一个实施方式中,该方法在同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 之后进行。

[0053] 该移植步骤之后可以用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗的一个或进一步的治疗周期 (或多个治疗周期)。在患者已接受化疗和 HSCT 的复发性小儿 ALL 的情况下,这个实施方式是重要的。由于这些常规疗法的失败,该疾病可能复发,且现已通过给予所述抗体而治愈。另外,利用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的治疗可在 HSCT 之后作为巩固疗法使用,以便避免 ALL 疾病的再次复发。

[0054] 以下实施例也提供了在同种异体 HSCT 之后使用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的数据,其中结合的 T 细胞是供体来源的。可以观察到通过用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗,在不存在移植物抗宿主病 (GvHD) 的情况下对同种异体造血 HSCT 之后化疗难治性复发的两个 CD19+ALL 患者强有力地诱导的移植物抗白血病 (GvL) 效应。所以,在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中,该小儿 ALL 患者在她 / 他已接受同种异体 HSCT 之后,可以用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗。

[0055] 在最好的情况下,设计了, CD19xCD3 双特异性单链抗体可以代替诸如化疗和 / 或同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 的常规小儿 ALL 疗法治疗小儿 ALL 患者。

[0056] 如以下实施例所示,用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者可以将该患者身体内的急性淋巴细胞白血病细胞消除到检测限以下。优选地,向 ALL 小儿患者单独地给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体或者联合同种异体 HSCT 给予其主要治疗目的在于将 MRD- 阳性状态转变成 MRD- 阴性状态,使患者如本文以下限定的无白血病生存。如本文所证明,在 CD19xCD3 双特异性单链抗体已经连续给予五周 (患者 1) 或四周 (患者 2) 的第一治疗周期之后,MRD- 阳性小儿 ALL 患者转变成 MRD 阴性。在该治疗周期之后将对患者 1 进行单倍型 HSCT。截至 2009 年 11 月,该患者仍然处于 MRD- 阴性完全缓解,即无肿瘤状态中。

[0057] 根据本发明的药学方式和方法连续不中断地给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体一段较长的时间,使该实施例所述有利的 T 细胞激活能够在足够长的时间内发挥其作用从而有利地清除身体内的所有急性淋巴细胞白血病细胞。因为不中断地给予双特异性单链抗体的速率维持在低水平上,所以治疗剂的使用可以持续较长时间,而不具有对患者产生有害副作用的风险。

[0058] 如本文使用的 CD19xCD3 双特异性单链抗体,有利地制备成向诊断患有急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的人类小儿患者给予的药物组合物形式。所述 ALL 可以是初次诊断的 ALL、化疗和 / 或同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 难以治疗的 ALL、复发性 ALL 或者化疗和 / 或同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 难以治疗的复发性 ALL。

[0059] 在本发明药学方法和方式的优选实施方式中,所述小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 是小儿 B- 系急性淋巴细胞白血病 (ALL), 优选小儿 B- 前体急性淋巴细胞白血病。绝大多数小儿 ALL 病例 (> 85%) 为 B 前体细胞表型。已经提出数个 B- 细胞系的 ALL 分类 (参见,例如, Schultz 等人, Blood109(2007) :926-935)。为了相对于患者复发风险调节治疗强度,目前利用实验室和临床参数:患者年龄、性别、疾病出现 (disease presentation) 时的白细胞计数 (CBC)、以及特殊细胞遗传学异常存在与否,将 B 前体 ALL 患者分为“低”、“标准”、“高”或“非常高”的风险组。帮助限定这些风险组的频繁地反复出现的遗传异常例如包

括:t(12;21)[TEL-AML1];t(1;19;)[E2A-PBX];t(4;11)[AF4-MLL];t(9;22)[BCR-ABL];超二倍体(或4、10和17号染色体三体)、以及亚二倍体;参见例如Schultz等人、Bader等人,loc.Cit.利用从各个研究中获得的数据,已开发并实施的分类系统为COG AALL03B1(急性淋巴细胞白血病的分类)(Raetz等人,Personalized Med.2(2005),349-361;Schultz等人,Blood 109(2007):926-935)。因为本文描述的CD19xCD3双特异性单链抗体是针对与B细胞关联的标记CD19的抗体,所以所述抗体特别适合作为小儿B-系急性淋巴细胞白血病的治疗剂,优选用作小儿B-前体ALL的治疗剂。小儿B-前体ALL可以进一步地再分为小儿祖B细胞ALL、前B细胞ALL和普通ALL(cALL)。如以下实施例所示,用根据本发明的方法对任何治疗方式都难以治疗并因此有致命倾向的普通ALL的7岁患者1进行治疗,不但获得完全血液缓解,而且获得完全分子缓解。换言之:在用CD19xCD3双特异性单链抗体治疗之后,在这个患者中不再能检测到微小残留病变。特别优选地,该小儿急性淋巴细胞白血病(ALL)是B-前体ALL,更优选cALL。重要地,CD19xCD3双特异性单链抗体不仅可以杀灭具有TCR或免疫球蛋白重排的ALL细胞,而且可以杀灭具有各种其它细胞遗传学异常的ALL细胞:例如,已发现在以下实施例中描述的患者2以及成人ALL患者中,所述抗体可以治疗以免疫球蛋白或TCR重排、t(4;11)易位或bcr/abl融合转录物(Ph+)为特征的ALL。特别地,Ph+ALL和带有t(4;11)易位的ALL被报道极难通过常规ALL疗法治疗,但可以通过CD19xCD3双特异性单链抗体成功地治疗。上述数据表明,CD19xCD3双特异性单链抗体可以治疗各种形式的ALL,包括例如以t(12;21)[TEL-AML1];t(1;19;)[E2A-PBX];t(4;11)[AF4-MLL];t(9;22)[BCR-ABL];超二倍体(或4、10和17号染色体三体)、亚二倍体以及免疫球蛋白或TCR重排为特征的ALL;也参见表1。

[0060] 小儿ALL的诊断基于该细胞的形态学、细胞化学和免疫学特征进行,这些特征包括Wright-Giemsa染色的骨髓涂片上的淋巴母细胞形态、末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)阳性染色、髓过氧化物酶阴性染色,以及2个或更多B-细胞前体淋巴分化抗原的细胞表面表达。免疫分型例如由Behm F.G.(Immunophenotyping,在:Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge:Cambridge University Press;2006, p.150-209)描述,并可通过例如间接免疫荧光法、免疫组织化学和/或流式细胞术进行。

[0061] 如本文所使用的,术语“患者”是指人患者。本文提到的术语“小儿ALL”或“小儿ALL患者”表示年龄为1个月~18岁的儿童。所指出的年龄应理解为该儿童在诊断ALL疾病时的年龄。儿童可以更具体地再分为幼儿(1~12个月龄)、年龄为1~9岁的年幼儿童,以及年长儿童和青少年($\geq 10 \sim 18$ 岁)。如本文所使用的,限定为“X~Y”的时间间隔与限定为“在X和Y之间”的时间间隔等同。这两个时间间隔都具体地包括上限和下限。这是指,例如“1个月~18岁”的时间间隔包括“1个月”和“18岁”。优选地,根据本发明待治疗的患者最大为18岁(包括年龄为18岁的患者)。

[0062] 如以下实施例所示,患者1在7岁时用CD19xCD3双特异性单链抗体治疗,他在2岁时诊断出ALL。患者1在15岁时用CD19xCD3双特异性单链抗体治疗,他在2001年诊断出ALL。

[0063] 上面的定义原则上适用于术语“小儿急性淋巴细胞白血病(ALL)”、“儿童ALL”等。例如,小儿或儿童ALL应理解为对年龄在1个月(包括1个月)和18岁(包括18岁)之间的小儿患者诊断出的ALL。

[0064] 虽然如本文使用的 CD19xCD3 双特异性单链抗体可以单独给予,但优选在药学上可接受的载体中给予。合适的药物载体的实例在本领域中是熟知的,并包括磷酸盐缓冲盐溶液、水、脂质体、各种类型的湿润剂、无菌溶液等。包含此种载体的组合物可以根据熟知的常规方法配制。这些药物组合物可以合适的剂量给予小儿患者。给药方案由主治医生和临床因素决定。如医学领域所熟知的,任一小儿患者的剂量都取决于许多因素,包括患者尺寸、身体表面积、年龄、体重、待给予的特定化合物、性别、给予时间和给予途径、总体健康状况以及其它同时给予的药物。肠胃外给予的制剂包括无菌水性或非水溶液,或悬浮液。非水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇和可注射有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、水溶液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒剂(vehicles)包括氯化钠溶液、林格氏(Ringer's)右旋糖、右旋糖和氯化钠,或者乳酸化林格氏液。静脉内媒剂包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏右旋糖的那些)等。还可以存在防腐剂和/或其它添加剂,如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。另外,该组合物可以包括蛋白质类载体,例如血清白蛋白或免疫球蛋白,其优选为人源的。还设计了,该组合物除了包含蛋白质类双特异性单链抗体之外,还包括进一步的生物活性剂,这取决于该药物组合物的预期用途。此种药剂可以是作为细胞抑制剂(cytostatica)的药剂、预防高尿酸血症(hyperurikemia)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-细胞共刺激分子或本领域已知的细胞因子等药剂。例如,用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的治疗可以联合诸如 CNS 预防、皮质激素和/或别嘌呤醇的鞘内化疗进行。

[0065] 优选地,将如本文限定的 CD19xCD3 双特异性单链抗体配制在缓冲液、稳定剂和表面活性剂中。该缓冲液可以是磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液或醋酸盐缓冲液。该稳定剂可以是氨基酸(或多种氨基酸)和/或糖。该表面活性剂可以是清洁剂、PEG 等。更优选地,将如本文限定的 CD19xCD3 双特异性单链抗体配制在柠檬酸盐、赖氨酸、海藻糖和吐温 80 中。作为本发明药物组合物的稀释剂,优选等渗盐水和吐温 80。

[0066] 优选地,在本发明药学方法和方式中,所制备的药物组合物用于给予诊断为患有急性淋巴细胞白血病(ALL)的人类小儿患者。

[0067] 可根据针对各个病种确立的标准方法监测 CD19xCD3 双特异性单链抗体疗法成功与否:对于 B 细胞 ALL 治疗,可以使用荧光激活细胞分选(FACS)、骨髓穿刺和各种白血病的具体临床化学参数以及本领域中已知所确立的其它标准方法。本文描述了微小残留病变(MRD)状态的测定方法和方式。

[0068] CD19xCD3 双特异性单链抗体的细胞毒活性可以通过本领域已知的方法和例如 WO 99/54440、WO 2004/106381、WO 2007/068354 中给出的方法检测。

[0069] 在本发明药学方法和方式的优选实施方式中,小儿患者(或多个小儿患者)的 B-前体 ALL 是复发性和/或难治性的。利用现行的儿童 ALL 治疗方式,无事故存活率约为 75%。所以尽管进行毒性和健康风险治疗,仍有 25%的患者会复发。ALL 复发处理中的问题是:白血病细胞的抗性,以及小儿患者在已接受第一线强化治疗之后对第二轮治疗的耐受性降低,导致缓解率降低以及随后复发的发病率增大和总体疗效下降。于是,强化综合化疗是诱导第二次完全缓解所必需的(Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. 在:Childhood Leukemias, C-H Puied. Cambridge :Cambridge University Press ;2006, p. 473-486)。如本文使用的术语“化疗和/或同种异体干细胞移

植难以治疗的”是指小儿 ALL 患者对这些疗法有抗性,因而在常规 ALL 治疗后复发。还可以设计,在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗之后复发的小儿患者接受一个或多个利用所述抗体的进一步的治疗周期,以便使受治疗儿童 MRD 变成阴性。所述患者然后可以例如接受第二次同种异体 HSCT。

[0070] 如以下实施例所示,本发明药学方法和方式特别适于治疗对常规 ALL 疗法有抗性的小儿患者。尽管所示小儿患者已用化疗和同种异体干细胞移植进行大量地预处理,但该患者多次复发。所以该患者预后极差。然而,在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗之后,该患者为 MRD 阴性,即,表现出完全分子缓解。换言之:该治疗将小儿患者身体内的急性淋巴细胞白血病细胞消除到检测限以下。最重要地,已清除了该小儿患者骨髓中的白血病细胞。

[0071] 在本发明药学方法和方式的优选实施方式中,就 MRD 而言,小儿患者(或多个小儿患者)的急性淋巴细胞白血病(ALL)是化疗和/或同种异体 HSCT 难以治疗的。换言之:小儿 ALL 患者的 MRD 对化疗和/或同种异体 HSCT 有抗性。

[0072] 可以预期本发明药学方式和方式还适用于治疗初次诊断的小儿 ALL,因为它提供了诸如化疗和/或同种异体 HSCT 的常规小儿 ALL 治疗方案的替换方式。

[0073] 在进一步优选的实施方式中,所述急性淋巴细胞白血病(ALL)在诊断后三年内复发,优选在诊断后两年内复发,甚至更优选在诊断后一年内复发。优选地,所述复发是骨髓复发。

[0074] 如本文使用的术语“化疗”表示用于治疗小儿急性淋巴细胞白血病(ALL)的化疗。化疗是为小儿 ALL 选择的初步治疗(参见例如 Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6(2007):149-165; Schmiegelow K, Gustaffson G. Acute lymphoblastic leukemia. 在: Cancer in Children: Clinical Management. Voute PA, Barret A, Stevens MCG, Caron HN(eds). London, UK, Oxford University Press, 2005, p. 138-170; Schmoll, Hbfffken, Possinger, loc. cit.)。大多数小儿 ALL 患者最终要接受联合的不同治疗。在治疗小儿 ALL 时,由于肿瘤细胞呈全身性分布,所以不存在手术选择。一般地,小儿 ALL 的细胞毒化疗以各种联合方式联合多种抗白血病药物。小儿 ALL 的化疗由三个阶段组成:缓解诱导、强化治疗和维持治疗。化疗也适合于保护中枢神经系统不受白血病损害。缓解诱导的目的在于迅速地杀灭大多数肿瘤细胞并使该小儿患者进入完全血液缓解期。这定义为骨髓中存在的白血病原细胞少于 5% (如通过光学显微术测定)。例如,可以单独或组合使用氯法拉滨(Clofarabine)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、VP16、安吡啶(Amsacrine)、强的松(Prednisone)、美法仑(Melphalan)、或阿糖胞苷(Cytarabine)诱导缓解。强化治疗使用大剂量的静脉内多种药物化疗从而进一步减轻肿瘤负荷。典型的强化方案以不同的组合使用给予的长春新碱(vincristine)、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊甙(etoposide)、硫鸟嘌呤(thioguanine)或巯基嘌呤(mercaptopurine)作为阻断剂(blocks)。因为 ALL 细胞有时透入中枢神经系统(CNS),所以大多方案都包括将化疗药物递送到 CNS 流体中,通常称为鞘内化疗。一些肿瘤中心通过奥马耶贮器(Ommaya reservoir)(通过手术放入头皮下并用于将药物递送到 CNS 流体中和用来提取各种测试用 CNS 流体的装置)递送药物。其它肿瘤中心根据测试和治疗递送的需要进行多点腰椎穿刺。鞘内甲氨蝶呤或阿糖胞苷通常用于这个目的。维持治疗的目的在于杀灭任何未被缓解诱导和强化

方案杀灭的残留细胞。虽然此类细胞数目很少,但是若不根除它们将导致复发。为了这个目的,可以每日口服巯基嘌呤、每周口服一次甲氨嘌呤、每月静脉内注射一次 5 天疗程的长春新碱。维持治疗的时间对于男孩是 3 年,而对于女孩和成人是 2 年。神经系统复发可通过鞘内给予氢化可的松 (hydrocortisone)、甲氨嘌呤和阿糖胞苷来治疗。因为化疗方案可能是长期的强化治疗 (intensive and protracted) (在 GMALL UKALL、HyperCVAD 或 CALGB 方案的情况下通常约为 2 年,在 COG 方案的情况下对于男性约为 3 年),所以许多患者将静脉内导管插入到大静脉中 (称为中枢神经系统导管或 Hickman 线)、或 Portacath (锥形管 (cone-shaped port)),其具有通过手术植入通常接近锁骨的皮肤下的硅树脂探头 (silicone nose))。然而,化疗仍然是高毒性方法,特别是对于小儿患者。

[0075] 患者在初步治疗之后可能会经受 ALL 复发,和 / 或在治疗之后变得难以用化疗治疗。化疗难以治疗的小儿 ALL 患者预后非常差。特别地,仅用化疗治疗的 Ph+ALL 小儿患者或带有 t(4;11) 易位的 ALL 小儿患者预后差。因为本发明方法能够使小儿 ALL 患者 MRD 变成阴性,所以它对化疗和 / 或同种异体 HSCT 难以治疗的 ALL 患者的治疗特别有用。鉴于这点,如本文使用的术语“化疗和 / 或同种异体 HSCT 难以治疗的”表示急性淋巴细胞白血病细胞对化疗和 / 或同种异体 HSCT 有抗性。

[0076] 如本文使用的术语“同种异体造血干细胞移植 (HSCT)”表示涉及造血干细胞 (HSC) 移植的同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 或骨髓移植,其是血液学和肿瘤学领域中的医学方法。它最经常对血液或骨髓疾病患者,或特定类型的癌症患者,如 ALL 患者进行。大多数 HSCT 接受者是可从以大剂量化疗或全身照射治疗中受益的白血病 (例如 ALL) 患者。对 ALL 儿童的同种异体 HSCT 描述在,例如 Schrauder A, 等人 (Bone Marrow Transplantation 41(2008) :Suppl2S71-74) 中。然而,同种异体干细胞移植仍然是有风险的步骤,特别是对于小儿患者。

[0077] 如本文使用的术语“符合同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 条件的”是指同种异体干细胞移植是小儿 ALL 患者所需要的疗法。在小儿 ALL 患者符合同种异体干细胞移植条件的这种情况下,可以设想以下的两种情形。第一,在本发明药学方法和方式的一个实施方式中,可给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体 (单独地或优选以药物组合物形式) 以代替符合移植条件的小儿 ALL 患者作为常规疗法的同种异体干细胞移植。所以本发明方法可以使小儿 ALL 患者避免与同种异体 HSCT 相关的健康风险。另外,接受移植的小儿 ALL 患者当中,通常有约 30% 患者在移植之后复发。所以本发明方法可用来治疗这些患者。在替换实施方式中,可以在向小儿 ALL 患者连续输注 CD19xCD3 双特异性单链抗体之后进行同种异体干细胞移植。在这个实施方式中,可通过给予包含 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的药物组合物将符合移植条件的小儿 ALL 患者转变成 MRD 阴性状态,之后才让他们接受移植。这样,本发明方法可用来消除 MRD,这使得 MRD- 阳性患者移植治疗的复发风险降低。以下实施例描述了小儿患者 (患者 1),该患者首先在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗后转变成 MRD 阴性状态,然后接受了同种异体移植。至今 (2009 年 11 月),这个小儿患者仍然为 MRD 阴性。

[0078] 如本文使用的术语“不符合同种异体造血干细胞移植 (HSCT) 条件的”是指这些小儿患者,由于例如医学原因,对于这些患者而言同种异体干细胞移植不是可选择的 ALL 治疗方法。也有可能发生的是,没有可供同种异体干细胞移植用的合适供体。

[0079] 因此,在一个实施方式中,不符合或不再符合同种异体 HSCT 条件的小儿患者的急

性淋巴细胞白血病 (ALL) 是化疗和 / 或同种异体 HSCT 难以治疗的。例如, 小儿患者可能处在如此差的临床病况下, 以致由于医学原因而无法进行同种异体干细胞移植。

[0080] 以下实施例所示患者 1 由于其健康状态差而在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗之前已不符合同种异体干细胞移植条件。在此种情况下, 用 CD19xCD3 双特异性单链抗体的治疗提供了小儿 ALL 的新治疗途径。

[0081] 到目前为止, 对于化疗难以治疗和不符合同种异体 HSCT 条件的小儿患者而言 ALL 意味着死刑。本发明方法首次为这种小儿患者群体提供了疗法, 因为它消除了微小残留病变 (MRD), 否则 MRD 将导致复发并最终使所述患者死亡。

[0082] 在本发明药学方法和方式的范围内, 可以向已接受单独的或与同种异体干细胞移植联合的化疗, 并在此后复发的小儿 ALL 患者给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体。

[0083] 在另一个优选实施方式中, 本发明方法用于治疗、改善或消除急性淋巴细胞白血病 (ALL) 小儿患者的微小残留病变 (MRD)。

[0084] 如本文使用的术语“微小残留病变 (MRD)”是指在例如用化疗治疗之后, 当利用标准试验如显微术无法在骨髓中找到白血病细胞时使用的术语。但是, 需利用更灵敏的试验如流式细胞术 (基于 FACS 的方法) 或聚合酶链反应 (PCR), 以发现该小儿 ALL 患者骨髓中残留有白血病细胞的证据。更具体地, 所存在的白血病细胞数少于细胞学检测限 (5% 白血病细胞) 被定义为微小残留病变 (MRD)。如果未检测到 MRD ($< 10^{-4}$, 即每 10^4 个骨髓细胞中可检测到的白血病细胞少于 1 个), 则达到完全分子缓解 (MRD 阴性或 MRD 阴性状态)。如本文定义的“MRD 阳性状态”表示通过 PCR 或 FACS 测得的信号高于检测限或定量阈值 (quantitative threshold)。如本文定义的“MRD 阴性状态”表示低于通过 PCR 或 FACS 测得的检测限和 / 或定量阈值。儿童 ALL 微小残留病变量化的预后价值已描述在例如 Bader 等人 (J. Clin. Oncol. 27(2009):377-384) 或 Eckert 等人 (Lancet 358(2001):1239-41) 中。该 MRD 状态可以通过 PCR 或 FACS 分析测得, 因为本文所述单独细胞遗传学异常和 / 或免疫球蛋白基因重排或 T- 细胞受体 (TCR) 重排可被定量检测。例如, PCR 分析可以检测融合转录物如 bcr/abl 或 t(4;11) 易位以及单独克隆性免疫球蛋白 (IgH) 和 / 或 T- 细胞受体基因 (TCR) 重排。

[0085] 如以下实施例所证明的, 在用本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗后, 可以消除小儿 ALL 患者身体内的所有急性淋巴细胞白血病细胞, 以便可以获得完全分子缓解 (即, MRD 阴性状态)。

[0086] 小儿和成人急性淋巴细胞白血病患者恶性肿瘤细胞中反复出现的染色体异常是该疾病的标志 (Harrison and Feroni, Rev. Clin. Exp. Hematol. 6(2002), 91-113)。经常表示潜在分子一致性 (consistent) 病变的特定畸变可能有助于诊断或甚至可以确定诊断以及决定最佳疗法。在儿童 ALL 中, 已识别到许多良好的和高风险的细胞遗传学亚群, 该亚群经常用于将患者分为特定治疗组 (Pui and Evans, N. Engl. J. Med. 354(2006), 166-178)。在成人 ALL 中, 细胞遗传学在患者管理中的作用主要集中于费城 (Ph) 染色体的存在上, 费城染色体通常由 t(9;22)(q34;q11.2) 形成并导致 BCR-ABL 融合 (Faderl 等人, Blood 91(1998), 3995-4019)。虽然在成人中 Ph+ALL 的总体发病率近似为 25%, 但它与年龄相关且在 55 岁以上的患者当中该发病率已上升到高于 50% (Appelbaum, American Society of Clinical Oncology 2005 education book. Alexandria: ASCO, 2005: 528-532)。与急性淋

巴细胞白血病 (ALL) 中特定分子遗传学异常相关的其它细胞遗传学易位在表 1 中给出, 并也描述在 Schultz 等人或 Bader 等人, loc. Cit 中。

[0087] 表 1:

[0088]

细胞遗传学易位	分子遗传学异常
t(9 ;22) (q34 ;q11)	BCR-ABL 融合 (P185)
t(12 ;21)CRYPTIC	TEL-AML1 融合
t(1 ;19) (q23 ;p13)	E2A-PBX 融合
t(4 ;11) (q21 ;q23)	MLL-AF4 融合
t(8 ;14) (q24 ;q32)	IGH-MYC 融合
t(11 ;14) (p13 ;q11)	TCR-RBTN2 融合

[0089] 已日益认识到细胞遗传学是 ALL 疗效的重要预测因子 (predictor) (Moormann 等人, Blood 109(2007), 3189-97)。

[0090] 一些细胞遗传学亚型的预后比其它亚型差。这些包括, 例如:

[0091] (i) 染色体 9 和 22 之间的易位, 费城染色体 (Ph+) 发生在约 20% 的成人和约 5% 的 ALL 小儿病例中。

[0092] (ii) 染色体 4 和 11 之间的易位发生在约 4% 的病例中, 最常见于 12 个月以下的幼儿中。

[0093] 现有技术 (参见, 例如 Szczepanski 等人, Leukemia 12(1998), 1081-1088) 描述了免疫球蛋白基因重排或 T- 细胞受体 (TCR) 重排及其在 ALL 中的作用。

[0094] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, 所述小儿 ALL 患者在完全血液缓解期为 MRD- 阳性。

[0095] 如本文所使用的, 术语“缓解”或“完全血液缓解”应理解为在标准处理之后, 例如在化疗和/或移植之后没有 ALL 疾病的证据。这意味着通过光学显微术测定, 该骨髓包含少于 5% 的原细胞, 血细胞计数在正常界限范围内, 且不存在 ALL 疾病的征象或症状。虽然如此, 仍可能发生的是, 并非所有白血病细胞都可以从身体中消除。此种患者, 尽管分期处在缓解或完全血液缓解期, 但仍然是 MRD 阳性的。这些残留的肿瘤细胞可以引起复发性白血病。本发明药学方式和方法可以用来杀灭这些残留的肿瘤细胞以便阻止初次治疗 (primary therapy) 之后残留在身体内的隐匿性白血病细胞 (occult leukemia cells) 引起的白血病复发。这样, 该药学方式和方法有助于阻止小儿 ALL 患者的疾病复发。

[0096] 相比之下, “分子完全缓解”是指在骨髓的活组织检查中, 即使利用非常灵敏的试验如 PCR 或 FACS 分析, 也没有发现白血病细胞的证据。换言之: 如果未检测到 MRD ($< 10^{-4}$, 即每 10^4 个骨髓细胞中白血病细胞少于 1 个), 则达到完全分子缓解。

[0097] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, 给予所述药物组合物使 MRD- 阳性小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 转变成 MRD 阴性状态。

[0098] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, MRD 通过定量检测至少一种细胞遗传学异常或重排来测量, 该细胞遗传学异常或重排选自以下组中:

[0099] t(12 ;21) [TEL-AML1] ;

[0100] t(1 ;19 ;) [E2A-PBX] ;

[0101] t(4 ;11) [AF4-MLL] ;

[0102] t(9 ;22) [BCR-ABL] ;

[0103] 超二倍体或同时发生的 4、10 和 17 号染色体三体 ;

[0104] 亚二倍体 (即, 少于 44 个染色体) ;

[0105] 免疫球蛋白基因重排 ;和

[0106] T- 细胞受体 (TCR) 重排。

[0107] MRD 通过定量检测 (i) 本文所述单独细胞遗传学异常如 t(12 ;21) [TEL-AML1] ; t(1 ;19 ;) [E2A-PBX] ;t(4 ;11) [AF4-MLL] ;t(9 ;22) [BCR-ABL] ;超二倍体 (或同时发生的 4、10 和 17 号染色体三体)、亚二倍体 (即, 少于 44 个染色体), 或 (ii) 免疫球蛋白基因重排或 T- 细胞受体 (TCR) 重排中的至少一种来测量 ;也参见表 1。所述细胞遗传学异常或重排的定量检测优选通过利用例如 PCR 或 FACS 分析进行。

[0108] 本发明方法提供了治疗、改善或缓解 MRD 的治疗方法, 从而降低或者甚至消除小儿 ALL 患者复发的风险。值得注意的是, 小儿 ALL 患者 MRD 的治愈性治疗迄今还无法实现。

[0109] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, 所述有 MRD 的小儿患者显示出高于检测限的细胞遗传学异常的信号, 和 / 或至少一种灵敏度 $\geq 10^{-4}$ 通过重排的标记。优选地, MRD 通过 PCR 和 / 或 FACS 分析检测。

[0110] 本文所述单独细胞遗传学异常包括例如, t(12 ;21) [TEL-AML1] ;t(1 ;19 ;) [E2A-PBX] ;t(4 ;11) [AF4-MLL] ;t(9 ;22) [BCR-ABL] ;超二倍体 (或 4、10 和 17 号染色体三体)、亚二倍体。该重排包括例如免疫球蛋白基因重排或 T- 细胞受体 (TCR) 重排 ;也参见表 1。携带所述细胞遗传学异常和 / 或重排的 ALL 细胞所表现的 MRD 可以通过 PCR 或 FACS 分析检测。

[0111] 例如, 如本文所使用的, 术语“高于检测限的 bcr/abl 信号”是指 PCR 或 FACS 分析产生可检测的 bcr/abl 信号。类似地, t(4 ;11) 易位信号是指所述易位可以通过 PCR 或 FACS 检测。这在原则上适用于本文所述其它细胞遗传学异常或重排。与重排有上下文关系 (in context with) 的术语“灵敏度 $\geq 10^{-4}$ ”是指通过所述方法在每 10^4 个骨髓细胞中可以检测到至少 1 个或多于 1 个的白血病细胞 (带有所述 TCR 或免疫球蛋白重排)。

[0112] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, (可通过上述测定法检测到的) 分子复发时间大于 6 个月, 优选大于 7、8、9、10、11 或 12 个月, 或甚至优选 2、3、4、5 或更多年。

[0113] 如本文所使用的, 术语“分子复发”是指所述小儿患者通过上述 PCR 和 / 或 FACS, 显示出高于检测限的细胞遗传学异常的信号, 和 / 或至少一种灵敏度 $\geq 10^{-4}$ 通过重排的标记。

[0114] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, 相应可变重链区 (V_H) 和相应可变轻链区 (V_L) 在所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体中从 N- 末端至 C- 末端以 V_L (CD19)- V_H (CD19)- V_H (CD3)- V_L (CD3) 顺序排列。

[0115] CD19xCD3 双特异性单链抗体的 CD3 和 CD19 结合结构域的相应可变重链区 (V_H) 和相应可变轻链区 (V_L) 分别在 SEQ ID NO. 3 ~ 10 中示出。所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体的各个 VH 和 VL 区的相应 CDR 区示出在 SEQ ID NO. 11 ~ 22 中。

[0116] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, 所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体包含 SEQ ID NO. 1 中给出的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO. 1 有至少 90% 同一性, 优选至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0117] 本发明描述了 CD19xCD3 双特异性单链抗体分子, 其包含 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列, 以及与 SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列有至少 90% 或优选 95% 同一性, 最优选至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。本发明也描述了 SEQ ID NO. 2 所示的相应核酸序列, 以及与 SEQ ID NO. 2 所示的核酸序列有至少 90%, 优选 95% 同一性, 最优选至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性的核酸序列。应理解, 该序列同一性是对整个核苷酸或氨基酸序列确定的。而且, 应理解, 包含与 SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列有至少 90% 或优选 95% 同一性, 最优选至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的双特异性单链抗体分子含有 SEQ ID NO. 11 ~ 22 所示的所有 CDR 序列。对于序列比对, 例如可使用 Gap 或 BestFit 程序 (Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith and Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), 该程序包含在 GCG 软件包 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991) 中。对本领域技术人员而言, 确定和识别与本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体的核苷酸或氨基酸序列具有例如 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的核苷酸或氨基酸序列的方法是常规方法。例如, 根据 Crick's Wobble 假设, 反密码子上的 5' 碱基的空间受限程度 (spatially confined) 与其它两个碱基不一样, 因而可以具有非标准碱基配对。换言之: 三联体密码子 (codon triplet) 中的第三位置可以改变, 以便在这个第三位置上不同的两个三联体可以编码相同的氨基酸残基。所述假设是本领域技术人员所熟知的 (参见, 例如 http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966) :548-55)。此外, 对本领域技术人员而言, 测定与本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体的核苷酸或氨基酸序列具有例如 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的此种氨基酸序列细胞毒活性的方法也是常规方法。与 CD19xCD3 双特异性单链抗体的氨基酸序列具有例如 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的 CD19xCD3 双特异性单链抗体或抗体构建体的细胞毒活性可以根据例如 WO 99/54440、WO 2004/106381、WO 2007/068354 中示出的方法测定。

[0118] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中, 包含 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的药物组合物要通过连续输注给予至少 4 周, 在此之后是 2 周无治疗间隔期。一个治疗周期应理解为连续输注所述抗体至少 4 周, 在此之后是 2 周无治疗间隔期。这个间隔期之后又可以是一个或多个治疗周期或同种异体 HSCT。优选地, 在测得 MRD 阴性状态之后, 重复所述通过连续输注而给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体 (即一个治疗周期) 至少 2、3 次、4、5、6、7、8、9、或甚至多达 10 次, 以便巩固。

[0119] 在本发明药学方法和方式的一个实施方式中, 该方法在同种异体干细胞移植之前进行, 从而将 MRD 阳性 ALL 转变成 MRD 阴性状态。

[0120] 在本发明药学方法和方式的另一个实施方式中, 该方法在同种异体 HSCT 之后进行, 例如, 在使用化疗和 / 或同种异体干细胞移植的常规 ALL 疗法之后, 小儿 ALL 复发的情况

况下。

[0121] 在本发明药学方法和方式的另一个优选实施方式中,按每平米患者身体表面积 $10 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ 的每日剂量,给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体。

[0122] 如本文使用的、限定为“X ~ Y”的剂量范围与限定为“在 X 和 Y 之间”的剂量范围等同。该范围包括上限和下限。这是指,例如每平米患者身体表面积 $10 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ 的每日剂量包括“ $10 \mu\text{g}$ ”和“ $100 \mu\text{g}$ ”。

[0123] 在本发明药学方法和方式的甚至更优选的实施方式中,按每平米患者身体表面积 $15 \mu\text{g}$ 、 $30 \mu\text{g}$ 、 $60 \mu\text{g}$ 或 $90 \mu\text{g}$ 的每日剂量,给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体。甚至更优选按每平米患者身体表面积 $15 \mu\text{g} \sim 30 \mu\text{g}$ 的每日剂量给予所述抗体,最优选按每平米患者身体表面积 $15 \mu\text{g}$ 或 $30 \mu\text{g}$ 的每日剂量给予所述抗体。

[0124] 在根据本发明的方法或用途的上下文中计算的小儿患者平均身体表面积范围为约 $0.2 \sim 2.2\text{m}^2$ 。对于该计算,参见例如 <http://www.cato.eu/koerperoberflaeche-kinder.html> 提供的公式。

[0125] 在本发明药学方法和方式的另一个实施方式中,该小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 是初次诊断的、难治性或复发性小儿 ALL,或者难治性和复发性 ALL。如本文使用的初次诊断的小儿 ALL 是指该 ALL 疾病首次在该小儿患者中被诊断出。

[0126] 在本发明药学方法和方式的另一个实施方式中,所述方法是供这样的患者所使用的,即根据急性淋巴细胞白血病的 COGAALL03B1 分类具有高复发风险的患者。

[0127] 有利地,包含如本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体的药物组合物进一步可选地包含,(a) 反应缓冲液(或多种缓冲液)、贮备溶液和/或所述方法或用途所需的其余试剂或材料。此外,所述组分可以单独地封装在小瓶或瓶子中,或组合封装在容器或多容器单元中。

[0128] 为了评价如本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体的安全性和耐受性,通过长期连续输注给予该化合物。

[0129] 已发现,通过按每平方米身体表面积 $10 \mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g}$ 的每日剂量给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体,可以获得本发明药学方式和方法有益且出人意料的效果。该每日剂量可在给予期间保持恒定。然而,下列给予方式也在这个实施方式的范围之内:在本文描述的药物方法之前,在输注周期的初始日(或初始几日)给予较低剂量(“初始剂量”)的 CD19xCD3 双特异性单链抗体,而在剩余输注周期内应用较大剂量(“维持剂量”)。这种措施(measure)可以有助于使患者身体适应于抗体治疗和/或避免不期望的副作用。例如,可以在输注周期的第一天(或前几天)(例如,第一天、第一和第二天,或第一、第二和第三天,等,直至第七天)按每平方米身体表面积 $5 \mu\text{g}$ 的初始剂量给予双特异性单链抗体,然后在剩余周期内按每平方米身体表面积 $15 \mu\text{g}$ 的每日剂量给予。或者在输注周期的第一天(或前几天)按每平方米身体表面积 $5 \mu\text{g}$ 的初始剂量给予双特异性单链抗体,然后在剩余周期内按每平方米身体表面积 30 或 $45 \mu\text{g}$ 的每日剂量给予。还可以设计,在输注周期的第一天(或前几天)按每平方米身体表面积 $5 \mu\text{g}$ 的剂量给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体,接着在输注周期的第二天(或接下来几天)按每平方米身体表面积 $15 \mu\text{g}$ 的剂量给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体,然后在剩余给予周期内按每平方米身体表面积 30 或 $45 \mu\text{g}$ 的每日(维持)剂量给予,总给予周期为至少 4 周。该两个初始剂量不仅可以给予 1

天,而且可以给予 2、3、4、5、6 或 7 天或甚至更长。在根据本发明的药学方法和方式的上下文中计算的患者平均身体表面积范围为约 $0.2 \sim 2.2\text{m}^2$ 。

[0130] 不中断地给予 CD19xCD3 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。不中断地给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体所选择的模式在大部分情况下为静脉内给药模式,以及根据情况,为作为联合疗法方案一部分的共同给予药剂的模式。如此,尤其优选静脉内给药。在这种情况下,可有利地选择合适的计量设备如由 Baxter 制造的多治疗输注泵模型 6060。不论选择什么计量设备,其都应当具有这样的设计和构造,以便在药筒交换和 / 或电池更换或充电时最小化或更好地防止治疗剂给予的中断。这可以例如通过选择具有与待交换药筒分开的 CD19xCD3 双特异性单链抗体溶液二级容器的设备来实现,使得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这个二级容器持续输注到小儿患者中。

[0131] 静脉内给药模式以及,根据情况,作为联合疗法方案一部分的共同给药模式涉及向小儿患者身体内植入用于计量此种给药的泵。本领域普通技术人员知道此类计量泵,例如上述由 Baxter 制备的模型 6060。

[0132] 作为非限制性实例,可以通过不中断,即连续给予有可能通过小儿患者身体携带或植入在其中的、用于计量进入该患者体内的治疗剂流量的小型泵系统实现。此种泵系统通常为本领域已知的,并且通常依赖于定期更换含有待注入的治疗剂的药筒。当在此种泵系统中更换药筒时,不中断地流入小儿患者身体内的治疗剂会随之发生暂时中断。在此种情况下,更换药筒之前的给药阶段和更换药筒之后的给药阶段,在本发明药学方式和方法的含义内仍被认为共同组成此种治疗剂的一种“不中断给药”。这些也适用于给药周期非常长的给药情况,其中需要多于一次地更换药筒,或者其中需要更换驱动泵的电池,导致流入患者身体内的治疗溶液的流动暂时偏差 (offset)。

[0133] 由于长期创伤特别容易感染,所以还应采取适当的措施使向患者身体内给药的穿刺部位处的感染危险最小化。上文所述也适用于通过相似递送系统的肌肉内给药。

[0134] 连续给药可以通过贴在皮肤上并每隔一段时间替换的贴片经皮肤给药。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,经皮肤给药尤其适合不中断给药,因为更换第一张用完的贴片可以通过紧接在移去第一张用完的贴片之前同时将第二张新贴片,例如贴在紧邻第一张用完的贴片的皮肤表面上方便地实现。流动中断问题或电池故障问题都不会出现。

[0135] 进一步地,本发明涉及治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体,其中所制备的所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体用于给予小儿患者。

[0136] 本发明进一步涉及 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体在制备用于治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的药物组合物中的应用。所以,本发明也涉及如本文限定的、用于治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体。本文在药学方式和方法的上下文中公开的实施方式在此原则上适合于制备相应的药物组合物,该药物组合物包含单链构建体抗 CD19xCD3 构建体,用于给予小儿患者,特别用于治疗、改善或消除小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL)。

[0137] 优选地,所述小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 是小儿 B- 系急性淋巴细胞白血病

(ALL), 优选小儿 B- 前体急性淋巴细胞白血病 ALL, 更优选小儿祖 B 细胞 ALL、前 B 细胞 ALL 或普通 ALL (cALL)。甚至更优选该 ALL 是 cALL。

[0138] 在所述医学用途的优选实施方式中, 所述 B- 前体 ALL 是复发性和 / 或诸如化疗和 / 或 HSCT 的常规 ALL 疗法难以治疗的。

[0139] 优选地, 所述急性淋巴细胞白血病 (ALL) 在诊断后约 3 年内复发。

[0140] 在所述医学用途的另一个优选实施方式中, CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体用于治疗、改善或消除急性淋巴细胞白血病 (ALL) 小儿患者的微小残留病变 (MRD)。优选地, 所述小儿患者在完全血液缓解期为 MRD- 阳性。

[0141] 在所述医学用途的进一步优选的实施方式中, 给予所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体将 MRD 阳性的小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 转变成 MRD 阴性状态。

[0142] 优选地, MRD 通过利用 PCR 和 / 或 FACS 分析定量检测如本文限定的单独细胞遗传学异常或重排。

[0143] 甚至更优选地, 小儿 ALL 患者显示出高于检测限的细胞遗传学异常的信号, 和 / 或至少一种灵敏度 $\geq 10^{-4}$ 的通过重排的标记。

[0144] 在所述医学应用的另一个优选实施方式中, 通过所指出的检测方法可检测到的分子复发时间大于 6 个月。

[0145] 在所述医学应用的另一个优选实施方式中, 相应可变重链区 (V_H) 和相应可变轻链区 (V_L) 在所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体中从 N- 末端至 C- 末端以 V_L (CD19)- V_H (CD19)- V_H (CD3)- V_L (CD3) 顺序排列。

[0146] 优选地, 所述 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体包含 SEQ ID NO. 1 中给出的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO. 1 有至少 90% 同一性, 优选 95% 同一性的氨基酸序列。

[0147] 在所述医学应用的进一步优选的实施方式中, 一个治疗周期是连续输注至少四周, 在此之后是 2 周无治疗间隔期。

[0148] 优选地, 在测得 MRD 阴性状态之后, 所述给予要重复至少 2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 次。

[0149] 在另一个实施方式中, 该给予在同种异体干细胞移植之前进行, 从而将 MRD 阳性 ALL 转变成 MRD 阴性状态。

[0150] 在替换实施方式中, 该给予在同种异体干细胞移植之后进行。

[0151] 在所述医学用途的另一个优选实施方式中, 按每平米患者身体表面积 $10 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ 的每日剂量给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体。

[0152] 优选地, 按每平米患者身体表面积 $15 \mu\text{g} \sim 30 \mu\text{g}$ 的每日剂量给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体。

[0153] 在所述医学用途的另一个实施方式中, 给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体, 以代替符合同种异体干细胞移植条件的小儿患者的同种异体干细胞移植治疗。

[0154] 相对于本发明药学方法和方式提供的实施方式、定义和解释原则上适用于本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体构建体的医学用途。

附图说明

[0155] 图 1: CD19xCD3 双特异性单链抗体 (CD19xCD3 bscab) 的作用模式。CD19xCD3 双

特异性单链抗体 (SEQ ID NO. 1) 使 CD3⁺ 阳性细胞毒 T 细胞重定向, 从而消除携带 CD19 抗原的人类急性淋巴细胞白血病细胞。

[0156] 图 2: 常规 ALL 疗法治疗 7 岁的普通 ALL 患者失败。在 HSCT 后 1 年, 该小儿患者经受第二次骨髓复发并接受了后续化疗, 该后续化疗包括 1 个周期的氯法拉滨 / 环磷酰胺 / VP16、2 个周期的安吡啶、VP16、强的松和 1 个周期的美法仑 / 阿糖胞苷。尽管接受了这种侵袭性的化疗, 该患者在整个治疗期间还是患有持续性形态学疾病, 如通过高 MRD 水平所证明的。左 y 轴表示 FACS-MRD%, 右 y- 轴表示 PCR-MRD ($10^0 \sim < 10^{-4}$), x- 轴表示距离第一次 HSCT 的天数; 参见实施例 4。

[0157] 图 3: 通过给予 CD19xCD3 双特异性单链抗体 (CD19xCD3bscab; SEQ ID NO. 1) 成功地治疗了该小儿患者, 如在用所述抗体治疗之前、期间和之后的 MRD 所证明的。在常规 ALL 疗法失败之后, 通过连续输注 $15 \mu\text{g}/\text{m}^2$ CD19xCD3 双特异性单链抗体 (SEQ ID NO. 1) 治疗该患者 5 周。在抗体治疗后, 可以达到 MRD 阴性。在 2008 年 10 月, 即用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗结束后 2 周 (图 3 ~ 5 中的第 0 天), 利用非清髓性 (non-myeloablative) 预处理方案对他进行来自其半相合母亲的第二次 HSCT, 其中该非清髓性预处理方案由氯法拉滨、硫替派和美法仑 (Lang) 组成, 氯法拉滨、硫替派和美法仑通过调节条 (conditioning bar) 指示。左 y 轴表示 FACS-MRD%, 右 y- 轴表示 PCR-MRD ($10^0 \sim < 10^{-4}$), x- 轴表示距离第一次 HSCT 的天数, 第“0”天表示 (在抗体治疗之后的) 第二次 HSCT 当天; 参见实施例 4。

[0158] 图 4: 在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体 (CD19xCD3bscab; SEQ ID NO. 1) 治疗之前和之后原细胞计数随时间的进展。CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗第 10 天的骨髓分析揭示该骨髓原细胞被该抗体完全消除 ($\text{MRD} < 10^{-4}$)。在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗第 35 天结束时, 另一个 BM 分析证实该骨髓中完全不存在白血病原细胞 ($\text{MRD} < 10^{-4}$)。左 y- 轴表示通过流式细胞术获得的以 % 计的原细胞计数, 右 y 轴表示通过显微术获得的以 % 计的原细胞计数, x- 轴表示距离 HSCT 的天数, 其中负天数表示距离第一次 HSCT 的天数, “0”天表示 (抗体治疗之后) 第二次 HSCT 当天, 正天数表示在第二次 HSCT 之后的天数。

[0159] 图 5: 在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体 (CD19xCD3 bscab; SEQ ID NO. 1) 治疗后 MRD 水平的降低。在抗体治疗后, 可以达到 MRD 阴性。截至 2009 年 6 月, 该患者仍然处在 MRD 阴性的完全分子缓解期。左 y 轴表示 FACS-MRD%, 右 y- 轴表示 PCR-MRD ($10^0 \sim < 10^{-4}$), x- 轴表示距离 HSCT 的天数, 其中负天数表示距离第一次 HSCT 的天数, “0”表示第二次 HSCT 当天, 正天数表示距离第二次 HSCT 的天数。

具体实施方式

[0160] 本发明进一步通过以下实施例说明:

[0161] 实施例:

[0162] 1. CD19xCD3 双特异性单链抗体

[0163] WO 99/54440 描述了 CD19xCD3 双特异性单链抗体的生成、表达和细胞毒活性。CD19xCD3 双特异性单链抗体的相应氨基酸和核酸序列分别在 SEQ ID NO. 1 和 2 中示出。CD19xCD3 双特异性单链抗体的 CD3 结合结构域的 VH 和 VL 区分别在 SEQ ID NO. 7 ~ 10 中示出, 而 CD19xCD3 双特异性单链抗体的 CD19 结合结构域的 VH 和 VL 区分别在 SEQ ID NO. 3 ~ 6 中示出。

[0164] 2. 淋巴细胞表型分析及嵌合分析

[0165] 在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗之前、期间和之后,使用含有 EDTA 的采集管采集患者血液,用于淋巴细胞表型分析及嵌合分析。通过用 Advia 进行分类血液分析(分群血液分析,differential blood analysis),测定该血液样品中的淋巴细胞绝对数。使用荧光标记的针对 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD56 的抗体(都从 Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany 获得),给淋巴细胞染色。用 FACSCalibur (Becton-Dickinson) 对标记细胞进行分析,并收据收集。

[0166] 3. 检测 MRD

[0167] 采用基于聚合酶链式反应 (PCR) 的测定法 (Bader 等人, loc. cit.) 或 FACS 分析法检测 MRD。简单地说,通过 DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 分离 DNA。最近已证明,作为基于 PCR 的靶的免疫球蛋白和 T- 细胞受体基因重排,是用于在干细胞移植之后监测急性淋巴细胞白血病中 MRD 的稳定标记 (Kreyenberg, Leukemia, 2009)。

[0168] 4. 病例报告

[0169] 4.1 病例报告患者 1

[0170] 这例 7 岁患者在 2004 年被诊断患有高危的 CD10+ 普通 ALL (CD19-, CD34- 阳性; CD45 降低; TCR 重排; CNS 阴性)。在治疗之后,他在 2006 年 6 月经受骨髓复发,并根据 ALL-REZ BFM 研究在 S3 臂 (arm) 中进行治疗。在 2 个化疗周期之后,该患者患有持续性疾病并在 3 个疗程的氯法拉滨之后获得完全缓解。2007 年,在用全身照射和依托泊甙处理 (conditioning) 之后,他接受了来自 9/10HLA- 等位基因匹配的无关供体的同种异体 HSCT。HSCT 之后 1 年,他经受另一次骨髓复发并接受了后续化疗,该后续化疗包括 1 个周期的氯法拉滨 / 环磷酰胺 / P16 (Nobuko)、2 个周期的安吡啶、VP16、强的松 (Hamburg), 和 1 个周期的美法仑 / 阿糖胞苷; 参见图 2。从图 2 中的高 MRD 水平明显可以看出,尽管该患者接受了这种侵袭性化疗,但他在整个治疗期间还是患有持续性形态学疾病。然后在同情使用的情况下,通过连续输注 $15 \mu\text{g}/\text{m}^2$ CD19xCD3 双特异性单链抗体 (blinatumomab; SEQ ID NO. 1) 对他进行 5 周的治疗; 参见图 3。在用所述抗体治疗之前 (第 0 天) 和期间的系列淋巴细胞群体分析表明 CD8+T- 淋巴细胞发生明显的扩增,而未记录到 CD4+T- 细胞和 CD56+NK 细胞的变化。在抗体治疗之后,可以获得 MRD 阴性。伴随的嵌合分析显示 100% 的供体嵌合。如图 4 所示,在 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗第 10 天的骨髓分析揭示该骨髓原细胞被完全消除 (MRD $< 10^{-4}$)。在 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗结束时的另一个 BM 分析再次表明,该骨髓中完全不存在白血病原细胞 (MRD $< 10^{-4}$)。在用所述抗体治疗之前、期间和之后的系列 MRD 分析在图 5 中示出。在抗体治疗之前,该小儿患者预后很差,并由于其恶劣的临床病况而不符合 HSCT。在抗体治疗之后,可以获得 MRD 阴性。尽管供体来源的 CD8+T- 淋巴细胞发生明显的扩增,但除了短暂性离散 (transient discrete) 的共济失调征象之外,未观察到主要副作用,并且也未见 GvHD 征象。在 2008 年 10 月,在用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗结束后 2 周 (即图 3 ~ 5 中的第 0 天),利用非清髓性预备方案对他进行来自其半相合母亲的第二次 HSCT,其中该非清髓性预处理方案由氯法拉滨、硫替派和美法仑 (Lang) 组成。截至 2009 年 11 月,该患者仍然处在 MRD- 阴性的完全缓解期。

[0171] 4.2 病例报告患者 2

[0172] 这例 15 岁患者在 2001 年 4 月被诊断患有费城染色体和 CD19 阳性 B- 前体 ALL。

化疗后,在用 12Gy 的 TBI 和依托泊甙处理之后,于 2001 年 10 月他接受了来自 HLA 相合同胞的 HSCT。在 2002 年诊断出骨髓复发并用伊马替尼和化疗获得另一个缓解期。然后他在 2004 年 10 月接受了来自 HLA 相合无关供体的第二次 HSCT。在 2008 年 3 月,诊断出第二次复发,并用低剂量化疗和达沙替尼进行治疗,因为对伊马替尼有抗性。在用氯法拉滨和胞嘧啶/阿拉伯糖苷进行另外的化疗之后,他获得分子缓解并接受来自其 3/6HLA 等位基因不匹配的半相合父亲的第三次同种异体 HSCT,并在移植后用达沙替尼治疗。由于胃肠道出血和扩张型心肌病,在移植后 5 个月中断了达沙替尼。在 2009 年 4 月,诊断出中枢神经系统 (CNS) 复发,CNS 中存在 $7 \times 10^9/L$ 的原细胞且骨髓中存在 3% 的原细胞。该患者然后用尼罗替尼、鞘内化疗和以 18Gy 对 CNS 分次照射进行治疗。这种治疗后 3 个月,该患者的骨髓仍然为 1.1×10^{-3} 水平的 MRD- 阳性,而 CNS 中无原细胞。外周血的嵌合分析揭示供体来源的造血完全来自其半相合父亲。

[0173] 该患者然后在同情使用的情况下通过连续输注 $15 \mu g/m^2/$ 天的单药剂 blinatumomab 治疗 4 周,而没有产生任何副作用。治疗结束时的骨髓穿刺显示完全缓解,其中骨髓中不可检测的 MRD 小于 1×10^{-4} 。如同患者 1,患者 2 在用 blinatumomab 治疗期间或之后也没有出现任何 GvHD 征象。在用 blinatumomab 治疗结束后 2 周,该患者经由感染引发的短暂溶血反应。患者 2 在治疗后目前已 4 周没有复发。他状况良好,并在上学。

[0174] 4.3 总结

[0175] 目前为止可用来治疗 ALL 的药物的特异性低并影响各种其它细胞,造成严重的副作用如免疫抑制、骨髓发育不全、粘膜炎、神经病、心脏中毒和脱发。因此迫切需要副作用较小、靶向性更好的方法。此外,某些患者的 ALL 克隆对常规化疗产生完全抗性,特别是 HSCT 后形成的那些克隆,因此期望作用模式不同的药物。通过 NK 细胞和粒细胞 Fc 受体的抗体依赖性细胞毒性与化疗联合的效力可以使用单克隆嵌合抗体利妥昔单抗 (Rituximab) 在小儿 ALL 中进行证明。目前,blinatumomab 是临床试验中唯一允许结合细胞毒 T 细胞的抗体,该细胞毒 T 细胞用于靶向 B- 细胞非霍奇金淋巴瘤和淋巴性白血病中的 CD19。T 细胞被认为比通过常规单克隆抗体结合的那些免疫细胞具有更高的细胞毒潜能 (cytotoxic potential)。

[0176] 同种异体 GvL 效应推定是 HSCT 抗白血病效力的主要原因之一。遗憾的是,GvL 的产生通常与 GvHD 相关联,GvHD 仍是在同种异体 HSCT 之后发病率和死亡率的主要原因。所以,在不存在 GvHD 的情况下诱导 GvL 是集中研究的课题。诱导 GvL 效应的一个途径是供体淋巴细胞输注 (DLI)。虽然 DLI 对治疗 CML 非常有效,但它对复发性 ALL 移植后治疗的效果较小并且经常导致慢性 GvHD 的产生,显著地损害了受感染儿童的生活质量。

[0177] 在不存在 GvHD 的情况下诱导 GvL 的一个可能途径是在 HSCT 之后使用低剂量 T- 细胞结合的抗体 blinatumomab 在体内激活供体来源的 T 淋巴细胞,该 blinatumomab 可引导 T- 淋巴细胞对抗患者的 CD19- 阳性 ALL 原细胞。这种抗体在自体移植的情况下表现出明显的抗淋巴瘤活性和抗白血病活性,但在 HSCT 之后复发的 ALL 或儿童中却从未测试。在自体移植的情况下,已对 16 个可评价的 MRD- 阳性 ALL 成人患者中的 13 个诱导了分子缓解。上述两个小儿患者都在开始治疗之后表现出明显的抗白血病反应。在这两种情况下,MRD 都降低到检测水平以下,而没有出现任何 GvHD 征象,尽管供体来源的 T- 细胞发生大规模扩增。这可能是由以下事实引起的,即 blinatumomab 的作用不依赖于定期的 (regular) 肽抗原呈

递并且可能不涉及原始 T 细胞库 (T cell repertoire) 的结合。

[0178] 每日低至 $15 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 剂量水平的 blinatumomab 足以诱导供体来源的 T- 淋巴细胞扩增并将 ALL 原细胞消除到 MRD 检测水平以下。这强调了, T- 细胞结合与常规单克隆抗体作用模式有着很大的区别, 常规单克隆抗体需要大得多的剂量并且由于其缺少 Fc 受体而无法结合细胞毒 T- 细胞。

[0179] 这两个患者对 blinatumomab 的耐受性都很好, 仅引起疲劳、轻度共济失调和 CTCAE 1-2 级震颤。对于患者 2, 根本未见副作用, 尽管对他进行了强化预处理。这两个小儿患者很好地接受了数周连续静脉输注。

[0180] 从小儿 ALL 的这个初步 (first) 临床经验, 本发明人得出的结论是, 对 blinatumomab 的耐受性很好, 并可以在同种异体 HSCT 后在 CD19- 阳性 B- 前体 ALL 多次复发之后患有治疗难治性疾病的儿童中迅速诱导完全血液和 MRD- 阴性缓解。值得注意的是, 尽管供体来源的 T- 淋巴细胞发生扩增, 甚至在不匹配的半相合移植之后也没有一个患者出现任何 GvHD 征象。

[0181] 这些初步结果表明, 用 CD19xCD3 双特异性单链抗体治疗小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者可以彻底消除该小儿患者身体内的急性淋巴细胞白血病细胞。重要地, 这种治疗不仅获得完全血液缓解, 而且获得完全分子缓解, 因为微小残留病变 (MRD) 阳性的急性淋巴细胞白血病 (ALL) 已转变成 MRD 阴性状态。该治疗具有很好的耐受性。鉴于这点, 本文描述的 CD19xCD3 双特异性单链抗体的给予为小儿急性淋巴细胞白血病 (ALL), 特别是化疗和 / 或同种异体 HSCT 难以治疗的 ALL 和 / 或复发性 ALL 提供了改进的治疗选择。

[0182] 该结果可以简短地概括如下:

[0183] 已在同情使用的基础上对两个小儿患者进行治疗。

[0184] 所述患者正处在 MRD 阴性状态。

[0185] 未观察到严重的不良事件 (AE)。

[0186] 所有 AE 都是短暂的, 没有必要中断治疗。

[0001]

P42511_序列表_宋春妮_20110428
序列表

<110> 米克罗麦特股份公司 (Micromet AG)
 <120> 小儿急性淋巴细胞白血病的治疗方法
 <130> P42511VAP-1
 <150> US 61/112,323
 <151> 2008-11-07
 <150> US 61/221,269
 <151> 2009-06-29
 <150> US 61/183,291
 <151> 2009-06-02
 <160> 22
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: CD19xCD3双特异性单链抗体"
 <400> 1
 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 Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 115 120 125
 Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val
 130 135 140
 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met
 145 150 155 160
 Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln
 165 170 175

[0002]

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly
 180 185 190

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

Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 210 215 220

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 245 250 255

Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser
 260 265 270

Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
 275 280 285

Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 290 295 300

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 305 310 315 320

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 325 330 335

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 340 345 350

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 355 360 365

Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 370 375 380

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro
 385 390 395 400

Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg
 405 410 415

Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly
 420 425 430

Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly
 435 440 445

Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 450 455 460

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 465 470 475 480

[0003]

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 485 490 495

Leu Lys

<210> 2
 <211> 1494
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: CD19xCD3双特异性单链抗体"

<400> 2
 gatatccagc tgacccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatit gaactggtac 120
 caacagatc caggacagcc acccaaaetc ctcatctatg atgcatccaa tctagtttct 180
 gggatccca cagggttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
 acgttcggtg gagggaccaa gctcagatc aaaggtggtg gtggttctgg cggeggcggc 360
 tccggtggtg gtggttctca ggtgcagctg cagcagctctg ggctgagct ggtgaggect 420
 gggctcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctgctatg cattcagtag ctactggatg 480
 aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat ttggcctgga 540
 gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag ccactctgac tgcagacgaa 600
 tcctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc tgcggtctat 660
 ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggtg ggccgttatt actatgctat ggactactgg 720
 ggccaagga ccacggtcac cgtctcctcc ggaggtggtg gatccgatat caaactgcag 780
 cagtcagggg ctgaactgga aagacctggg gcctcagtgat agatgtctct caagacttct 840
 ggctacacct ttactaggtg cacgatgcac tgggtaaac agaggcctgg acaggtctctg 900
 gaatggattg gatacattaa tcctagccgt ggttatacta attacaatca gaagtccaag 960
 gacaaggcca cattgactac agacaaatcc tccagcacag ctacatgca actgagcagc 1020
 ctgacatctg aggactctgc agtctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc 1080
 cttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctct cagtcgaagg tggaagtgga 1140
 ggttctggtg gaagtggagg ttcaggtgga gtcgacgaca ttcagctgac ccagtctcca 1200
 gcaatcatgt ctgactctcc aggggagaag gtcacatga cctgcagagc cagtccaagt 1260
 gtaagttaca tgaactggtg ccagcagaag tcaggeacct ccccaaaag atggatttat 1320
 gacacatcca aagtggcttc tggagtcct tategettca gtggcagtggt gtctgggacc 1380
 tcatactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgceactta ttactgcca 1440
 cagtgagta gtaaccgct cagttcggg gctgggacca agctggagct gaaa 1494

<210> 3
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0004]

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19的VH"
 <400> 3
 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> 4
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19的VH"
 <400> 4
 caggtgcage tgcagcagtc tggggctgag ctggtgagge ctgggtcctc agtgaagatt 60
 tcttgcgaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gtcttgagt gattggacag atttggcctg gagatggtga tactaactac 180
 aatggaaagt tcaagggtaa agccactctg actgcagacg aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctage atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagacgggag 300
 actacgacgg taggcccgtta ttactatgct atggactact ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct cc 372

<210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19的VL"
 <400> 5

[0005]

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> 6
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19的VL"
 <400> 6
 gatattccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctctcgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttattt gaactggtag 120
 caacagattc caggacagcc acccaaacct ctcatctatg atgcatccaa tctagtttct 180
 gggatccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
 acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaa 333

<210> 7
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> 抗CD3的VH
 <400> 7
 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

[0006]

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> 8
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的说明: 抗CD3的VH"

<400> 8
gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaaga ctctggccta cacccttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagectac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggeacca ctctcacagt ctectca 357

<210> 9
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释="人工序列的说明: 抗CD3的VL"

<400> 9

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

[0007]

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

<210> 10
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <220>
 <221> source

<400> 10
 gacattcage tgaccagtc tccagcaatc atgtctgeat ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gagccagttc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120
 acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaagtgg cttctggagt cccttatcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctatac tctctcacia tcagcagcat ggagctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccaacagtgg agtagtaacc cgtcacggtt cgggtctggg 300
 accaagctgg agctgaaa 318

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19 L1"

<400> 11

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19 L2"

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19 L3"

<400> 13

Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 14

[0008]

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19 H1"

 <400> 14

 Ser Tyr Trp Met Asn
 1 5

 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19 H2"

 <400> 15

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

 Gly

 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD19 H3"

 <400> 16

 Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD3 H1"

 <400> 17

 Arg Tyr Thr Met His
 1 5

 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> source
 <223> /注释="人工序列的说明: 抗CD3 H2"

 <400> 18

 Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[0009]

	1	5	10	15
Asp				
<210>	19			
<211>	10			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<221>	source			
<223>	/注释="人工序列的说明: 抗CD3 H3"			
<400>	19			
	Tyr	Tyr	Asp	Asp
	1			5
		His	Tyr	Cys
				Leu
			Asp	Tyr
				10
<210>	20			
<211>	10			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<221>	source			
<223>	/注释="人工序列的说明: 抗CD3 L1"			
<400>	20			
	Arg	Ala	Ser	Ser
	1			5
			Ser	Val
			Ser	Tyr
			Met	Asn
				10
<210>	21			
<211>	7			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<221>	source			
<223>	/注释="人工序列的说明: 抗CD3 L2"			
<400>	21			
	Asp	Thr	Ser	Lys
	1			5
			Val	Ala
			Ser	
<210>	22			
<211>	9			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<221>	source			
<223>	/注释="人工序列的说明: 抗CD3 L3"			
<400>	22			
	Gln	Gln	Trp	Ser
	1			5
			Ser	Asn
			Pro	Leu
			Thr	

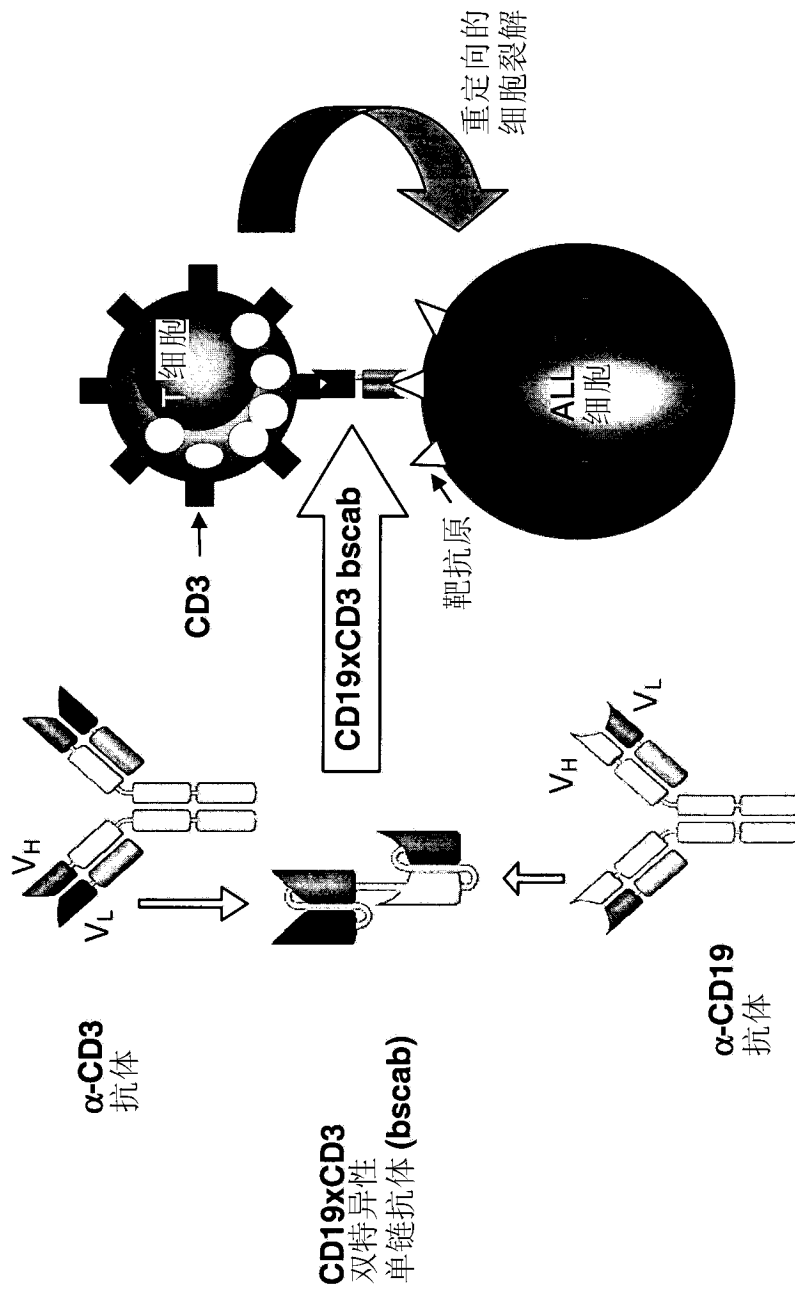


图 1

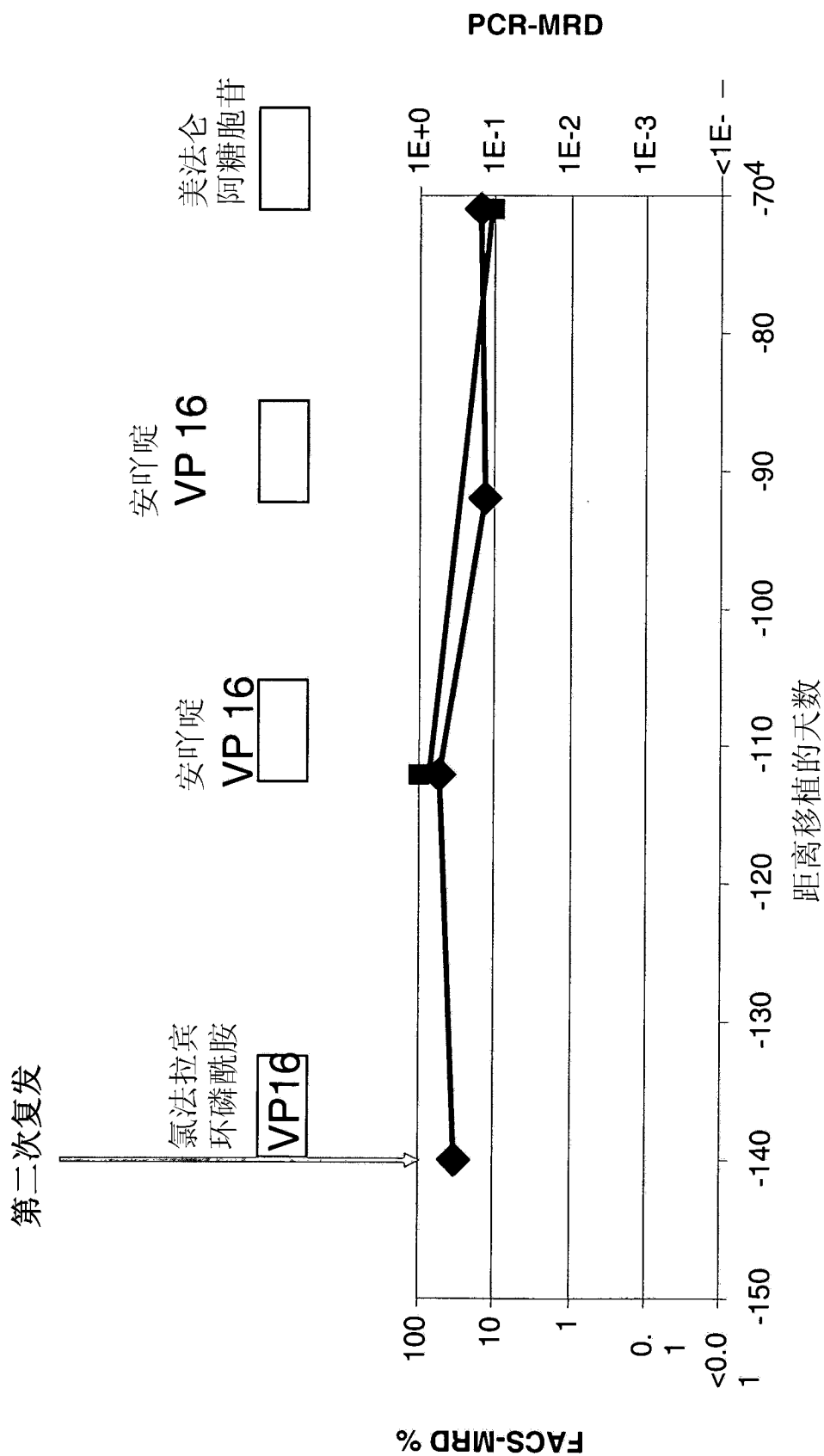


图 2

2nd BMT

CD19xCD3 bscab

美法仑
阿糖胞苷

融合

调节
(Conditioning)

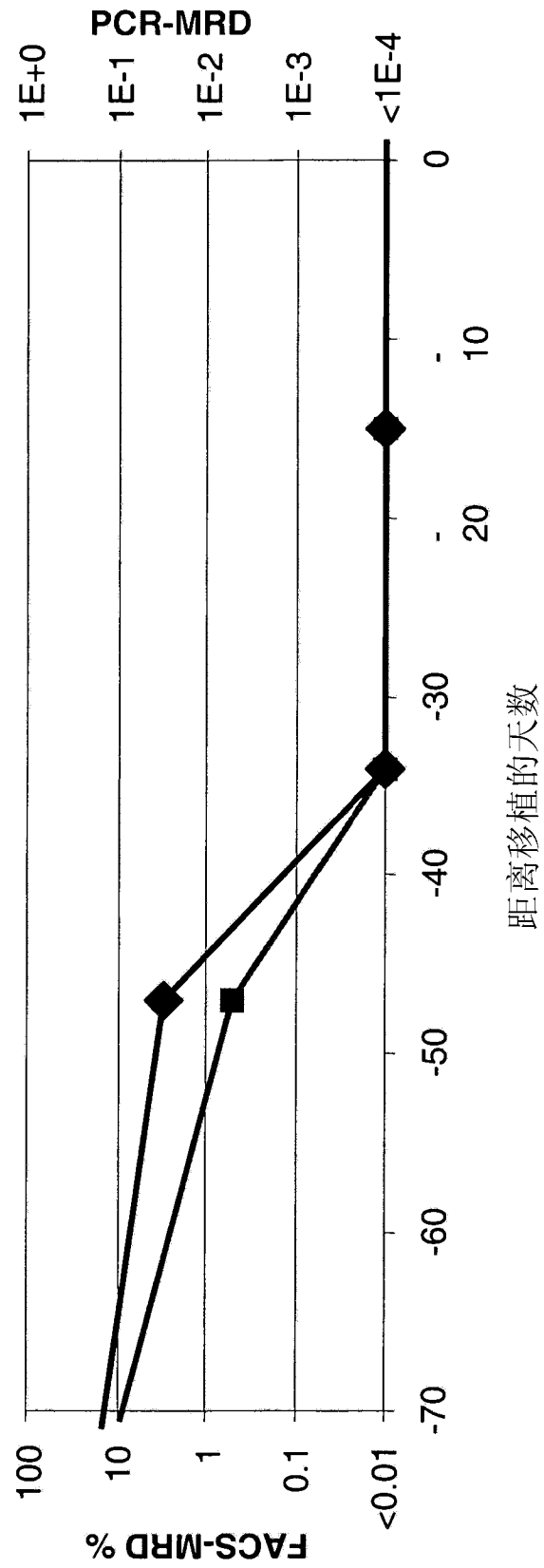


图 3

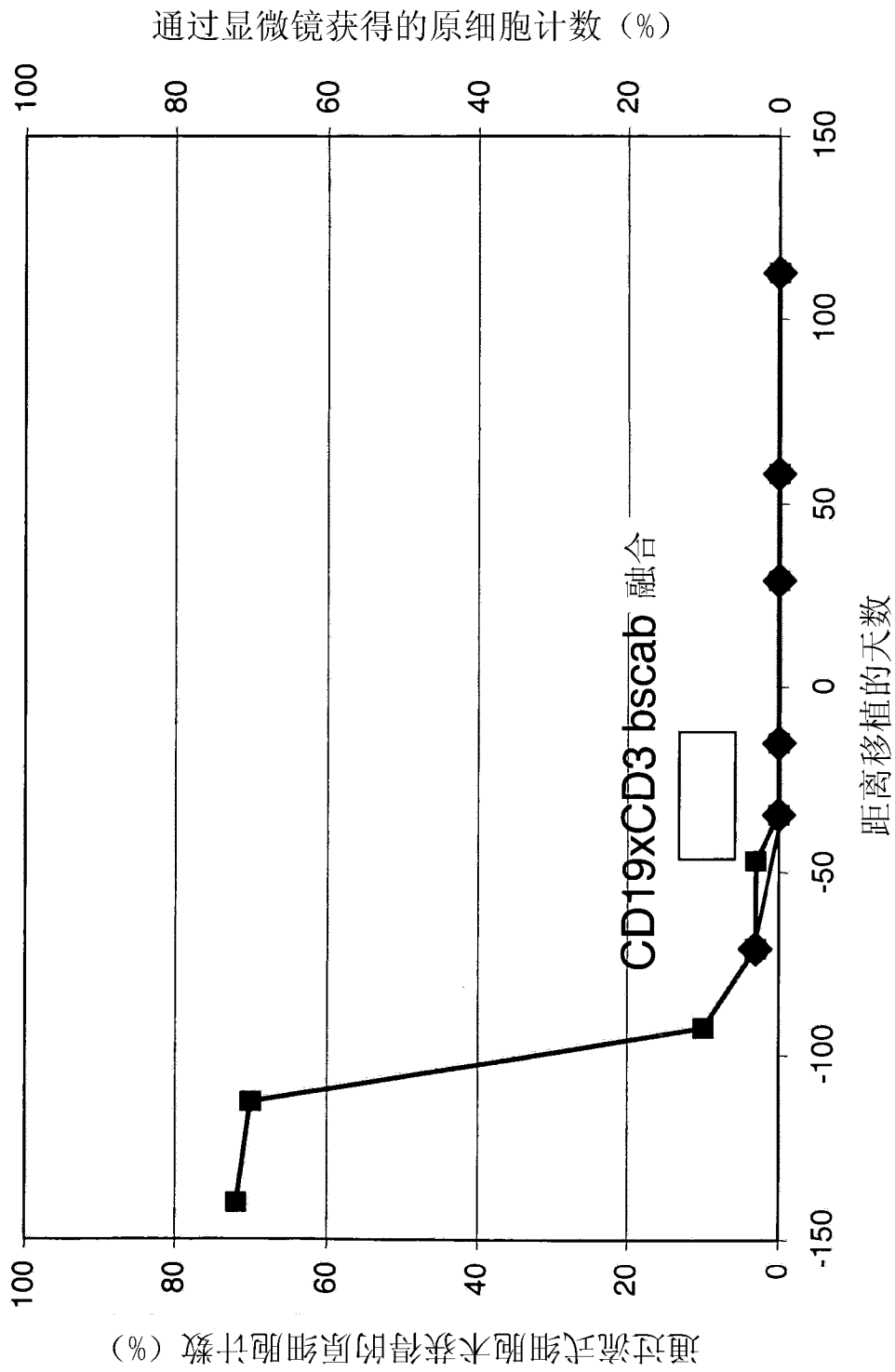


图 4

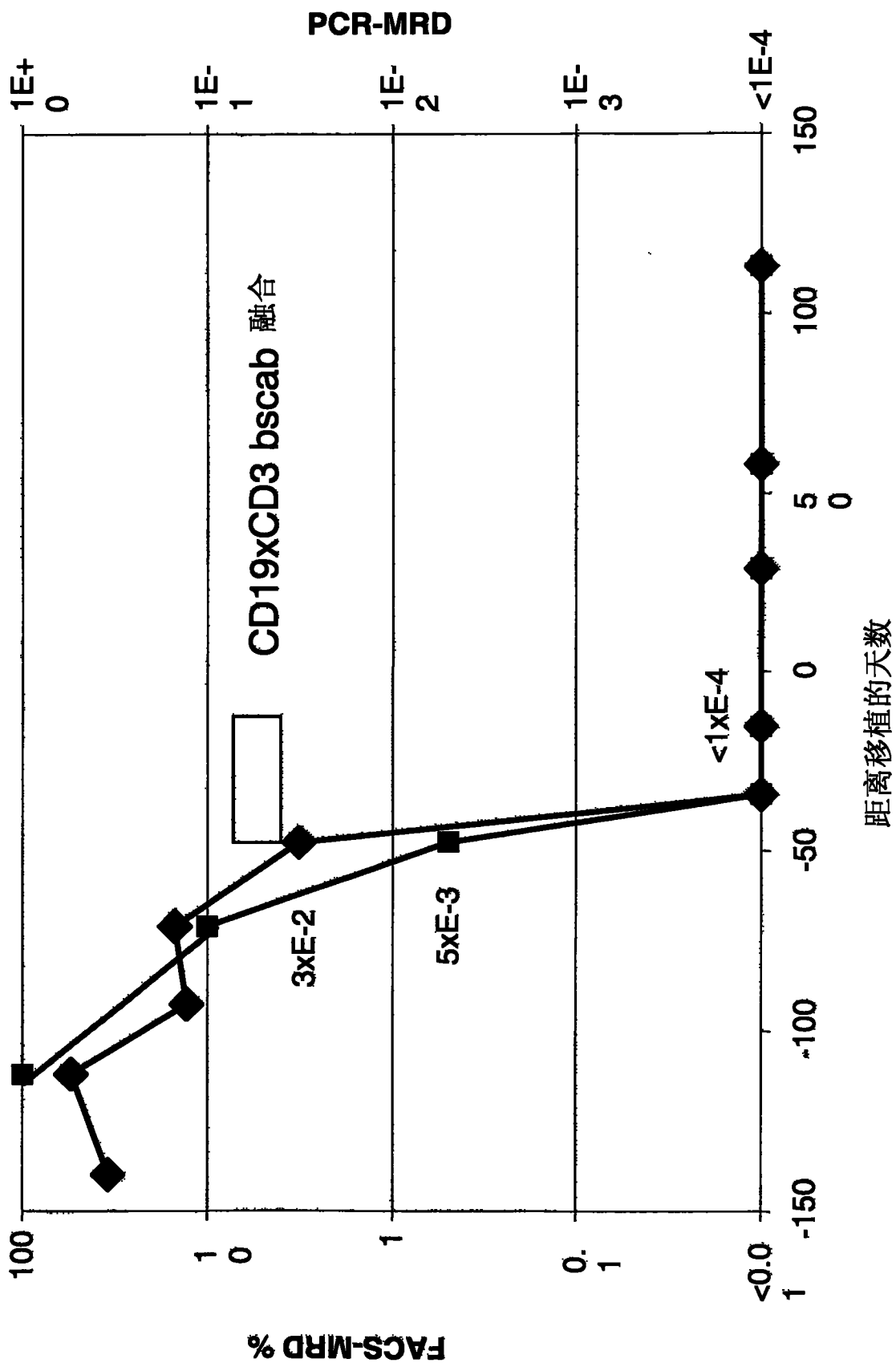


图 5