

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410072713.5

[43] 公开日 2006年5月24日

[11] 公开号 CN 1775808A

[22] 申请日 2004.11.15

[21] 申请号 200410072713.5

[71] 申请人 中国医学科学院血液学研究所

地址 300020 天津市和平区南京路 288 号

[72] 发明人 王敏 王建祥 陈森 廖小龙
饶青 邢海燕 田征 唐克晶
林冬

[74] 专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司
代理人 王晓红

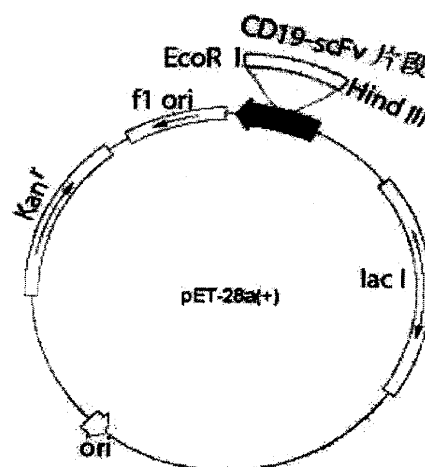
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体及其应用，为下一步研制靶向治疗白血病的基因工程药物奠定了基础。本发明涉及抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 重链和轻链可变区基因，由所述基因编码的多肽，含有所述基因的载体及所述的基因和多肽在制备用于白血病治疗药物中的应用。重链和轻链可变区基因来自抗 CD19 单克隆抗体 HI19a。本发明采用基因工程技术成功制备抗 CD19 基因工程抗体，为白血病的靶向治疗奠定了基础。



1、一种用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体，其特征是含有 SEQ ID NO. 1 所述的抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 重链可变区 VH 基因核苷酸序列和 SEQ ID NO. 2 所述的抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 轻链可变区 VL 基因核苷酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体，其特征是所述抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 重链可变区 VH 基因所表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示，包括含有部分或全部该序列 CDRs 的片段。

3、根据权利要求 1 所述的用于靶向结合淋巴细胞的抗 CD19 的工程抗体，其特征是所述抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 轻链可变区 VL 基因所表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示，包括含有部分或全部该序列 CDRs 的片段。

4、包括权利要求 1 的 cDNA 的 pMD-18T 载体。

5、包括权利要求 1 的 cDNA 的所构建的 pET28a(+) 表达载体。

6、根据权利要求 5 所述 cDNA 的所构建的 pET28a(+) 表达载体，其特征在于所表达的 cDNA 氨基酸序列，包括含有部分或全部该序列 CDRs 的片段。

7、根据权利要求 5 所述 cDNA 的所构建的 pET28a(+) 表达载体，其特征在于所述的表达载体在大肠杆菌中表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所述。

8、权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 所述用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体，在制备治疗白血病的药物中的应用。

用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体及其用途

技术领域

本发明涉及一种工程抗体，尤其是用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体及其用途。

背景技术

急性淋巴细胞白血病(ALL)是白血病的一种亚型，以 B 细胞 ALL(B-ALL) 为主，占 ALL 的 70-80%，每年新发病率为 0.98/10 万人。目前成人 ALL 的治疗以化疗为主，但疗效较差，虽然可以取得暂时的缓解，然而生存期短。我国成人 ALL 疗效更差，以至无法计算其长期生存率。因此，降低白血病的病死率，开展和改善白血病的治疗方法是世界医学正在攻克的一个重点。

随着现代分子生物学和免疫学的发展，基因工程抗体的诞生为肿瘤的诊断和治疗带来了希望，尤其是单链抗体的应用成为肿瘤免疫基因治疗的热点，它以分子质量小、穿透力强、较好保持抗原亲和性及特异性、免疫原性低、体内半衰期短，易与效应分子相连构成多种新功能的抗体分子等为特点，单链抗体成为肿瘤免疫治疗的重要手段。

20 世纪 90 年代，人源性单克隆抗体（单抗）的出现，开创了单抗治疗血液病的新纪元。ALL 细胞表面表达多种抗原，如 CD19、CD20、CD22 及 CD52 等，这些表面抗原均可成为单抗的作用靶点。目前已上市的抗 CD20 单抗可使 93% 的前 B-ALL 及成熟 B-ALL 患者获完全缓解（CR），1 年生存率达 86%。Thomas 等应用抗 CD20 单抗加 CVAD 治疗 Burkitt 淋巴瘤，89% 的病人获 CR，1 年无病生存（DFS）率达 86%，无治疗相关死亡。另外，抗 CD19 单抗和抗 CD52 单抗也已用于人体。Seibel 等对比了单纯化疗与化疗加抗 CD19 单抗对初发 ALL 的疗效。结果显示，单纯化疗组 2 周 CR 率仅为 43%，而联合化疗组达 93%。抗 CD22 单抗在体外对 MDR-1（多药耐药基因）阳性的 Burkitt 淋巴瘤细胞株及 BCP-ALL 细胞株 EU-1 有明显杀伤作用。

综上所述，抗体药物给肿瘤尤其是血液系统恶性肿瘤的治疗带来深远影响。抗体作为单独治疗药物已证明是有效的，而且与其它化疗药物联合应用具有协同作用。利用抗体的细胞特异性，将抗体作为递送细胞毒药物

或结合其它蛋白的载体,可以有效杀灭靶向细胞,而对正常细胞没有杀伤作用。因此,如果利用 CD19 表面抗原作为 ALL 白血病细胞的表面标记,构建 CD19 单链抗体,以此为载体,结合其它有生物学作用的蛋白分子,构成融合蛋白,通过融合蛋白中的 CD19 单链抗体将融合蛋白结合到 ALL 白血病细胞,刺激 CTL 细胞激活,可起到特异性杀伤白血病细胞的作用。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是,提供一种用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体 (ScFv), 获得一种新的、能与 B-ALL 白血病细胞结合的活性表达产物。

为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体,含有 SEQ ID NO. 1 所述的抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 重链可变区 VH 基因核苷酸序列和 SEQ ID NO. 2 所述的抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 轻链可变区 VL 基因核苷酸序列。

所述抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 重链可变区 VH 基因所表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示,包括含有部分或全部该序列 CDRs 的片段。

所述抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 轻链可变区 VL 基因所表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示,包括含有部分或全部该序列 CDRs 的片段。

包括上述 cDNA 的 pMD-18T 载体。

包括上述 cDNA 的所构建的 pET28a(+) 表达载体。

所述的 cDNA 所构建的 pET28a(+) 表达载体,所表达的 cDNA 氨基酸序列,包括含有部分或全部该序列 CDRs 的片段。

所述的 cDNA 所构建的 pET28a(+) 表达载体,所述的表达载体在大肠杆菌中表达的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所述。

所述用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体,在制备治疗白血病的药物中的应用。

本发明从鼠抗人 CD19 单克隆抗体的杂交瘤细胞株扩增单克隆抗体的轻、重链可变区基因,并连接成单链抗体 (ScFv) 基因,在大肠杆菌中进行表达,以获得一种新的、能与 B-ALL 白血病细胞结合的活性表达产物。

附图说明

图 1 为 PCR 扩增 VH, VL 基因片段电泳图 (M: Marker, H: VH, L: VL)。

图 2 为 PCR 扩增单链抗体(ScFv)基因片段电泳图 (M: Marker)。

图 3 为抗 CD19 ScFv 表达载体 pET28a(+) ScFv 结构示意图。

图 4 为 ScFv 表达产物的 SDS-PAGE (10%) 电泳图 (M: Marker; 0: 未诱导菌体蛋白; 1-4: 诱导后菌体蛋白)。

图 5 为纯化后抗 CD19-ScFv 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。

图 6 为抗 CD19 ScFv 的 Western blot 分析。

图 7a 为竞争性免疫荧光抑制实验阴性对照组 (AB 血清+鼠源 IgG)。

图 7b 为竞争性免疫荧光抑制实验阳性对照组 (HI19a + PBS)。

图 7c 为竞争性免疫荧光抑制实验组 (抗 CD19-ScFv + HI19a)

图 7d 为阳性对照组与实验组 FACS 重叠图。

图 8 为抗 CD19 ScFv 结合曲线及 Scatchard 分析

具体实施方式

下面结合附图和具体实施方式对本发明的用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体作进一步的详细说明:

HI19a 为中国医学科学院血液学研究所自行研制、具有自主知识产权的鼠抗人 CD19 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 此细胞株分泌的抗 CD19 单克隆抗体, 识别一个 95KD I 型穿膜糖蛋白。B-ALL 白血病细胞几乎均表达 CD19 表面抗原。

应用 RT-PCR 方法从分泌抗 CD19 单克隆抗体杂交瘤细胞 HI19a 中克隆了抗体的重链、轻链可变区 (VH、VL) 基因, 所克隆基因分别长 366bp (SEQ ID NO. 1) 和 324bp (SEQ ID NO. 2), 基因内无终止密码子, 为开放读码框, 分别编码 122 个 (SEQ ID NO. 3) 和 108 个 (SEQ ID NO. 4) 氨基酸。与 GeneBank 数据库进行比较, 发现我们所克隆的基因片段与鼠源性抗体有较高的同源性。

用 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽基因将 VH, VL 拼接成单链抗体 (ScFv) 基因, 克隆入 pET28a 表达质粒, 用构建的 PET28a(+)-CD19ScFv 质粒转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导蛋白表达, 表达的蛋白位于包涵体。包涵体蛋白经变性、纯化、复性, 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色, 证实纯化后得到分子量为约 30Kd 的单一蛋白条带。进一步用 anti-His-tag 抗体进行 Western blot 检测, 证实纯化蛋白条带为 CD19ScFv 蛋白。

用免疫竞争实验检测 CD19ScFv 的结合活性，经单链抗体封闭靶细胞——CD19 表达阳性的人前 B 细胞白血病细胞系 Nalm6 细胞后，再加亲本抗体（HI19a 杂交瘤分泌的抗 CD19 单克隆抗体），流式细胞仪测定显示荧光标记阳性率从 92.64%降为 55.17%，表明抗 CD19 ScFv 可竞争性抑制 HI19a 与 Nalm6 细胞结合，即抗 CD19 ScFv 能够与 Nalm6 细胞表面 CD19 抗原特异性结合。另外，还用解离常数 (Kd) 计算方法测定了 CD19ScFv 的结合活性，Kd 值为 $1.7 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ ($R^2=0.99$)。

本发明采用 RT-PCR 方法从分泌抗人 CD19 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 HI19a 中克隆了单链抗体基因，并在蛋白表达载体 pET28a 中进行了表达，获得了与 B 淋巴细胞白血病细胞结合活性的 ScFv 蛋白，为其将来在治疗上的应用作了前期的基础性工作。

下面详细说明本发明的具体实施过程：

1. 抗 CD19 抗体的轻、重链可变区基因克隆

应用 RT-PCR 方法从分泌抗 CD19 单克隆抗体杂交瘤细胞 HI19a 扩增抗 CD19 抗体的轻、重链可变区基因：

(1) RNA 提取：采用 Trizol 一步法，1) 取杂交瘤细胞约 10^6 ，加入 1ml Trizol，吹打混匀，室温静置 5 分钟。2) 加入 0.2ml 氯仿，剧烈振荡 15 秒，室温静置 2-3 分钟。3) 12000rpm，4°C，离心 15 分钟。4) 取上清，加入 0.5 ml 异丙醇室温静置 15 分钟。5) 12000rpm，4°C，离心 15 分钟。6) 弃上清，加入 1ml 75%的乙醇洗，7500rpm，4°C，离心 5 分钟。7) 弃上清，沉淀晾干，加入 30 μ l DEPC 处理的水溶解 RNA。

(2) 逆转录为 cDNA (40 μ l)：取 2.5mM dNTP 4 μ l，5 \times first strand buffer 8 μ l，DTT 4 μ l，oligo dT 2 μ l，水 16.6 μ l，混匀后加入 RNA 约 2g，65°C 水浴 5 分钟，快速冰浴 2-3 分钟。加入 50u/ μ l RNasin 0.4 μ l，Superscript II (200u/ μ l) 1 μ l 混匀后 37°C 水浴 >1 小时。取出后 70°C 水浴 10 分钟。-20°C 保存。

(3) PCR 扩增抗 CD19 抗体的轻重链可变区基因

轻链可变区基因 PCR 扩增反应体系 (50 μ l)：设计引用通用简并引物，上游引物 5' -GAC ATT CAG CTG ACC CAG WCT SMH-3'；下游引物 5' -CCG TTA GAT CTC CAR BTT KGT SCS-3'。以 cDNA 为模板，高保真 pyrobest 聚

合酶扩增。PCR 循环程序为 94°C 5min; 94°C 50s, 55°C 1min, 72°C 1min; 最后 72°C 延伸 10 min, 共 33 个循环。反应结束后加入 1u 普通 Taq 酶 (购自大连宝生物公司) 72°C 延伸 10 min 后立即进行酚氯仿抽提。

重链可变区基因 PCR 扩增反应体系 (50 μ l): 上游引物 5' -CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG-3'; 下游引物 5' -TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3'。以 cDNA 为模板, 高保真 pyrobest 聚合酶扩增。PCR 循环程序为 94°C 5min; 94°C, 30s, 55°C, 1min, 72°C, 1min; 最后 72°C 延伸 10 min, 共 33 个循环。反应结束后加入 1u 普通 Taq 酶 (购自大连宝生物公司) 72°C 延伸 10 min 后立即进行酚氯仿抽提。PCR 结果见图 1。

(4) 测序载体的构建: pMD-18T 载体购自大连宝生物公司。将轻重链可变区基因 PCR 产物回收, 与 pMD-18T 载体连接, 连接反应按试剂盒要求进行。取连接产物 5 μ l, 转化以氯化钙方法制备的大肠杆菌 (DH5 α) 感受态, 以蓝/白斑方法挑选阳性克隆, 轻重链各挑取 10 个克隆送测序, 测序证实轻、重链各个克隆的基因序列完全一致, 分别为 324bp 及 366bp, 且该基因序列完全符合蛋白数据库中抗体所具有的若干保守的框架氨基酸的特点, 该序列为抗体基因序列。分别命名为 pMD-18T19-VH 及 pMD-18T19-VL。

2. 单链抗体基因表达载体 pET28a ScFv 的构建

根据轻、重链可变区的基因序列设计并合成了用于 VH, VL 基因扩增和拼接的引物。

引物 1: CCG GAA TTC GAC ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA

引物 2: GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC CCG TTT TAT TTC CAG
CTT GGT CCC

引物 3: GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGT TCT CAG CCG GCC ATG CGC
CAG GTC CAG CTG CAG CAG

引物 4: CCC AAG CTT GTG AGG AGA CTG TGA GAG TGG TGC C

在引物 1 的 5' 端加上 EcoR I 酶切位点, 引物 4 的 3' 端加上 HindIII 酶切位点。从所构建的 pMD-18T19-VH 及 pMD-18T19-VL 载体, 应用 PCR 扩增 VH, VL 片段, 回收后, 经重叠延伸拼接法通过 PCR 扩增抗 CD19 ScFv 基因片段, 见图 2。纯化后的 PCR 产物经 EcoR I +HindIII 处理后再与经 EcoR

I +HindIII处理后的携带有(His)₆标签的pET28a(+)载体连接(16℃连接过夜)。组成pET28a的抗CD19-ScFv的表达载体,见图3。测序表明,抗CD19 ScFv基因片段为750bp,按氨基酸序列推测ScFv约为27KD的蛋白。测序正确的克隆用于蛋白表达。

3. 抗CD19 ScFv抗体片段的表达、纯化及复性

(1) 用构建的pET28a(+)-CD19ScFv质粒转化大肠杆菌BL21,并在含有50μg/ml卡那霉素的LB平板(1% agar)上筛选转化子。挑取经鉴定正确的单克隆活化后,37℃震荡培养至OD₆₀₀=0.7-0.9,加入IPTG至终浓度为0.1mmol/L,37℃诱导表达5小时,取100 μl菌液,离心后用100μl 1×SDS上样buffer重悬,100℃煮沸5min。取20μl上样,10%SDS-PAGE电泳检测表达蛋白,考马斯亮蓝染色。实验证明重组质粒pET28a(+)-ScFv在大肠杆菌中经IPTG诱导有重组蛋白表达,750bp片段表达出约29Kd的带(His)₆的重组蛋白,见图4。

(2) 抗CD19单链抗体(ScFv)纯化:将表达的菌体沉淀重悬于1/30培养体积的预冷50mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA、pH7.0溶解。反复冻融3次后超声破碎细菌,4℃,30000g离心30分钟。沉淀中加入1/30培养体积的3M尿素和50mmol/L Tris-HCl(pH7.0)溶解后30000g离心30分钟。4℃收集包涵体。用1/40培养体积的6M盐酸胍和0.1M Tris-HCl, pH7.0,于4℃摇动过夜溶解包涵体。4℃,30000g离心30分钟去处沉淀,上清用于纯化。镍柱购于Novagen公司,用3倍柱床体积的Start buffer(6M盐酸胍,0.1M Tris-HCl, pH7.0)平衡镍柱后上样,20倍柱床体积、pH为7.0的6M尿素、50mmol/L Tris-HCl和50mmol/L咪唑洗柱,分别用4倍柱床体积的含有250 mmol/L咪唑、6M尿素和50mmol/L Tris-HCl洗脱结合在镍柱上的ScFv。

(3) SDS-PAGE电泳及Western blot鉴定:纯化产物经10%SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝R250染色,证实纯化后得到分子量为约30Kd的单一一条带。进一步用Western blot验证,具体方法参考分子克隆,其中以抗His-tag抗体(IgG)为一抗与抗CD19-ScFv融合蛋白上的(His)₆标签结合,进行Western blot反应。结果证实纯化条带为目的蛋白表达产物,见图5、图6。

(4) CD19 ScFv 的复性：将洗脱的样品在 TEA 缓冲液（0.4M 精氨酸-HCl，0.1 M Tris-HCl，2mmol/L EDTA, pH7.0）缓慢透析复性，4℃ 过夜。

4. BCA 法测定蛋白质的浓度：

(1) 配制蛋白测定反应液，取 A 液（BCA 二钠，1%； $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，2%；酒石酸钠，0.16%；NaOH，0.4%； NaHCO_3 ，0.95%；pH11.25）1ml 加入 B 液（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，4%）20 μl 混匀。

(2) 应液中加入 50 μl 样品蛋白溶液，及蛋白标准液（不同浓度的牛血清白蛋白）混匀，于 37℃ 水浴中反应 30 分钟。

(3) 取各管的反应液于 562nm 波长进行光吸收分析，并绘制标准蛋白浓度于光吸收值（OD）的线性图，根据标准蛋白的 OD-蛋白浓度关系，计算蛋白样品的浓度。复性后抗 CD19 ScFv 蛋白浓度为 85.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

5. 抗 CD19 ScFv 抗体活性测定——竞争试验

取 CD19 表达阳性的 Nalm6 细胞系，制成 1×10^6 细胞悬液，加样于 40 孔细胞培养板， 5×10^5 细胞/孔。阴性对照组加 100 μl 人 AB 血清，4℃ 孵育 1 h，3000rpm，4℃ 离心 8 min，弃上清液，PBS 洗细胞 2 次，加鼠源性 IgG 20 μl （1 mg/ml）；阳性对照组于人 AB 血清封闭 1 小时后加入抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 工作液 20 μl ；试验组加人 AB 血清封闭后先加 100 μl 抗 CD19 ScFv，4℃ 孵育 1 h，3000rpm，4℃ 离心 8 min，弃上清液，PBS 洗细胞 2 次，再加抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 20 μl （1 mg/ml），4℃ 孵育 1 h，3000rpm，4℃ 离心 8 min，弃上清液，PBS 洗细胞 2 次。三组细胞分别重悬于 PBS 中，加入 20 μl 羊抗鼠 IgG-FITC 二抗，4℃ 孵育 45 min，PBS 洗去未结合的荧光抗体，流式细胞仪检测单克隆抗体 HI19a 与 Nalm6 细胞系结合的阳性率。

阳性对照组中 Nalm6 细胞与单抗 HI19a 结合阳性率为 92.64%，实验组中的 Nalm6 细胞经抗 CD19 ScFv 竞争结合后，与 HI19a 结合的阳性率为 55.17%，表明抗 CD19 ScFv 可竞争性抑制 HI19a 与 Nalm6 细胞系结合，即抗 CD19 ScFv 能够与 Nalm6 细胞系表面 CD19 抗原特异性结合，见图 7 a、7b、7c、7d。

6. 抗 CD19 ScFv 抗体活性测定——解离常数测定

(1) 在 96 孔酶标板中加入 100 μ l Nalm6 细胞裂解液, 37 $^{\circ}$ C 包被 2 小时;

(2) 甩去包被液, 以 PBS (含 0.05% Tween-20) 洗 3 次, 加入封闭液 (PBS 含 3% 牛血清白蛋白, 10% 羊血清) 封闭 2h 后甩去封闭液, PBS 洗涤 3 次。

(3) 一式二孔加入 100 μ l 1:4 倍比稀释的 CD19 ScFv, 以 3% 的牛血清白蛋白溶液作对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

(4) 除去反应液后以 PBS 洗涤三次, 加入抗 His-tag 单抗 (1:2000 稀释, 0.1 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

(5) 甩去第一抗体溶液, PBS 洗三次后加入辣根过氧化物酶偶联羊抗鼠 IgG (1:1000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

(6) 甩去反应液, PBS 洗三次后, 加显色液 (OPD, H₂O₂) 反应约 10 分钟以 2N H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪 (Vamed Engineering, Austria) 测定各孔 OD_{492nm} 吸光值。每个 ScFv 浓度的光吸收值取均值。

(7) 解离常数计算: 将数据代入 $\Delta A = \Delta A_{\text{MAX}} \times L / (K_d + L)$ 即 $\Delta A = \frac{\Delta A_{\text{MAX}} \times L}{K_d + L}$ (ΔA 为实验组与对照组的 OD 值的差, L 为加入的重组的 CD19 ScFv 的浓度。回归分析, 计算解离常数 K_d 值, $K_d = 1.7 \times 10^{-8}$ mol/L ($R^2 = 0.99$), 见图 8。

SEQUENCE LISTING (序列表)

<110> 中国医学科学院血液学研究所

<120> 用于靶向结合淋巴细胞白血病细胞的抗 CD19 的工程抗体及其用途

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> Mus musculus (小鼠)

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(366)

<400> 1

```

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt      60
tcttgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg      120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttacctg gagatgggtga tactaactac      180
aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca gcggcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc      300
attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc      360
tcctca                                           366

```

<210> 2

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus (小鼠)

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(324)

<400> 1

```

gacattgtgc tcaccagtc tccaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      60
tcacctgcaa ggccagtcag aatgtgggta ctaatgtagc ctggtatcaa cagaaaccag      120
gacaatctcc taaaccactg atttactcgg caacctaccg gaacagtgga gtcctgatc      180
gcttcacagg cagtggatct gggacagatt tctctctcac catcactaac gtgcagtcta      240
aagacttggc agactatttc tgtcaacaat ataacaggta tccgtacacg tccggagggg      300
ggaccaagct ggaaataaaa cggg                                           324

```

<210> 3
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (小鼠)

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(122)
 <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 Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (小鼠)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(108)

<400> 4

```

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

```

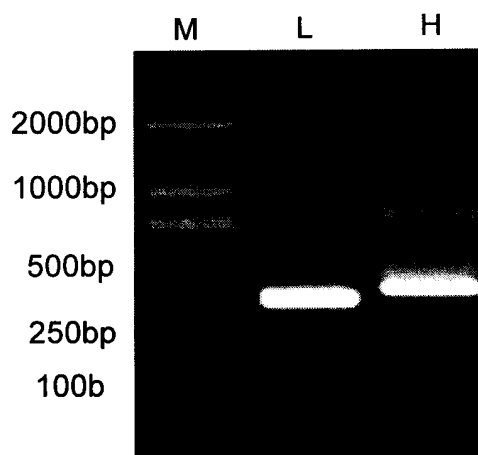


图 1

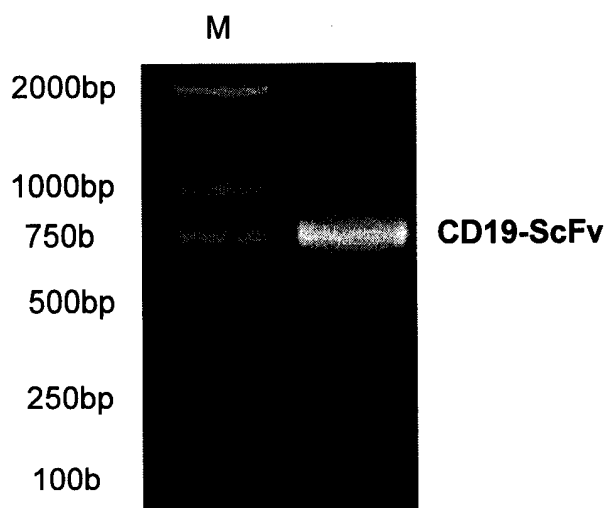


图 2

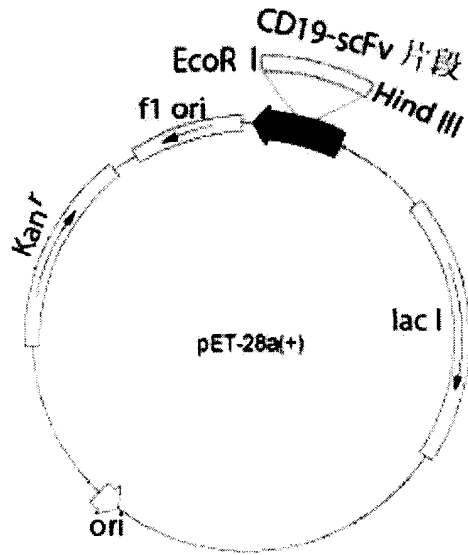


图 3

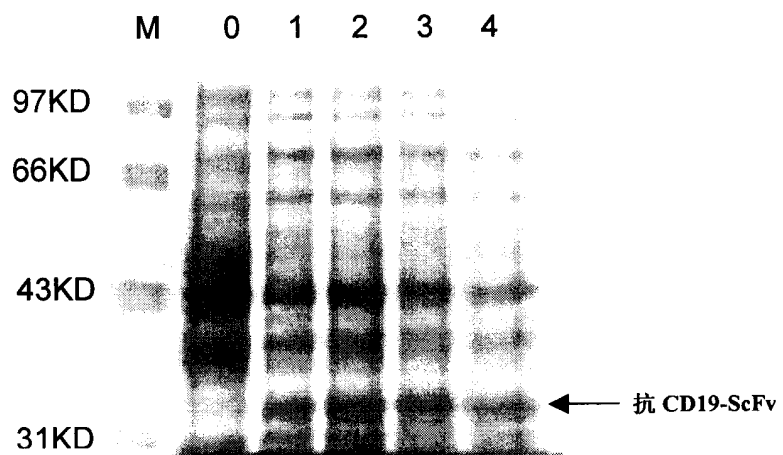


图 4

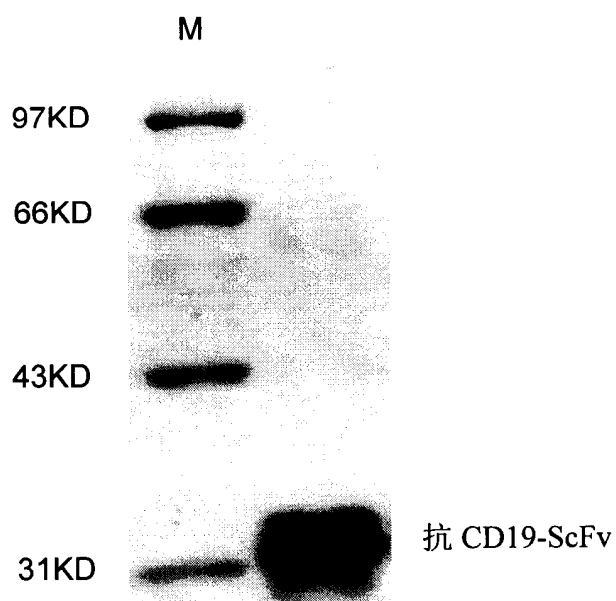


图 5

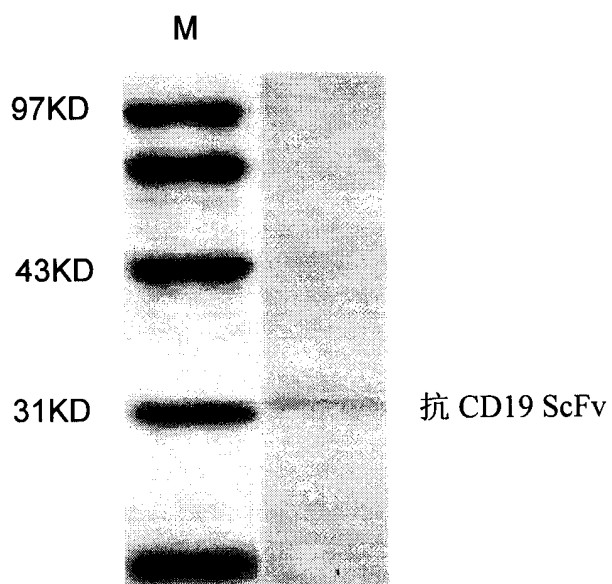
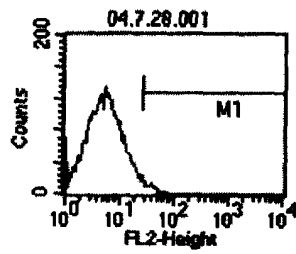
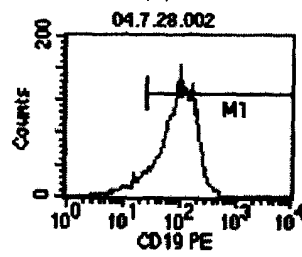


图 6



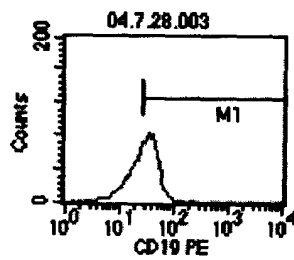
Marker	% Gated
All	100.00
M1	1.16

图 7a



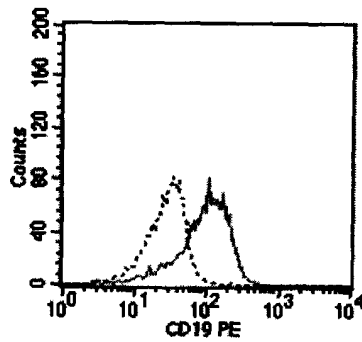
Marker	% Gated
All	100.00
M1	92.64

图 7b



Marker	% Gated
All	100.00
M1	55.17

图 7c



Key	Name	Parameter	Gate
—	04.7.28.002	FL2-H	G1
----	04.7.28.003	FL2-H	G1

图 7d

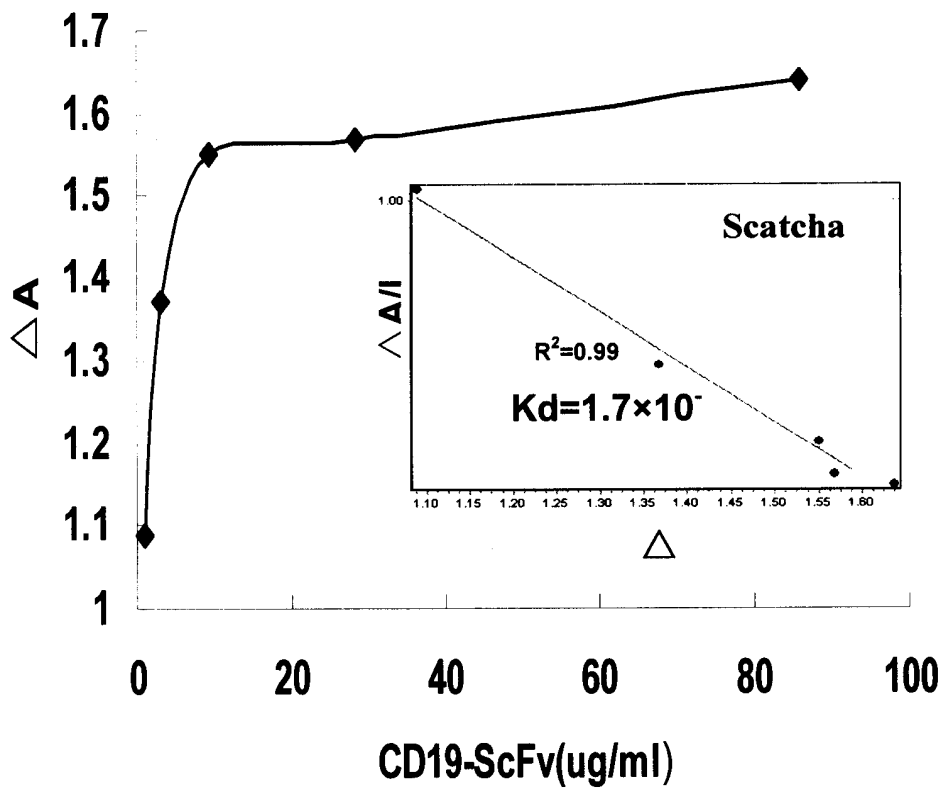


图 8