



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114685662 B

(45) 授权公告日 2022.12.27

(21) 申请号 202210331478.7

G01N 33/574 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.30

A61K 39/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 114685662 A

A61P 35/02 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.07.01

(56) 对比文件

(73) 专利权人 河北森朗生物科技有限公司

CN 114144430 A, 2022.03.04

地址 050000 河北省石家庄市高新区黄河

CN 104004095 A, 2014.08.27

大道136号1号楼512、513室

US 2017226204 A1, 2017.08.10

(72) 发明人 李建强 王琳

CA 3084553 A1, 2019.06.27

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理

范双双等. CD7纳米抗体衍生的CAR-T细胞对CD7阳性急性髓系白血病细胞的杀伤活性.《中国肿瘤生物治疗杂志》.2020,第27卷(第8期),852-859.

有限公司 11736

专利代理师 朱萍

Dan Chen等. Chimeric antigen receptor T cells derived from CD7 nanobody exhibit robust antitumor potential against CD7-positive malignancies.《Am J Cancer Res.》.2021,第11卷(第11期),

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

审查员 曲肖男

权利要求书5页 说明书23页

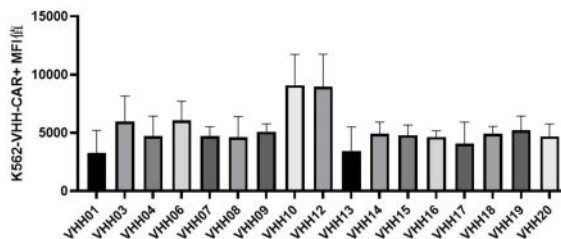
序列表37页 附图12页

(54) 发明名称

抗CD7纳米抗体、衍生物及其在肿瘤治疗中的应用

(57) 摘要

本发明公开了抗CD7纳米抗体、衍生物及其在肿瘤治疗中的应用,所述抗CD7纳米抗体衍生物包括人源化的抗CD7纳米抗体、基于单纳米抗体的嵌合抗原受体、基于双纳米抗体的嵌合抗原受体、重组表达载体、经工程改造的宿主细胞、缀合物、药物组合物、试剂盒、检测细胞表面CD7的试剂,所述纳米抗体与CD7具有较好的亲和力,基于所述纳米抗体制备得到的CAR-T细胞靶向识别肿瘤抗原的能力强且对肿瘤细胞的杀伤活性高,具有重要的临床应用价值。



1. 抗CD7纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体为VHH10;
所述VHH10的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63所示。
2. 根据权利要求1所述的纳米抗体,其特征在于,所述VHH10的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64所示。
3. 根据权利要求1所述的纳米抗体,其特征在于,所述VHH10的氨基酸序列如SEQ ID NO:57所示。
4. 根据权利要求1所述的纳米抗体,其特征在于,所述VHH10的核苷酸序列如SEQ ID NO:58所示。
5. 基于单纳米抗体的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体包含权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体。
6. 根据权利要求5所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含跨膜结构域。
7. 根据权利要求6所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含胞内信号传导结构域。
8. 根据权利要求7所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含铰链区。
9. 根据权利要求8所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含信号肽。
10. 根据权利要求9所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含共刺激信号结构域。
11. 根据权利要求10所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含EF1 α 、T2A、tEGFR。
12. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含tEGFR信号肽。
13. 根据权利要求12所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述跨膜结构域包括下列分子的跨膜结构域:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、IL-11受体。
14. 根据权利要求13所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述胞内信号传导结构域包括下列分子的胞内信号传导结构域:CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、TCR ζ 、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD79a、CD79b、CD278、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12、CD66d。
15. 根据权利要求14所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述铰链区包括下列分子的铰链区:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、IL-11受体。
16. 根据权利要求15所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述信号肽包括下列分子信号肽:T细胞受体的 α 链及 β 链、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD28、CD16、CD22、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、GITR、GM-CSF。
17. 根据权利要求16所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述共刺激信号结构域包括下列分子的共刺激信号结构域:4-1BB (CD137)、CD27、CD19、CD4、CD28、ICOS (CD278)、CD8 α 、CD8

β 、BAFFR、HVEM、LIGHT、KIRDS2、SLAMF7、NKp30、NKp46、CD40、CDS、ICAM-1、B7-H3、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD7、CD226。

18. 根据权利要求17所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述跨膜结构域为CD8 α 跨膜结构域。

19. 根据权利要求18所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述胞内信号传导结构域为CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

20. 根据权利要求19所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述铰链区为CD8 α 铰链区。

21. 根据权利要求20所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述共刺激信号结构域为4-1BB共刺激信号结构域。

22. 根据权利要求21所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到。

23. 基于双纳米抗体的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体包含两种纳米抗体,所述两种纳米抗体中的一种为权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体,所述两种纳米抗体中的另一种为权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体或纳米抗体VHH12;

所述VHH12的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71所示。

24. 根据权利要求23所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述VHH12的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72所示。

25. 根据权利要求24所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述VHH12的氨基酸序列如SEQ ID NO:65所示。

26. 根据权利要求25所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述VHH12的核苷酸序列如SEQ ID NO:66所示。

27. 根据权利要求26所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含跨膜结构域。

28. 根据权利要求27所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含胞内信号传导结构域。

29. 根据权利要求28所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含铰链区。

30. 根据权利要求29所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含信号肽。

31. 根据权利要求30所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含共刺激信号结构域。

32. 根据权利要求31所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含EF1 α 、T2A、tEGFR。

33. 根据权利要求32所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体还包含tEGFR信号肽。

34. 根据权利要求33所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述跨膜结构域包括下列分子的跨膜结构域:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、

IL-11受体。

35. 根据权利要求34所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述胞内信号传导结构域包括下列分子的胞内信号传导结构域:CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、TCR ζ 、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD79a、CD79b、CD278、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12、CD66d。

36. 根据权利要求35所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述铰链区包括下列分子的铰链区:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、IL-11受体。

37. 根据权利要求36所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述信号肽包括下列分子的信号肽:T细胞受体的 α 链及 β 链、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD28、CD16、CD22、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、GITR、GM-CSF。

38. 根据权利要求37所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述共刺激信号结构域包括下列分子的共刺激信号结构域:4-1BB (CD137)、CD27、CD19、CD4、CD28、ICOS (CD278)、CD8 α 、CD8 β 、BAFFR、HVEM、LIGHT、KIRDS2、SLAMF7、NKp30、NKp46、CD40、CDS、ICAM-1、B7-H3、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD7、CD226。

39. 根据权利要求38所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述跨膜结构域为CD8 α 跨膜结构域。

40. 根据权利要求39所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述胞内信号传导结构域为CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

41. 根据权利要求40所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述铰链区为CD8 α 铰链区。

42. 根据权利要求41所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述共刺激信号结构域为4-1BB共刺激信号结构域。

43. 根据权利要求42所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述两种纳米抗体通过连接肽Linker进行连接。

44. 根据权利要求43所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、所述两种纳米抗体中的一种、Linker、所述两种纳米抗体中的另一种、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到。

45. 根据权利要求44所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、Linker、权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到。

46. 根据权利要求45所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、Linker、所述纳米抗体VHH12、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到。

47. 核酸分子,其特征在于,所述核酸分子为编码权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、权利要求5所述的嵌合抗原受体或权利要求23所述的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

48. 根据权利要求47所述的核酸分子,其特征在于,所述核苷酸序列如SEQ ID NO:58。

49. 重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体包含权利要求47所述的核酸分子。

50. 根据权利要求49所述的重组表达载体,其特征在於,所述表达载体包括DNA载体、RNA载体、质粒、转座子载体、CRISPR/Cas9载体或病毒载体。

51. 根据权利要求50所述的重组表达载体,其特征在於,所述病毒载体包含慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体。

52. 经工程改造的宿主细胞,其特征在於,所述经工程改造的宿主细胞表达权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、权利要求5所述的嵌合抗原受体或权利要求23所述的嵌合抗原受体。

53. 根据权利要求52所述的经工程改造的宿主细胞,其特征在於,所述经工程改造的宿主细胞包含权利要求49所述的重组表达载体。

54. 根据权利要求53所述的经工程改造的宿主细胞,其特征在於,所述经工程改造的宿主细胞包含经工程改造的免疫细胞。

55. 根据权利要求54所述的经工程改造的宿主细胞,其特征在於,所述经工程改造的免疫细胞包含T细胞、NK细胞、iNKT细胞、CTL细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和/或NKT细胞。

56. 根据权利要求55所述的经工程改造的宿主细胞,其特征在於,所述经工程改造的免疫细胞为T细胞。

57. 一种缀合物,其特征在於,所述缀合物包含权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体以及连接于所述纳米抗体的修饰部分,所述修饰部分包括可检测的标记和/或治疗剂。

58. 根据权利要求57所述的缀合物,其特征在於,所述可检测的标记包括酶、放射性核素、荧光染料、发光物质、生物素。

59. 根据权利要求57所述的缀合物,其特征在於,所述治疗剂包括具有抗肿瘤活性的药物或细胞毒剂。

60. 一种药物组合物,其特征在於,所述药物组合物包含权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、权利要求5所述的嵌合抗原受体、权利要求23所述的嵌合抗原受体、权利要求47所述的核酸分子、权利要求49所述的重组表达载体、权利要求52所述的经工程改造的宿主细胞和/或权利要求57所述的缀合物。

61. 一种试剂盒,其特征在於,所述试剂盒包含权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、权利要求5所述的嵌合抗原受体、权利要求23所述的嵌合抗原受体、权利要求47所述的核酸分子、权利要求49所述的重组表达载体、权利要求52所述的经工程改造的宿主细胞和/或权利要求57所述的缀合物。

62. 一种检测CD7蛋白的试剂,其特征在於,所述检测CD7蛋白的试剂包含权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体和/或权利要求57所述的缀合物。

63. 一种非诊断目的的检测CD7蛋白的方法,其特征在於,所述方法包括如下步骤:

① 获取含有CD7蛋白的样品;

② 将步骤①收集的样品与权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体或权利要求57所述的缀合物接触;

③ 检测抗体-抗原复合物的存在。

64. 一种权利要求52所述的经工程改造的宿主细胞的制备方法,所述方法包括如下步骤:将权利要求49所述的重组表达载体引入到宿主细胞中。

65. 根据权利要求64所述的方法,其特征在于,所述引入的方法包括脂质转染法、微注射、电穿孔、DNA载体、RNA载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、痘病毒载体、单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体。

66. 权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体在非诊断和治疗目的地检测CD7蛋白中的应用。

67. 权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体在制备用于检测CD7蛋白的试剂或试剂盒中的应用。

68. 权利要求1-4中任一项所述的纳米抗体、权利要求5所述的嵌合抗原受体、权利要求23所述的嵌合抗原受体、权利要求47所述的核酸分子、权利要求49所述的重组表达载体或权利要求52所述的经工程改造的宿主细胞在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述肿瘤为表达CD7的肿瘤。

69. 根据权利要求68所述的应用,其特征在于,所述抗肿瘤药物包括抗肿瘤免疫细胞治疗剂、抗肿瘤的基因治疗药物。

70. 根据权利要求68所述的应用,其特征在于,所述肿瘤为T淋巴细胞系血液肿瘤。

71. 根据权利要求70所述的应用,其特征在于,所述肿瘤包括急性髓系白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、NKT细胞白血病、外周T细胞淋巴瘤(NHL)、NKT细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

72. 权利要求47所述的核酸分子或权利要求49所述的重组表达载体在制备经工程改造的宿主细胞中的应用,其特征在于,所述经工程改造的宿主细胞为权利要求52所述的经工程改造的宿主细胞。

抗CD7纳米抗体、衍生物及其在肿瘤治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体地,本发明涉及抗CD7纳米抗体、衍生物及其在肿瘤治疗中的应用。

背景技术

[0002] CD7抗原是一种单链糖蛋白,是T细胞发育过程中的标志性抗原分子。除健康人胸腺细胞、T细胞和自然杀伤细胞外,淋系、髓系前体细胞等造血干祖细胞也表达CD7。大量研究显示在多数的人T淋巴细胞白血病和淋巴瘤上表达CD7分子(Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, et al. Non-B, non-T neoplasms with lymphoblast morphology: further clarification and classification [J]. The American journal of surgical pathology, 2003, 27 (10): 1366-1374.; Shiyong Li, Jonathan Juco, Karen P. Mann, et al. Flow Cytometry in the Differential Diagnosis of Lymphocyte-Rich Thymoma From Precursor T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma [J]. American Journal of Clinical Pathology, 2004, 121: 268-274.) 和约10%的急性髓系白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 上表达CD7抗原 (Foon K A, Todd R F. Immunologic classification of leukemia and lymphoma [J]. Blood. 1986, 68: 1-31); 此外,当CD7分子与其对应的抗体结合后会快速地发生内吞作用,这一特性使得CD7可作为一个适合靶向递送各类功能分子到CD7阳性细胞内的抗原受体;相关研究还表明人体内存在一群CD7阴性的T淋巴细胞群,这一群细胞可以维持人体正常的免疫功能,避免了使用CD7纳米抗体相关的免疫细胞清除全部CD7阳性细胞而造成的免疫功能丢失,可见靶向CD7是一个极具潜力的抗肿瘤方向。

[0003] 嵌合抗原受体修饰T细胞 (Chimeric antigen receptor modification T cells, CAR-T) 和嵌合抗原受体修饰NK细胞 (Chimeric antigen receptor modification NK cells, CAR-NK) 免疫疗法是目前研究进展最为迅速的两种肿瘤细胞免疫疗法,而CAR-T/CAR-NK细胞的有效激活均严重依赖识别肿瘤相关抗原的抗体的特异性以及抗原结合的亲和力高低等性质。所以在目前CAR-T/CAR-NK细胞胞内信号转导区的设计已经趋于成熟的现状下,抗原结合区的设计成为新型CAR-T技术开发的重点和关键。从骆驼源重链抗体 (Heavy chain antibody, HCAb) 中克隆出仅由一个重链可变区组成的单链抗体,其大小仅为 $2.4 \times 4 \text{ nm}$,是能够结合抗原的最小片段,称为单域抗体 (Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH) 或纳米抗体。与传统抗体相比,VHH单域抗体分子量小且表达量高,化学稳定性好,亲和力高并且与人源抗体同源性高,免疫原性低。分子量小易于进行基因工程改造,构建双重或多重特异性的单域抗体组合,达到一个分子多靶点或多种功能的效果。VHH组织渗透性好,在进行肿瘤治疗时,具有接触到不能被常规抗体接触的较为隐蔽的靶点的可能性。正由于这些优点,利用单域抗体作为CAR的抗原结合区进行CAR修饰及CAR-T/CAR-NK细胞疗法能够为本领域提供全新的肿瘤治疗策略。

发明内容

[0004] 鉴于此,本发明的目的在于为本领域提供抗CD7纳米抗体、衍生物及其在肿瘤治疗中的应用。

[0005] 本发明的上述目的通过以下技术方案得以实现:

[0006] 本发明的第一方面提供了抗CD7纳米抗体。

[0007] 进一步,所述纳米抗体为VHH01、VHH03、VHH04、VHH06、VHH07、VHH08、VHH09、VHH10、VHH12、VHH13、VHH14、VHH15、VHH16、VHH17、VHH18、VHH19或VHH20中的至少一种;

[0008] 优选地,所述VHH01的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7所示或分别为与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0009] 优选地,所述VHH03的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15所示或分别为与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0010] 优选地,所述VHH04的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23所示或分别为与SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0011] 优选地,所述VHH06的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31所示或分别为与SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0012] 优选地,所述VHH07的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39所示或分别为与SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0013] 优选地,所述VHH08的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47所示或分别为与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0014] 优选地,所述VHH09的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55所示或分别为与SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0015] 优选地,所述VHH10的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63所示或分别为与SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0016] 优选地,所述VHH12的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71所示或分别为与SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0017] 优选地,所述VHH13的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79所示或分别为与SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0018] 优选地,所述VHH14的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:87所示或分别为与SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:87具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0019] 优选地,所述VHH15的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95所示或分别为与SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0020] 优选地,所述VHH16的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:103所示或分别为与SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:103具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0021] 优选地,所述VHH17的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:111所示或分别为与SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:111具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0022] 优选地,所述VHH18的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:119所示或分别为与SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:119具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0023] 优选地,所述VHH19的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:127所示或分别为与SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:127具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0024] 优选地,所述VHH20的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:135所示或分别为与SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:135具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序

列；

[0025] 更优选地，所述VHH01的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8所示或分别为与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0026] 更优选地，所述VHH03的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16所示或分别为与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0027] 更优选地，所述VHH04的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24所示或分别为与SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0028] 更优选地，所述VHH06的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32所示或分别为与SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0029] 更优选地，所述VHH07的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40所示或分别为与SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0030] 更优选地，所述VHH08的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48所示或分别为与SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0031] 更优选地，所述VHH09的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56所示或分别为与SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0032] 更优选地，所述VHH10的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64所示或分别为与SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0033] 更优选地，所述VHH12的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72所示或分别为与SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0034] 更优选地，所述VHH13的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80所示或分别为与SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80具有

至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0035] 更优选地，所述VHH14的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88所示或分别为与SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0036] 更优选地，所述VHH15的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96所示或分别为与SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0037] 更优选地，所述VHH16的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104所示或分别为与SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0038] 更优选地，所述VHH17的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:112所示或分别为与SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:112具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0039] 更优选地，所述VHH18的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:120所示或分别为与SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:120具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0040] 更优选地，所述VHH19的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:128所示或分别为与SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:128具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0041] 更优选地，所述VHH20的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:136所示或分别为与SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:136具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0042] 最优选地，所述VHH01、VHH03、VHH04、VHH06、VHH07、VHH08、VHH09、VHH10、VHH12、VHH13、VHH14、VHH15、VHH16、VHH17、VHH18、VHH19、VHH20的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:

97、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:129所示或分别为与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:129具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0043] 最优选地，所述VHH01、VHH03、VHH04、VHH06、VHH07、VHH08、VHH09、VHH10、VHH12、VHH13、VHH14、VHH15、VHH16、VHH17、VHH18、VHH19、VHH20的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:130所示或分别为与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:130具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列。

[0044] 进一步，所述VHH01、VHH03、VHH04、VHH06、VHH07、VHH08、VHH09、VHH10、VHH12、VHH13、VHH14、VHH15、VHH16、VHH17、VHH18、VHH19或VHH20中的一种或多种的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列或核苷酸序列任意组合得到的纳米抗体同样在本发明的保护范围内。

[0045] 进一步，CD7是T细胞表面一个非常稳定的标志物，无论是幼稚的T细胞还是成熟的T细胞均会表达CD7，所以不管是幼稚T细胞肿瘤(T-ALL/LBL/NKT细胞白血病)患者，还是成熟T细胞肿瘤(外周T细胞淋巴瘤、NKT细胞淋巴瘤、间变大细胞淋巴瘤)患者，基本都高表达CD7，因此，针对该靶点的CAR-T治疗T系血液肿瘤是目前临床上发展最为迅速的技术之一。

[0046] 本发明的第二方面提供了人源化的抗CD7纳米抗体。

[0047] 进一步，所述人源化的抗CD7纳米抗体为以通用人源化框架h-NbBcII10FGLA为参考，并通过与DP-47进行比对，对纳米抗体关键位置的残基进行人源化改造后得到的；

[0048] 优选地，所述人源化的抗CD7纳米抗体为hVHH01、hVHH03、hVHH04、hVHH06、hVHH07、hVHH08、hVHH09、hVHH10、hVHH12、hVHH13、hVHH14、hVHH15、hVHH16、hVHH17、hVHH18、hVHH19或hVHH20中的至少一种；

[0049] 更优选地，所述hVHH06的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:143所示或分别为与SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:143具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0050] 最优选地，所述hVHH06的CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:144所示或分别为与SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:144具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0051] 最优选地,所述hVHH06的氨基酸序列如SEQ ID NO:137所示或与SEQ ID NO:137具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0052] 最优选地,所述hVHH06的核苷酸序列如SEQ ID NO:138所示或与SEQ ID NO:138具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列。

[0053] 本发明的第三方面提供了基于单纳米抗体的嵌合抗原受体。

[0054] 进一步,所述嵌合抗原受体包含本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体中的任意一种;

[0055] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含跨膜结构域;

[0056] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含胞内信号传导结构域;

[0057] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含铰链区;

[0058] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含信号肽;

[0059] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含共刺激信号结构域;

[0060] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含EF1 α 、T2A、tEGFR;

[0061] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含tEGFR信号肽;

[0062] 更优选地,所述跨膜结构域包括下列分子的跨膜结构域:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、IL-11受体;

[0063] 更优选地,所述胞内信号传导结构域包括下列分子的胞内信号传导结构域:CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、TCR ζ 、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD79a、CD79b、CD278、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12、CD66d;

[0064] 更优选地,所述铰链区包括下列分子的铰链区:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、IL-11受体;

[0065] 更优选地,所述信号肽包括下列分子信号肽:T细胞受体的 α 链及 β 链、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD28、CD16、CD22、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、GITR、GM-CSF;

[0066] 更优选地,所述共刺激信号结构域包括下列分子的共刺激信号结构域:4-1BB (CD137)、CD27、CD19、CD4、CD28、ICOS (CD278)、CD8 α 、CD8 β 、BAFFR、HVEM、LIGHT、KIRDS2、SLAMF7、NKp30、NKp46、CD40、CDS、ICAM-1、B7-H3、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD7、CD226;

[0067] 最优选地,所述跨膜结构域为CD8 α 跨膜结构域;

[0068] 最优选地,所述胞内信号传导结构域为CD3 ζ 胞内信号传导结构域;

[0069] 最优选地,所述铰链区为CD8 α 铰链区;

[0070] 最优选地,所述共刺激信号结构域为4-1BB共刺激信号结构域;

[0071] 最优选地,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:145所示或与SEQ ID NO:145具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0072] 最优选地,所述信号肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:146所示或与SEQ ID NO:146具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0073] 最优选地，所述CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:147所示或与SEQ ID NO:147具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0074] 最优选地，所述CD8 α 铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO:148所示或与SEQ ID NO:148具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0075] 最优选地，所述CD8 α 跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:149所示或与SEQ ID NO:149具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0076] 最优选地，所述CD8 α 跨膜结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:150所示或与SEQ ID NO:150具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0077] 最优选地，所述4-1BB共刺激信号结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:151所示或与SEQ ID NO:151具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0078] 最优选地，所述4-1BB共刺激信号结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:152所示或与SEQ ID NO:152具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0079] 最优选地，所述CD3 ζ 胞内信号传导结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:153所示或与SEQ ID NO:153具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0080] 最优选地，所述CD3 ζ 胞内信号传导结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:154所示或与SEQ ID NO:154具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0081] 最优选地，所述T2A的氨基酸序列如SEQ ID NO:155所示或与SEQ ID NO:155具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0082] 最优选地，所述T2A的核苷酸序列如SEQ ID NO:156所示或与SEQ ID NO:156具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0083] 最优选地,所述EF1 α 的核苷酸序列如SEQ ID NO:157所示或与SEQ ID NO:157具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列;

[0084] 最优选地,所述tEGFR信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:158所示或与SEQ ID NO:158具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0085] 最优选地,所述tEGFR信号肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:159所示或与SEQ ID NO:159具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列;

[0086] 最优选地,所述tEGFR的氨基酸序列如SEQ ID NO:160所示或与SEQ ID NO:160具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;

[0087] 最优选地,所述tEGFR的核苷酸序列如SEQ ID NO:161所示或与SEQ ID NO:161具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列;

[0088] 最优选地,所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体中的任意一种、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到。

[0089] 本发明的第四方面提供了基于双纳米抗体的嵌合抗原受体。

[0090] 进一步,所述嵌合抗原受体包含本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体中的任意两种;

[0091] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含跨膜结构域;

[0092] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含胞内信号传导结构域;

[0093] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含铰链区;

[0094] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含信号肽;

[0095] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含共刺激信号结构域;

[0096] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含EF1 α 、T2A、tEGFR;

[0097] 优选地,所述嵌合抗原受体还包含tEGFR信号肽;

[0098] 更优选地,所述跨膜结构域包括下列分子的跨膜结构域:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、IL-11受体;

[0099] 更优选地,所述胞内信号传导结构域包括下列分子的胞内信号传导结构域:CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、TCR ζ 、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD79a、CD79b、CD278、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12、CD66d;

[0100] 更优选地,所述铰链区包括下列分子的铰链区:CD8 α 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 ϵ 、IL-2受体、IL-7受体、IL-11受体;

[0101] 更优选地,所述信号肽包括下列分子信号肽:T细胞受体的 α 链及 β 链、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD28、CD16、CD22、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、

CD154、GITR、GM-CSF；

[0102] 更优选地，所述共刺激信号结构域包括下列分子的共刺激信号结构域：4-1BB (CD137)、CD27、CD19、CD4、CD28、ICOS (CD278)、CD8 α 、CD8 β 、BAFFR、HVEM、LIGHT、KIRDS2、SLAMF7、NKp30、NKp46、CD40、CDS、ICAM-1、B7-H3、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD7、CD226；

[0103] 最优选地，所述跨膜结构域为CD8 α 跨膜结构域；

[0104] 最优选地，所述胞内信号传导结构域为CD3 ζ 胞内信号传导结构域；

[0105] 最优选地，所述铰链区为CD8 α 铰链区；

[0106] 最优选地，所述共刺激信号结构域为4-1BB共刺激信号结构域；

[0107] 最优选地，所述本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体中的任意两种纳米抗体通过连接肽Linker进行连接；

[0108] 最优选地，所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体中的任意两种、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到；

[0109] 最优选地，所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面所述的纳米抗体中的任意一种、Linker、本发明第一方面所述的纳米抗体中的任意一种、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到；

[0110] 最优选地，所述本发明第一方面所述的纳米抗体中的任意一种为VHH03、VHH06、VHH10、VHH12；

[0111] 最优选地，所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面中所述的VHH06、Linker、本发明第一方面中所述的VHH03、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到；

[0112] 最优选地，所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面中所述的VHH06、Linker、本发明第一方面中所述的VHH12、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到；

[0113] 最优选地，所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面中所述的VHH10、Linker、本发明第一方面中所述的VHH12、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到；

[0114] 最优选地，所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面中所述的VHH10、Linker、本发明第一方面中所述的VHH10、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到；

[0115] 最优选地，所述嵌合抗原受体为EF1 α 、信号肽、本发明第一方面中所述的VHH12、Linker、本发明第一方面中所述的VHH12、CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、T2A、tEGFR信号肽、tEGFR依次串联得到；

[0116] 最优选地，所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:145所示或与SEQ ID NO:145具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0117] 最优选地，所述信号肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:146所示或与SEQ ID NO:146具

有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0118] 最优选地,所述CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:147所示或与SEQ ID NO:147具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0119] 最优选地,所述CD8 α 铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO:148所示或与SEQ ID NO:148具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0120] 最优选地,所述CD8 α 跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:149所示或与SEQ ID NO:149具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0121] 最优选地,所述CD8 α 跨膜结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:150所示或与SEQ ID NO:150具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0122] 最优选地,所述4-1BB共刺激信号结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:151所示或与SEQ ID NO:151具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0123] 最优选地,所述4-1BB共刺激信号结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:152所示或与SEQ ID NO:152具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0124] 最优选地,所述CD3 ζ 胞内信号传导结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:153所示或与SEQ ID NO:153具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0125] 最优选地,所述CD3 ζ 胞内信号传导结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:154所示或与SEQ ID NO:154具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0126] 最优选地,所述T2A的氨基酸序列如SEQ ID NO:155所示或与SEQ ID NO:155具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0127] 最优选地,所述T2A的核苷酸序列如SEQ ID NO:156所示或与SEQ ID NO:156具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0128] 最优选地，所述EF1 α 的核苷酸序列如SEQ ID NO:157所示或与SEQ ID NO:157具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0129] 最优选地，所述tEGFR信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:158所示或与SEQ ID NO:158具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0130] 最优选地，所述tEGFR信号肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:159所示或与SEQ ID NO:159具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列；

[0131] 最优选地，所述tEGFR的氨基酸序列如SEQ ID NO:160所示或与SEQ ID NO:160具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；

[0132] 最优选地，所述tEGFR的核苷酸序列如SEQ ID NO:161所示或与SEQ ID NO:161具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列。

[0133] 本发明的第五方面提供了核酸分子。

[0134] 进一步，所述核酸分子包含编码本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的纳米抗体、本发明第三方面所述的嵌合抗原受体或本发明第四方面所述的嵌合抗原受体的核苷酸序列；

[0135] 优选地，所述核苷酸序列如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:130所示或与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:130具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列。

[0136] 本发明的第六方面提供了重组表达载体。

[0137] 进一步，所述重组表达载体包含本发明第五方面所述的核酸分子；

[0138] 优选地，所述表达载体包括DNA载体、RNA载体、质粒、转座子载体、CRISPR/Cas9载体、或病毒载体；

[0139] 更优选地，所述病毒载体包含慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体。

[0140] 本发明的第七方面提供了经工程改造的宿主细胞。

[0141] 进一步，所述经工程改造的宿主细胞表达本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的纳米抗体、本发明第三方面所述的嵌合抗原受体或本发明第四方面所述

的嵌合抗原受体；

[0142] 优选地，所述经工程改造的宿主细胞包含本发明第六方面所述的重组表达载体；

[0143] 优选地，所述经工程改造的宿主细胞包含经工程改造的免疫细胞；

[0144] 更优选地，所述经工程改造的免疫细胞包含T细胞、NK细胞、iNKT细胞、CTL细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、NKT细胞。

[0145] 本发明的第八方面提供了一种缀合物或药物组合物或试剂盒或检测CD7蛋白或其抗原片段的试剂。

[0146] 进一步，所述缀合物包含本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体、以及连接于所述纳米抗体的修饰部分，所述修饰部分包括可检测的标记、治疗剂；

[0147] 优选地，所述可检测的标记包括酶、放射性核素、荧光染料、发光物质、生物素，

[0148] 优选地，所述治疗剂包括具有抗肿瘤活性的药物或细胞毒剂；

[0149] 优选地，所述药物组合物或试剂盒包含本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的纳米抗体、本发明第三方面所述的嵌合抗原受体、本发明第四方面所述的嵌合抗原受体、本发明第五方面所述的核酸分子、本发明第六方面所述的重组表达载体、本发明第七方面所述的经工程改造的宿主细胞或所述缀合物；

[0150] 优选地，所述检测CD7蛋白或其抗原片段的试剂包含本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的纳米抗体或所述缀合物。

[0151] 进一步，所述药物组合物中还包含另外的药学活性剂；

[0152] 优选地，所述另外的药学活性剂包括另外的抗体、融合蛋白或药物（如抗肿瘤药物，如用于放疗的药物或化疗药物）。

[0153] 进一步，所述药物组合物中还包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0154] 本发明的第九方面提供了如下任一种方法：

[0155] (1) 一种非诊断目的的检测CD7蛋白或其抗原片段的方法，所述方法包括如下步骤：

[0156] ①获取含有CD7蛋白或其抗原片段的样品；

[0157] ②将步骤1)收集的样品与本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的纳米抗体或本发明第八方面所述的缀合物接触；

[0158] ③检测抗体-抗原复合物的存在；

[0159] (2) 一种本发明第七方面所述的经工程改造的宿主细胞的制备方法，所述方法包括如下步骤：将本发明第六方面所述的重组表达载体引入到宿主细胞中；

[0160] 优选地，所述引入的方法包括脂质转染法、微注射、电穿孔、DNA载体、RNA载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、痘病毒载体、单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体。

[0161] 本发明的第十方面提供了如下任一方面的应用：

[0162] (1) 本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体在检测CD7蛋白或其抗原片段中的应用；

[0163] (2) 本发明第一方面所述的纳米抗体或本发明第二方面所述的纳米抗体在制备用于检测CD7蛋白或其抗原片段的试剂或试剂盒中的应用；

[0164] (3) 本发明第一方面所述的纳米抗体、本发明第二方面所述的纳米抗体、本发明第三方面所述的嵌合抗原受体、本发明第四方面所述的嵌合抗原受体、本发明第五方面所述的核酸分子、本发明第六方面所述的重组表达载体或本发明第七方面所述的经工程改造的宿主细胞在制备抗肿瘤药物中的应用；

[0165] (4) 本发明第五方面所述的核酸分子或本发明第六方面所述的重组表达载体在制备经工程改造的宿主细胞中的应用，所述经工程改造的宿主细胞为本发明第七方面所述的经工程改造的宿主细胞；

[0166] 优选地，所述抗肿瘤药物包括抗肿瘤免疫细胞治疗剂、抗肿瘤的基因治疗药物；

[0167] 优选地，所述肿瘤为表达CD7的肿瘤；

[0168] 更优选地，所述肿瘤为T淋巴细胞系血液肿瘤；

[0169] 最优选地，所述肿瘤包括急性髓系白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、淋巴瘤细胞淋巴瘤(LBL)、NKT细胞白血病、外周T细胞淋巴瘤(NHL)、NKT细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0170] 本发明还提供了一种预防和/或治疗患有表达CD7肿瘤的受试者的方法。

[0171] 进一步，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本发明第七方面所述的经工程改造的宿主细胞或本发明第八方面所述的药物组合物。

[0172] 进一步，所述经工程改造的宿主细胞包含表达抗CD7的本发明第三方面所述的基于单纳米抗体的嵌合抗原受体(CAR)或本发明第四方面所述的基于双纳米抗体的嵌合抗原受体的免疫细胞；

[0173] 优选地，所述免疫细胞包括T细胞、NK细胞、iNKT细胞、CTL细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、NKT细胞；

[0174] 更优选地，所述经工程改造的宿主细胞为CAR-T细胞。

[0175] 进一步，选自以下的量给受试者施用所述的经工程改造的宿主细胞：

[0176] (1) 若所述受试者的体重小于100公斤(kg)并且年龄小于18岁，则从为或约 0.05×10^6 个CAR-T细胞/kg所述受试者的体重至为或约 5.0×10^6 个CAR-T细胞/kg所述受试者的体重；

[0177] (2) 如果所述受试者的体重为或大于100公斤(kg)或年龄大于18岁，则从为或约 0.05×10^8 个CAR-T细胞/kg所述受试者的体重至为或约 5.0×10^8 个CAR-T细胞/kg所述受试者的体重。

[0178] 在本发明的一些实施方案中，所述CAR-T细胞疗法是通过自体转移进行的，其中从接受细胞疗法的受试者或从源自这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。因此，在一些方面，细胞源自需要治疗的受试者(例如，患者)，并且在分离和处理后将细胞施用于同一受试者。

[0179] 在本发明的另一些实施方案中，所述CAR-T细胞疗法是通过同种异体转移进行，其中从将要接受或最终接受细胞疗法的受试者以外的受试者(例如，第一受试者)分离和/或以其他方式制备细胞。在此类实施方案中，然后将细胞施用于相同物种的不同受试者，例如第二受试者。在一些实施方案中，所述第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中，所述第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中，所述第二受试者与所述第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。

[0180] 在本发明的具体实施方案中,可以将所述CAR-T细胞通过任何合适的方式施用,例如通过推注输注,通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下(Subconjunctival)注射、眼球筋膜囊下(Sub-Tenon)注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜(Posterior juxtasclear)递送。在一些实施方案中,将它们通过肠胃外、肺内和鼻内以及(如果需要用于局部治疗的话)病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中,给定剂量是通过所述细胞的单次推注施用来施用。在一些实施方案中,给定剂量通过例如在不超过3天的时间段内细胞的多次推注施用,或通过细胞的连续输注施用来施用。在一些实施方案中,细胞剂量或任何其他疗法(例如,淋巴细胞清除疗法、干预疗法和/或组合疗法)的施用是通过门诊递送进行的。

[0181] 进一步,对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可取决于要治疗的疾病类型、细胞的类型、疾病的严重程度和病程、是针对预防目的还是针对治疗目的而施用细胞、先前治疗、受试者的临床病史和对细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,适合将药物组合物和/或CAR-T细胞一次或在一系列治疗中施用至受试者。

[0182] 在一些实施方案中,所述CAR-T细胞是作为组合治疗的一部分来施用,如与另一种或另外的治疗性干预(如抗体或工程化细胞或受体或药剂、如细胞毒性剂或治疗剂)同时或以任何顺序依序施用。在一些实施方案中,将所述CAR-T细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗性干预联合施用(同时或以任何顺序依次施用)。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是现有技术中本领域技术人员公知的可用于肿瘤干预治疗的任何干预制剂或药剂,在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之前施用所述细胞。在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之后施用所述细胞。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括细胞因子如IL-2,以例如增强持久性。在一些实施方案中,所述方法包括施用化学治疗剂。在一些实施方案中,所述方法包括在所述施用之前施用化学治疗剂(例如,调理性化学治疗剂),例如以减小肿瘤负荷。在一些实施方案中,用免疫清除(例如,淋巴细胞清除)疗法预调理受试者可以改善细胞疗法的效果。

[0183] 在一些实施方案中,所提供的方法和应用中涉及的施用CAR-T细胞或药物组合物的全部或一部分,所述细胞如表达本发明第二方面所述的嵌合抗原受体CAR或本发明第三方面所述的嵌合抗原受体的工程化免疫细胞,在一些实施方案中,向受试者施用特定量或数量的细胞,或特定量的含有所述特定量或数量的细胞的药物组合物。在一些实施方案中,向受试者施用一个或多个细胞剂量,其含有特定量或数量的细胞或特定量的含有所述特定量或数量的细胞的药物组合物。在一些实施方案中,根据所提供方法和/或用所提供的制品或组合物将一定剂量的细胞施用至受试者。在一些实施方案中,剂量的大小、量或时间安排根据所述受试者的年龄来确定。在一些实施方案中,剂量的大小、量或时间安排根据所述受试者的体重来确定。在一些实施方案中,剂量的大小、量或时间安排根据受试者的肿瘤的特定类型来确定。

[0184] 本发明还提供了一种用于诊断受试者是否患有表达CD7肿瘤的方法。

[0185] 进一步,所述方法包括如下步骤:

[0186] (1) 提供来自怀疑患有表达CD7肿瘤的受试者的样品;

[0187] (2) 将样品与本发明第一方面所述的纳米抗体或第二方面所述的纳米抗体接触;

[0188] (3) 检测包含所述纳米抗体与抗原的复合物的形成,得到在来自所述受试者的样品中CD7的量,并将所述CD7在来自所述受试者的样品中的量与其在已知标准品或参照样品中的量进行比较,并确定来自所述受试者的样品的CD7水平是否落入与肿瘤相关的CD7水平内;

[0189] 优选地,所述样品可以选自尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞、组织或组织学制备物;

[0190] 优选地,所述肿瘤为T淋巴细胞系血液肿瘤;

[0191] 更优选地,所述肿瘤包括急性髓系白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、淋巴瘤母细胞淋巴瘤(LBL)、NKT细胞白血病、外周T细胞淋巴瘤(NHL)、NKT细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0192] 相对于现有技术,本发明具有的优点和有益效果如下:

[0193] 本发明提供了抗CD7的纳米抗体,所述纳米抗体与CD7具有较好的亲和力,将所述纳米抗体作为嵌合抗原受体的抗原结合区进行了嵌合抗原受体修饰并用于CAR-T细胞疗法中,相对于传统的基于单克隆抗体(scFv)构建得到的CAR-T细胞而言,本发明基于单纳米抗体或双纳米抗体构建得到的CAR-T细胞具有多种优势,不仅有效避免了传统的以scFv为基础设计的CAR-T所常有的表达困难、稳定性差等缺陷,而且明显增强了免疫细胞靶向识别肿瘤抗原的能力,加强了对肿瘤细胞的杀伤活性,应用前景广阔。

附图说明

[0194] 图1为CD7抗原纯化SDS-PAGE结果图;

[0195] 图2为羊驼免疫流程图;

[0196] 图3为纳米抗体文库构建过程中第一轮PCR扩增结果图;

[0197] 图4为纳米抗体文库构建过程中第二轮PCR扩增结果图;

[0198] 图5为纳米抗体文库多样性检测PCR结果图;

[0199] 图6为噬菌体淘选后阳性组与阴性组的比值结果图;

[0200] 图7为单克隆筛选OD值统计结果图;

[0201] 图8为单克隆筛选与鉴定统计结果图;

[0202] 图9为单VHH CAR-T结构示意图;

[0203] 图10为慢病毒包装流程图;

[0204] 图11为CAR-T细胞培养流程图;

[0205] 图12为单VHH CAR-T细胞流式细胞术检测代表性结果图;

[0206] 图13为单VHH CAR-T细胞CD7+平均MFI结果统计图;

[0207] 图14为单VHH CAR-T细胞杀伤比例统计结果图;

[0208] 图15为单VHH K562细胞系平均MFI值统计结果图;

[0209] 图16为单VHH专属性检测结果图;

[0210] 图17为单VHH CAR-T细胞流式细胞术检测代表性结果图;

[0211] 图18为单VHH CAR-T细胞CD7+平均MFI结果图;

[0212] 图19为源化序列与DP-47、模板h-NbBcII10PGLA及原始序列比对结果图,其中,突出显示位点为突变位点;

- [0213] 图20为双VHH CAR-T结构示意图；
- [0214] 图21为双VHH CAR-T细胞流式细胞术检测代表性结果图；
- [0215] 图22为单VHH CAR-T细胞、双VHH CAR-T细胞CD7+平均MFI结果统计图；
- [0216] 图23为dVHH-D CAR-T细胞扩增曲线结果图；
- [0217] 图24为dVHH-D CAR-T细胞杀伤结果图；
- [0218] 图25为dVHH-E CAR-T细胞扩增曲线结果图；
- [0219] 图26为dVHH-E CAR-T细胞杀伤结果图。

具体实施方式

[0220] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。本领域的普通技术人员可以理解为:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0221] 实施例1抗原制备

[0222] 1、实验方法

[0223] 利用RNA提取试剂盒提取T细胞中的RNA。参考SuperScriptTM II Reverse Transcriptase使用说明书,利用random primers引物进行反转录,获得cDNA。以cDNA为模板,通过PCR获得抗原CD7的胞外区基因序列。将CD7胞外区基因序列连接入蛋白表达载体中进行表达,并进行Ni柱纯化,获得纯化的CD7-His蛋白。

[0224] 2、实验结果

[0225] 结果见图1,结果显示,经过SDS-PAGE鉴定,本发明成功制备了大小为17.2kDa,纯度>90%的CD7抗原,可进行后续的羊驼免疫。

[0226] 实施例2纳米抗体文库的构建

[0227] 1、实验方法

[0228] (1) 利用实施例1中本发明自主纯化的CD7-His蛋白进行羊驼免疫,具体羊驼免疫流程图见图2。每周进行1次免疫,共连续进行6次免疫;(3) 最后一次免疫7天后采集外周血100mL,通过Ficoll密度梯度离心法分离外周血单核细胞,并进行RNA的提取,并利用反转录试剂盒进行cDNA的制备;(4) 利用SOE-PCR获得VHH片段,并将其连接入pMES4噬菌体展示载体,(5) 将连接产物电转化至电转感受态细胞TG1中,所得菌库即为构建的FMC63的单域重链抗体噬菌体展示文库,库容量为 3.37×10^8 ;(6) 文库构建完成后,为检测文库的插入效率,随机选择25个克隆利用引物MP57以及GIII进行了菌落PCR,并将PCR产物进行Sanger测序

[0229] 2、实验结果

[0230] 第一轮PCR扩增结果图见图3,结果显示,第一轮PCR结束后,回收大小约为700bp的DNA片段,第二轮PCR扩增结果图见图4,结果显示,第二轮PCR结束后,回收大小约为400bp的DNA片段,文库构建完成后,为检测文库的插入效率,随机选择25个克隆利用引物MP57以及GIII进行了菌落PCR,并将PCR产物进行Sanger测序,结果显示插入率接近95%(见图5)。

[0231] 实施例3纳米抗体的富集筛选

[0232] 1、噬菌体纳米抗体文库的扩增

[0233] (1) 取TG1大肠杆菌纳米抗体文库转接到2-YT液体培养基中,37℃、200rpm培养至OD值为0.5,然后加入辅助噬菌体VCSM13对细胞进行侵染。轻轻混合后在37℃下孵育30分钟。离心菌液以去除微量葡萄糖,再将沉淀重悬于同时加有氨苄和卡那霉素抗性的2-YT培养基中,37℃,200rpm摇培过夜,以扩增展示纳米抗体的噬菌体;(2) 将过夜培养物转移到50mL离心管中,离心取上清液,并添加20% (wt/vol) PEG6000/2.5M NaCl溶液沉淀噬菌体。离心弃上清,PBS重悬沉淀,离心取上清至新的离心管中添加20% (wt/vol) PEG6000/2.5M NaCl溶液重新沉淀噬菌体。离心弃上清,并将沉淀重新悬浮于1mL PBS中。离心后将上清液转移到新的离心管中,添加甘油至终浓度为20%保存于-80℃中;(3) 噬菌体纳米抗体库滴度测定,将噬菌体按10倍梯度进行稀释,取不同稀释倍数的噬菌体对对数生长期的TG1细菌进行侵染,37℃过夜培养,通过第二天的菌斑数目推算噬菌体纳米抗体库的滴度。

[0234] 2、噬菌体富集筛选

[0235] (1) 通过ELISA的方法对纳米抗体进行淘选,将重组CD7-His蛋白包被在酶标板上,在4℃下孵育过夜;(2) 用250μL PBST清洗酶标板三次,添加200μL封闭液,于室温孵育酶标板2h;(3) 在每个孔中加入相对应的噬菌体,室温孵育2h;(4) 250μL PBST洗板15次;(5) 每孔添加100μL浓度为0.25mg/mL的胰蛋白酶,室温700rpm孵育0.5h;(6) 用AEBSF洗脱噬菌体;(7) 将洗脱下的噬菌体进行滴度测定和噬菌体侵染扩增;(8) 洗脱下的噬菌体数量阳性:阴性 ≥ 100 时,停止淘选。

[0236] 3、实验结果

[0237] 淘选结果见表1和图6,淘选两轮后,阳性组与阴性组的比值达到了438倍,已达到了筛选单克隆的标准。所以淘选两轮后,停止淘选,进行下一步单克隆的筛选和鉴定。

[0238] 表1噬菌体淘选结果

筛选次数	CD7	空白	比例
第一次筛选	8×10^6	2×10^5	40
第二次筛选	3.51×10^8	8×10^5	438

[0240] 实施例4阳性单克隆的筛选与鉴定

[0241] 1、实验方法

[0242] (1) 从经过2-3轮筛选后得到的TG1大肠杆菌文库中挑选单个克隆进行扩大培养,并利用辅助噬菌体VCSM13进行侵染,进行单克隆噬菌体的制备。(2) 用适量纳米抗体噬菌体与K562-CD7阳性细胞,室温孵育2h;(3) PBST清洗板子后,加入HA-HRP抗体,室温孵育1h;(4) PBST清洗板子后,加入100μL TMB单组份显色液,室温孵育30min后加入100μL终止液;(5) 利用酶标仪检测450nm处的吸光度;(6) 当样品孔的OD450值与空白对照比例大于2时判定为阳性克隆;(7) 对阳性克隆进行菌液PCR,进行Sanger测序;(8) 经过Sanger测序的单克隆,利用软件DNAMAN进行序列比对。并筛选出序列特异性的克隆。

[0243] 2、实验结果

[0244] 本实施例筛选了9个96孔板共864个单克隆,单克隆OD值结果如图7所示,根据计算原则进行计算,筛选到阳性克隆231个,序列特异性的克隆18个,如图8所示,所述序列特异性的纳米抗体的编号分别为VHH01-VHH20(不包含VHH02、VHH05),VHH01、VHH03、VHH04、VHH06、VHH07、VHH08、VHH09、VHH10、VHH12、VHH13、VHH14、VHH15、VHH16、VHH17、VHH18、

VHH19、VHH20其对应的可变区氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:129所示,其分别对应的可变区核酸序列分别如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:130所示。

[0245] 实施例5单VHH CAR-T细胞的制备及体外功能验证

[0246] 1、单VHH CAR结构构建

[0247] (1) 将序列特异性的克隆进行单VHH CAR结构构建。首先,利用PCR的方法扩增阳性克隆株的VHH序列,第一轮PCR引物为:

[0248] NCAR-F1:5' -CTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3'

[0249] NCAR-R1:5' -TGAGGAGACGGTGACCTGGG-3'

[0250] 第一轮PCR结束后,以第一轮PCR产物为模板进行第二轮PCR,第二轮PCR引物为:

[0251] NCAR-F2:5' -TTTCTGCTGATCCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3'

[0252] NCAR-R2:5' -TAGGAGCCGGGTGGGCGGCCGCGGTGCTGGGGTAGTTGAGGAGACGGTGACCTGGG-3'

[0253] (2) 将第二轮PCR产物通过同源重组的方式,连接入载体Sen1-S88BZ,载体用Not I单酶切。至此,包含有靶向CD7单VHH的CAR结构构建成功。共构建17个单VHH序列,分别命名为VHH01至VHH20(其中不包含02、05和11),构建得到的单VHH CAR-T结构示意图如图9所示,其中,EF1 α 为延长因子1 α 的启动子,leader是信号肽的编码序列,VHH是抗CD7纳米抗体或单链可变片段(scFv)的编码序列,CD8H+TM为CD8铰链区和跨膜区,4-1BB和CD3 ζ 胞内信号区为胞内共刺激域,通过T2A肽连接表达tEGFR胞外区域,以便病毒转导后检测CAR的表达。

[0254] 2、单VHH CAR-T细胞的制备

[0255] CAR-T细胞制备前,首先进行慢病毒的包装:(1)将目的质粒与三个辅助质粒(pMD2.G、pRSV-REV、pMDLg)在PEI-Pr作用下共转染293FT细胞;(2)包装6小时进行换液;(3)包装48小时后进行慢病毒收获;(4)收获的慢病毒原液进行超速离心浓缩,用DMEM高糖培养基重悬慢病毒颗粒,并进行分装备用;慢病毒包装流程如图10所示;

[0256] 慢病毒包装完成后,进行CAR-T细胞的制备:(1)采集患者或健康供者外周血单个核细胞(PBMC);(2)通过CD3磁珠进行 $\alpha\beta$ T细胞分选;(3)分选完成的 $\alpha\beta$ T细胞在TexMACS GMP培养基(MACS)中进行培养;(4)2天后进行慢病毒的转导;(5)继续培养到12-14天进行CAR-T细胞收获,获得靶向CD7的VHH NS CAR-T细胞(命名为VHH01-VHH20,其中不包括VHH02、VHH05和VHH11),CAR-T细胞培养流程如图11所示;(6)培养过程中进行流式检测,测定CAR+细胞的比例及CD7+细胞平均MFI值。

[0257] 3、单VHH CAR-T细胞的体外功能验证

[0258] 为了验证本实施例制备得到的抗CD7 VHH CAR-T细胞的体外生物学活性,培养过程中进行了体外杀伤实验的验证:首先收集靶细胞MOLM-13-Luci-GFP(MOLM-13细胞系为人急性髓系白血病细胞系),2000rpm离心5min,DPBS重悬计数,按 1×10^5 个/孔的数量加到96孔板中。然后根据E:T=3:1向靶细胞中添加适量的效应细胞,混合后孵育4小时,加入相应

的荧光素酶底物,并将96孔板用电化学发光酶标仪读取荧光素酶数值。根据数值变化,计算杀伤比例。另外,在18种单VHH CAR-T细胞培养的第12天,取18种单VHH CAR-T细胞、空白T细胞分别与CD7表达阳性细胞系MOLM-13-Luci-GFP按照E:T=3:1的比例进行细胞杀伤实验。

[0259] 4、实验结果

[0260] 单VHH CAR-T细胞流式细胞术检测代表性结果、及其CD7+平均MFI结果分别见图12和图13,结果显示,VHH01至VHH20(不包括VHH02和VHH05)的CAR阳性率分别为:61.04%、96.2%、78.9%、83%、85%、72.72%、89%、95.6%、65.43%、90.98%、68.38%、65%、84.1%、79.6%、54.4%、89.2%、72.6%、62.15%;空白T细胞CD7阳性细胞平均MFI值为2588,VHH01至VHH20(不包括VHH02和VHH05)的CAR-T细胞CD7阳性细胞平均MFI值分别为:2257、694、1281、498、1566、2362、841、197、2285、190、2010、1473、1077、1300、2054、1117、1391、2041;

[0261] 体外功能验证的结果见图14,结果显示,空白T细胞的杀伤比例为13.65%,VHH01至VHH20(不包括VHH02和VHH05)CAR-T细胞的杀伤比例分别为4.79%、75.7%、57%、62.19%、61.63%、68.52%、71.47%、91.36%、32.04%、78.18%、1.18%、60.44%、56.77%、72.87%、8.58%、74.52%、61.71%、9.38%。

[0262] 实施例6纳米抗体亲和力、专属性的检测

[0263] 1、亲和力检测

[0264] 将实施例4中经筛选鉴定得到的17种单VHH对应的VHH CAR结构转导人髓系白血病细胞系K562,在转导后第4天,利用CD7-His蛋白进行流式检测,统计阳性细胞的平均MFI值。根据各VHH与CD7亲和力的不同,阳性细胞平均MFI值会有差异,MFI值越高代表所对应的纳米抗体对抗原CD7的亲和力越高,共进行三次平行实验。

[0265] 2、专属性检测

[0266] (1) 将测序获得的不同克隆株的VHH片段克隆到原核表达载体PET-28a-SUMO中;(2) 测序正确后提取质粒,然后转化至大肠杆菌菌株BL21中,并在IPTG诱导下进行蛋白表达(3) 超声裂解菌体获得粗提蛋白;(4) 经过镍柱离子亲和层析纯化纳米抗体;(5) 以纯化后纳米抗体为一抗,以HIS-FITC抗体为二抗通过流式细胞术检测18个纳米抗体与K562和K562-CD7细胞系的结合情况。

[0267] 3、实验结果

[0268] 纳米抗体亲和力的检测结果见图15,结果显示,17个单VHH结构均与CD7-His发生了特异性结合,其中VHH03、VHH06、VHH10、VHH12的亲和力较强,表明了本发明实施例4中经筛选鉴定得到的18种单VHH与CD7均具有较好的亲和力;

[0269] 纳米抗体专属性的检测结果见图16,结果显示,17个VHH均能与CD7发生特异性结合,表明了本发明实施例4中经筛选鉴定得到的17种单VHH具有较好的专属性。

[0270] 实施例7人源化纳米抗体(hVHH06)的构建

[0271] 1、实验方法

[0272] (1) 以文献报道的通用人源化框架h-NbBcII10FGLA为参考(详见文献:Vincke,C., et al.,General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold.J Biol Chem, 2009.284(5):p.3273-3284),并通过与DP-47进行比对,对VHH06关键位置的残基进行了人

源化改造,改造后纳米抗体命名为hVHH06,三种结构(人源化序列与DP-47、模板h-NbBcII10PGLA及原始序列)的序列对比如图19所示,所述hVHH06的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:143所示,CDR1、CDR2、CDR3的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:144所示,所述hVHH06的氨基酸序列如SEQ ID NO:137所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:138所示;(2)将hVHH06和VHH06按照前述方法同时进行慢病毒包装,并制备得到CAR-T细胞;(3)在CAR-T培养的第6天进行流式细胞术检测;(4)在CAR-T培养的第10天,以MOLM-13-Luci-GFP(MOLM-13细胞系为人急性髓系白血病细胞系)为靶细胞,按照前述方法,设定效靶比为E:T=5:1、10:1、20:1进行杀伤实验。

[0273] 2、实验结果

[0274] 流式细胞术检测的结果见图17,结果显示,VHH06和hVHH06的转导率分别为12.4%、21%,CD7阳性率分别为0.249%、0.157%;杀伤实验的结果见图18,结果显示,E:T=5:1、10:1、20:1时,空白T细胞对MOLM-13-Luci-GFP细胞的杀伤均值分别为27.40%、28.00%、26.80%;VHH06对MOLM-13-Luci-GFP细胞的杀伤均值分别为69.90%、79.80%、79.70%,hVHH06对MOLM-13-Luci-GFP细胞的杀伤均值分别为70.80%、81.20%、89.60%,由以上结果可知,人源化对抗体的性状未产生影响,表明了本实施例成功对VHH06进行了人源化改造。

[0275] 实施例8双VHH CAR-T细胞的制备

[0276] 1、双VHH CAR结构构建

[0277] (1)将实施例6中筛选到的功能较好的VHH(VHH03、VHH06、VHH10、VHH12)用于构建双VHH的CAR结构目的质粒,结构示意图如图20所示。首先,利用PCR的方法扩增阳性克隆株的VHH序列,第一轮PCR引物为:

[0278] dNCAR-F1:5'-CAGGTGCAGCTGCAGGAG-3'

[0279] dNCAR-R1:5'-TGAGGAGACGGTGACCTGG-3'

[0280] 第一轮PCR结束后,以第一轮PCR产物为模板进行第二轮PCR,第二轮PCR引物为:

[0281] dNCAR-F2:5'-CCAGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGCGGCAGTGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGGAG-3'

[0282] dNCAR-R2:5'-TAGGAGCCGGGGTGGGCGGCCGCGGTGCTGGGGTAGTTGAGGAGACGGTGACCTGG-3'

[0283] 然后,将第二轮PCR产物通过同源重组的方式,连接入载体VHH-XX(XX代表靶向CD7单VHH的CAR结构的序号)中,载体用Not I单酶切。其中,以VHH-06为载体,分别与VHH03、VHH12一起构建的双VHH结构分别命名为dVHH-B、dVHH-C。以VHH-10为载体,分别与VHH12、VHH10一起构建的双VHH结构分别命名为dVHH-D、dVHH-E。由VHH12为载体,与VHH12一起构建的双VHH结构命名为dVHH-F。

[0284] 2、双VHH CAR-T细胞的制备

[0285] 双VHH CAR-T细胞的制备流程与实施例5中单VHH CAR-T细胞的制备流程一致,慢病毒包装过程如图10所示,培养流程如图11所示。将5个双VHH结构和转导T细胞制备得到的CAR-T细胞、VHH10 CAR-T细胞、VHH12 CAR-T细胞培养6天后进行流式细胞术检测。

[0286] 3、实验结果

[0287] 本实施例共构建5个双VHH结构,分别命名为dVHH-B至dVHH-F (VHH-06+VHH-03、VHH-06+VHH-12、VHH-10+VHH-12、VHH-10+VHH-10、VHH-12+VHH-12),结构如图20所示,EF1 α 为延长因子1 α 的启动子,leader是信号肽的编码序列,VHH是抗CD7纳米抗体的编码序列,CD8H+TM为CD8铰链区和跨膜区,4-1BB和CD3 ζ 胞内信号区为胞内共刺激域,通过T2A肽连接表达tEGFR胞外区域,以便病毒转导后检测CAR的表达;

[0288] CAR+细胞的比例及CD7 MFI值对应的结果图分别见图21和图22,结果显示,,dVHH-B至dVHH-F的CAR阳性率分别为:22.59%、53.6%、68.68%、55.34%,VHH10的阳性率为72.2%,VHH12的阳性率为86.7%;空白T细胞CD7阳性细胞平均MFI值为10109,dVHH-B至dVHH-F的CAR-T细胞CD7阳性细胞平均MFI值分别为:708、797、648、577、1057,VHH10的CAR-T细胞CD7阳性细胞平均MFI值为2302,VHH12的CAR-T细胞CD7阳性细胞平均MFI值为1238。

[0289] 实施例9双VHH CAR-T细胞(dVHH-D)的培养及体外功能实验验证

[0290] 1、dVHH-D双VHH CAR-T细胞的制备

[0291] 用实施例8中所述的CAR-T细胞的制备方法对dVHH-D、VHH10、VHH12结构进行体外培养,并对培养过程中的细胞扩增倍数进行统计。

[0292] 2、dVHH-D双VHH CAR-T细胞的体外功能实验验证

[0293] 为比较dVHH-D与单VHH CAR-T的体外功能,dVHH-D、VHH10、VHH12 CAR-T细胞培养的第12天,CAR-T细胞以及空白T细胞分别与CD7表达阳性细胞系CCRF-CEM(白血病T淋巴细胞)按照E:T=2:1的比例进行细胞杀伤实验:首先收集靶细胞,2000rpm离心5min,DPBS重悬计数,进行CFSE染色,并按照1E5/孔的数量添加到96孔板中。然后根据不同效靶比(E:T=0.5:1、1:1、2:1)向靶细胞中添加适量的效应细胞,混合后孵育4小时,流式细胞术检测细胞杀伤比例。

[0294] 3、实验结果

[0295] dVHH-D扩增曲线见图23,结果显示,扩增到第14天,dVHH-D的平均扩增倍数为46.35,VHH-12的平均扩增倍数为26.3,VHH-10的平均扩增倍数为22.75,可见dVHH-D的扩增倍数要显著优于单VHH CAR-T;

[0296] dVHH-D体外功能验证的结果见图24,结果显示,在杀伤比例为0.5:1、1:1、2:1时,dVHH-D对CCRF-CEM的杀伤均值分别为86.925%、92.115%、94.465%,VHH10对CCRF-CEM的杀伤均值分别为45.55%、69.95%、85.85%,VHH12对CCRF-CEM的杀伤均值分别为58.65%、80.9%、82.95%,可见dVHH-D对CCRF-CEM具有较高的杀伤力。

[0297] 实施例10双VHH CAR-T细胞(dVHH-E)的培养及体外功能实验验证

[0298] 1、dVHH-E双VHH CAR-T细胞的制备

[0299] 用实施例8中所述的CAR-T细胞的制备方法对dVHH-E、VHH10、VHH12结构进行体外培养,并对培养过程中的细胞扩增倍数进行统计。

[0300] 2、dVHH-E双VHH CAR-T细胞的体外功能实验验证

[0301] 用实施例9中描述的方法进行dVHH-E双VHH CAR-T体外功能实验验证。

[0302] 3、实验结果

[0303] dVHH-E扩增曲线见图25,结果显示,扩增到第13天,dVHH-E的平均扩增倍数为45.875,VHH-12的平均扩增倍数为19.775,VHH-10的平均扩增倍数为21.36,可见dVHH-E的扩增倍数要显著优于单VHH CAR-T;

[0304] dVHH-E体外功能验证的结果见图26,结果显示,在杀伤比例为0.5:1、1:1、2:1时,dVHH-E对CCRF-CEM的杀伤均值分别为58.15%、84.385%、91.775%,VHH10对CCRF-CEM的杀伤均值分别为45.55%、69.95%、85.85%,VHH12对CCRF-CEM的杀伤均值分别为58.65%、80.9%、82.95%,可见dVHH-E表现出对CCRF-CEM相对较高的杀伤力。

[0305] 实施例11 SPR方法测定抗体(dVHH-D、dVHH-E、VHH10、VHH12)亲和力

[0306] 1、实验方法

[0307] 本实施例中采用SPR方法(表面等离子共振法)测定抗体的亲和力,通过氨基偶联法在CM5芯片上固定实施例1中经制备得到的CD7-His蛋白,以抗体(dVHH-D、dVHH-E、VHH10、VHH12)作为分析物进行实验,检测各个抗体与CD7抗原之间的亲和力。

[0308] 2、实验结果

[0309] 结果显示,dVHH-D与CD7-His蛋白之间的亲和力常数为 $3.35E-09M$,dVHH-E与CD7-His蛋白之间的亲和力常数为 $4.51E-09M$,VHH10与CD7-His蛋白之间的亲和力常数为 $9.99E-08M$,VHH12与CD7-His蛋白之间的亲和力常数为 $1.34E-09M$ (见表2),上述结果进一步表明了dVHH-D、dVHH-E、VHH10、VHH12均能与CD7抗原发生特异性的结合,且具有较强的亲和力。

[0310] 表2 SPR方法测定抗体亲和力的结果统计

配体	分析物	结合速率常数 ka (1/Ms)	解离速率数 kd (1/s)	亲和力 KD (M)	Chi ² (RU ²)	U-value
[0311] CD7-His 蛋白	dVHH-D	2.25E+05	7.54E-04	3.35E-09	0.0644	2
	dVHH-E	1.23E+05	5.57E-04	4.51E-09	0.0747	2
	VHH10	1.64E+05	0.01643	9.99E-08	0.5200	12
	VHH12	7.42E+04	9.95E-05	1.34E-09	0.0480	15

[0312] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 河北森朗生物科技有限公司
- [0003] <120> 抗CD7纳米抗体、衍生物及其在肿瘤治疗中的应用
- [0004] <141> 2022-03-30
- [0005] <160> 161
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 124
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0013] 1 5 10 15
- [0014] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Thr Leu Gly Tyr Tyr
- [0015] 20 25 30
- [0016] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gly Glu Arg Glu Gly Val
- [0017] 35 40 45
- [0018] Ser Cys Ile Ser Ala Gly Gly Thr Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
- [0019] 50 55 60
- [0020] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Val Tyr
- [0021] 65 70 75 80
- [0022] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Thr Cys
- [0023] 85 90 95
- [0024] Ala Leu Arg Ser Val Arg Ser Cys Ser Leu Ala Gln Ala Ala Phe Asp
- [0025] 100 105 110
- [0026] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
- [0027] 115 120
- [0028] <210> 2
- [0029] <211> 372
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0032] <400> 2
- [0033] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
- [0034] tctgtacag cctctggatt gactctgggt tattatgcca taggctggtt ccgccaggcc 120
- [0035] ccaggggggg agcgtgaggg ggtctcatgt ataagtgctg gtggtactag cacactctat 180
- [0036] gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca actccaagag cacggtgtat 240
- [0037] ctgcaaatga acagcctgaa acctgaagac acagcccttt acacgtgtgc actacgttca 300
- [0038] gtacgttcgt gctcgtctagc acaggtcgcg ttcgactact ggggccaggg aaccagggtc 360
- [0039] accgtctcct ca 372
- [0040] <210> 3
- [0041] <211> 8

- [0042] <212> PRT
- [0043] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0044] <400> 3
- [0045] Gly Leu Thr Leu Gly Tyr Tyr Ala
- [0046] 1 5
- [0047] <210> 4
- [0048] <211> 24
- [0049] <212> DNA
- [0050] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0051] <400> 4
- [0052] ggattgactc tgggttatta tgcc 24
- [0053] <210> 5
- [0054] <211> 8
- [0055] <212> PRT
- [0056] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0057] <400> 5
- [0058] Ile Ser Ala Gly Gly Thr Ser Thr
- [0059] 1 5
- [0060] <210> 6
- [0061] <211> 24
- [0062] <212> DNA
- [0063] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0064] <400> 6
- [0065] ataagtgctg gtggtagtag caca 24
- [0066] <210> 7
- [0067] <211> 17
- [0068] <212> PRT
- [0069] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0070] <400> 7
- [0071] Ala Leu Arg Ser Val Arg Ser Cys Ser Leu Ala Gln Ala Ala Phe Asp
- [0072] 1 5 10 15
- [0073] Tyr
- [0074] <210> 8
- [0075] <211> 51
- [0076] <212> DNA
- [0077] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0078] <400> 8
- [0079] gcactacggtt cagtacgttc gtgctcgcta gcacagctg cgttcgacta c 51
- [0080] <210> 9
- [0081] <211> 125
- [0082] <212> PRT
- [0083] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0084] <400> 9
 [0085] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0086] 1 5 10 15
 [0087] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Val Phe Ser Ser Asp
 [0088] 20 25 30
 [0089] Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val
 [0090] 35 40 45
 [0091] Ala Ala Ile Ile Trp Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 [0092] 50 55 60
 [0093] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr
 [0094] 65 70 75 80
 [0095] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0096] 85 90 95
 [0097] Ala Val Asp Thr Arg Pro Pro Tyr Gly Leu Arg Asn Ala Asn Arg Tyr
 [0098] 100 105 110
 [0099] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0100] 115 120 125
 [0101] <210> 10
 [0102] <211> 375
 [0103] <212> DNA
 [0104] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0105] <400> 10
 [0106] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga tcggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
 [0107] tcctgtgcag cctctggacg cgtcttcagt agcgatgcca tgggctggtt ccgccagget 120
 [0108] ccagggaaac agcgtgagtt tgtagcagct attatctgga gtggtagtag cacacactat 180
 [0109] gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggggtat 240
 [0110] ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agtagacact 300
 [0111] cgccctccat acggattgag gaacgcaaac cggtatgact actggggcca ggggaccag 360
 [0112] gtcaccgtct cctca 375
 [0113] <210> 11
 [0114] <211> 8
 [0115] <212> PRT
 [0116] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0117] <400> 11
 [0118] Gly Arg Val Phe Ser Ser Asp Ala
 [0119] 1 5
 [0120] <210> 12
 [0121] <211> 24
 [0122] <212> DNA
 [0123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0124] <400> 12
 [0125] ggacgcgtct tcagtagcga tgcc 24

[0126]	<210> 13
[0127]	<211> 8
[0128]	<212> PRT
[0129]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0130]	<400> 13
[0131]	Ile Ile Trp Ser Gly Ser Ser Thr
[0132]	1 5
[0133]	<210> 14
[0134]	<211> 24
[0135]	<212> DNA
[0136]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0137]	<400> 14
[0138]	attatctgga gtggtagtag caca 24
[0139]	<210> 15
[0140]	<211> 18
[0141]	<212> PRT
[0142]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0143]	<400> 15
[0144]	Ala Val Asp Thr Arg Pro Pro Tyr Gly Leu Arg Asn Ala Asn Arg Tyr
[0145]	1 5 10 15
[0146]	Asp Tyr
[0147]	<210> 16
[0148]	<211> 54
[0149]	<212> DNA
[0150]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0151]	<400> 16
[0152]	gcagtagaca ctcgccctcc atacggattg aggaacgcaa accggtatga ctac 54
[0153]	<210> 17
[0154]	<211> 114
[0155]	<212> PRT
[0156]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0157]	<400> 17
[0158]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0159]	1 5 10 15
[0160]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Asp Ser Arg Ser Val Phe Arg Ala Ile
[0161]	20 25 30
[0162]	Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0163]	35 40 45
[0164]	Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys
[0165]	50 55 60
[0166]	Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
[0167]	65 70 75 80

[0168] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 [0169] 85 90 95
 [0170] Arg Glu Pro Pro Asp Tyr Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 [0171] 100 105 110
 [0172] Ser Ser
 [0173] <210> 18
 [0174] <211> 342
 [0175] <212> DNA
 [0176] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0177] <400> 18
 [0178] cagggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 [0179] tctgtgtag actctagaag cgtcttcaga gccattgcca tgggctggta ccgccagget 120
 [0180] ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcacgt attagtagtg gtgaaacac aaactatgca 180
 [0181] gacttcgtga agggccgatt caccatcacc agagacaacg ccaagaacac gctgtatctg 240
 [0182] caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgcaatcg agaacccect 300
 [0183] gactacgtat ggggccaggg gaccaggtc accgtctcct ca 342
 [0184] <210> 19
 [0185] <211> 8
 [0186] <212> PRT
 [0187] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0188] <400> 19
 [0189] Arg Ser Val Phe Arg Ala Ile Ala
 [0190] 1 5
 [0191] <210> 20
 [0192] <211> 24
 [0193] <212> DNA
 [0194] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0195] <400> 20
 [0196] agaagcgtct tcagagccat tgcc 24
 [0197] <210> 21
 [0198] <211> 7
 [0199] <212> PRT
 [0200] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0201] <400> 21
 [0202] Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr
 [0203] 1 5
 [0204] <210> 22
 [0205] <211> 21
 [0206] <212> DNA
 [0207] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0208] <400> 22
 [0209] attagtagtg gtgaaacac a 21

- [0210] <210> 23
- [0211] <211> 8
- [0212] <212> PRT
- [0213] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0214] <400> 23
- [0215] Asn Arg Glu Pro Pro Asp Tyr Val
- [0216] 1 5
- [0217] <210> 24
- [0218] <211> 24
- [0219] <212> DNA
- [0220] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0221] <400> 24
- [0222] aatcgagaac ccctgacta cgta 24
- [0223] <210> 25
- [0224] <211> 124
- [0225] <212> PRT
- [0226] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0227] <400> 25
- [0228] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
- [0229] 1 5 10 15
- [0230] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
- [0231] 20 25 30
- [0232] Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Ala Glu Arg Glu Phe Val
- [0233] 35 40 45
- [0234] Ala Ala Ile Ser Arg Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
- [0235] 50 55 60
- [0236] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
- [0237] 65 70 75 80
- [0238] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0239] 85 90 95
- [0240] Ala Asp Ser Gly Ala Arg Ala Tyr Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Phe Gly
- [0241] 100 105 110
- [0242] Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
- [0243] 115 120
- [0244] <210> 26
- [0245] <211> 372
- [0246] <212> DNA
- [0247] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0248] <400> 26
- [0249] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
- [0250] tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt agctataaca tgggctggtt ccgccaggct 120
- [0251] ccaggggctg agcgcgagtt tgtagcagct attagccggg gtggtggtag tacatactat 180

[0252] gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
 [0253] ctgcaaatga acagcctgcg acctgaggac acggccgttt attactgtgc agactcagga 300
 [0254] gctcgagcct atagtggtag ttacctcgac tttggttcct ggggccaggg gaccaggtc 360
 [0255] accgtctcct ca 372
 [0256] <210> 27
 [0257] <211> 8
 [0258] <212> PRT
 [0259] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0260] <400> 27
 [0261] Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Asn
 [0262] 1 5
 [0263] <210> 28
 [0264] <211> 24
 [0265] <212> DNA
 [0266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0267] <400> 28
 [0268] ggacgcacct tcagtagcta taac 24
 [0269] <210> 29
 [0270] <211> 8
 [0271] <212> PRT
 [0272] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0273] <400> 29
 [0274] Ile Ser Arg Gly Gly Gly Ser Thr
 [0275] 1 5
 [0276] <210> 30
 [0277] <211> 24
 [0278] <212> DNA
 [0279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0280] <400> 30
 [0281] attagccggg gtggtgtag taca 24
 [0282] <210> 31
 [0283] <211> 17
 [0284] <212> PRT
 [0285] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0286] <400> 31
 [0287] Ala Asp Ser Gly Ala Arg Ala Tyr Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Phe Gly
 [0288] 1 5 10 15
 [0289] Ser
 [0290] <210> 32
 [0291] <211> 51
 [0292] <212> DNA
 [0293] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0294] <400> 32
- [0295] gcagactcag gagctcgagc ctatagtggg agttacctcg actttgggtc c 51
- [0296] <210> 33
- [0297] <211> 124
- [0298] <212> PRT
- [0299] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0300] <400> 33
- [0301] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
- [0302] 1 5 10 15
- [0303] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
- [0304] 20 25 30
- [0305] Val Met Lys Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
- [0306] 35 40 45
- [0307] Ala Gly Ile Ser Trp Ser Gly Ser Leu Thr Ser Tyr Ser Asp Ser Val
- [0308] 50 55 60
- [0309] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
- [0310] 65 70 75 80
- [0311] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0312] 85 90 95
- [0313] Ala Ala Gly Glu Ala Ala Thr Met Ser Asp Thr Asp Tyr Gly Met Asp
- [0314] 100 105 110
- [0315] Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
- [0316] 115 120
- [0317] <210> 34
- [0318] <211> 372
- [0319] <212> DNA
- [0320] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0321] <400> 34
- [0322] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
- [0323] tcctgtgcag cctctggagc caccttcagt agttatgtca tgaaatggtt tcgccagget 120
- [0324] ccaggaaagg ggcgagaatt tgtagctggt attagttgga gtggtagtct tacaagctat 180
- [0325] tcagactccg tgaaggccg attcactatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
- [0326] ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc ggccggagaa 300
- [0327] gccgcgacta tgtctgatac cgactacggc atggactact ggggcaaagg gaccaggtc 360
- [0328] accgtctcct ca 372
- [0329] <210> 35
- [0330] <211> 8
- [0331] <212> PRT
- [0332] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0333] <400> 35
- [0334] Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val
- [0335] 1 5

- [0336] <210> 36
- [0337] <211> 24
- [0338] <212> DNA
- [0339] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0340] <400> 36
- [0341] ggacgcacct tcagtagtta tgtc 24
- [0342] <210> 37
- [0343] <211> 8
- [0344] <212> PRT
- [0345] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0346] <400> 37
- [0347] Ile Ser Trp Ser Gly Ser Leu Thr
- [0348] 1 5
- [0349] <210> 38
- [0350] <211> 24
- [0351] <212> DNA
- [0352] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0353] <400> 38
- [0354] attagttgga gtgtagtct taca 24
- [0355] <210> 39
- [0356] <211> 17
- [0357] <212> PRT
- [0358] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0359] <400> 39
- [0360] Ala Ala Gly Glu Ala Ala Thr Met Ser Asp Thr Asp Tyr Gly Met Asp
- [0361] 1 5 10 15
- [0362] Tyr
- [0363] <210> 40
- [0364] <211> 51
- [0365] <212> DNA
- [0366] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0367] <400> 40
- [0368] gcggccggag aagccgcgac tatgtctgat accgactacg gcatggacta c 51
- [0369] <210> 41
- [0370] <211> 117
- [0371] <212> PRT
- [0372] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0373] <400> 41
- [0374] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0375] 1 5 10 15
- [0376] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile His
- [0377] 20 25 30

[0378] Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 [0379] 35 40 45
 [0380] Ala Ser Ile Thr Val Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Leu
 [0381] 50 55 60
 [0382] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 [0383] 65 70 75 80
 [0384] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 [0385] 85 90 95
 [0386] Ser Leu Leu Trp Ala Gly Leu Arg Asp Ser Trp Gly Pro Gly Thr Gln
 [0387] 100 105 110
 [0388] Val Thr Val Ser Ser
 [0389] 115
 [0390] <210> 42
 [0391] <211> 351
 [0392] <212> DNA
 [0393] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0394] <400> 42
 [0395] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc cctgagactc 60
 [0396] tcctgtgcag cctctggaag catcttcagt atccatgcta tggcctggta ccggcaggct 120
 [0397] cctgggaagc agcgagaatt ggtcgcattc attacagtag gtggtaggac aaactatgta 180
 [0398] gactccgtgc tgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
 [0399] caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaactc actcttatgg 300
 [0400] gccgggctga gggattcctg ggttccgggg acccagggtca ccgtctctc a 351
 [0401] <210> 43
 [0402] <211> 8
 [0403] <212> PRT
 [0404] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0405] <400> 43
 [0406] Gly Ser Ile Phe Ser Ile His Ala
 [0407] 1 5
 [0408] <210> 44
 [0409] <211> 24
 [0410] <212> DNA
 [0411] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0412] <400> 44
 [0413] ggaagcatct tcagtatcca tgct 24
 [0414] <210> 45
 [0415] <211> 7
 [0416] <212> PRT
 [0417] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0418] <400> 45
 [0419] Ile Thr Val Gly Gly Arg Thr

[0420] 1 5
 [0421] <210> 46
 [0422] <211> 21
 [0423] <212> DNA
 [0424] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0425] <400> 46
 [0426] attacagtag gtgtaggac a 21
 [0427] <210> 47
 [0428] <211> 11
 [0429] <212> PRT
 [0430] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0431] <400> 47
 [0432] Asn Ser Leu Leu Trp Ala Gly Leu Arg Asp Ser
 [0433] 1 5 10
 [0434] <210> 48
 [0435] <211> 33
 [0436] <212> DNA
 [0437] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0438] <400> 48
 [0439] aactcactct tatgggccgg gctgagggat tcc 33
 [0440] <210> 49
 [0441] <211> 117
 [0442] <212> PRT
 [0443] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0444] <400> 49
 [0445] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0446] 1 5 10 15
 [0447] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Lys Phe Ser Ile Ser
 [0448] 20 25 30
 [0449] Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 [0450] 35 40 45
 [0451] Ala Ser Ile Thr Pro Gly Gly Asn Thr Ala Tyr Ala Glu Ala Val Lys
 [0452] 50 55 60
 [0453] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 [0454] 65 70 75 80
 [0455] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 [0456] 85 90 95
 [0457] Asp Phe Arg Leu Ala Gly Leu Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 [0458] 100 105 110
 [0459] Val Thr Val Ser Ser
 [0460] 115
 [0461] <210> 50

- [0462] <211> 351
- [0463] <212> DNA
- [0464] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0465] <400> 50
- [0466] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
- [0467] tcttgtgtag cctctggaag caagttcagt atcagtacca tgggctggta ccgccagget 120
- [0468] ccaggaagc agcgcgattt ggtcgcatct attacgctg gtggtaacac agcctatgca 180
- [0469] gaagccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
- [0470] caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaatga cttccgteta 300
- [0471] gctggtctga gggactactg gggccagggg acccaggtca ccgtctcctc a 351
- [0472] <210> 51
- [0473] <211> 8
- [0474] <212> PRT
- [0475] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0476] <400> 51
- [0477] Gly Ser Lys Phe Ser Ile Ser Thr
- [0478] 1 5
- [0479] <210> 52
- [0480] <211> 24
- [0481] <212> DNA
- [0482] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0483] <400> 52
- [0484] ggaagcaagt tcagtatcag tacc 24
- [0485] <210> 53
- [0486] <211> 7
- [0487] <212> PRT
- [0488] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0489] <400> 53
- [0490] Ile Thr Pro Gly Gly Asn Thr
- [0491] 1 5
- [0492] <210> 54
- [0493] <211> 21
- [0494] <212> DNA
- [0495] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0496] <400> 54
- [0497] attacgctg gtggtaacac a 21
- [0498] <210> 55
- [0499] <211> 11
- [0500] <212> PRT
- [0501] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0502] <400> 55
- [0503] Asn Asp Phe Arg Leu Ala Gly Leu Arg Asp Tyr

[0504] 1 5 10
 [0505] <210> 56
 [0506] <211> 33
 [0507] <212> DNA
 [0508] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0509] <400> 56
 [0510] aatgacttcc gtctagctgg tctgaggac tac 33
 [0511] <210> 57
 [0512] <211> 124
 [0513] <212> PRT
 [0514] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0515] <400> 57
 [0516] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly
 [0517] 1 5 10 15
 [0518] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Ser Asn
 [0519] 20 25 30
 [0520] Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [0521] 35 40 45
 [0522] Ala Ala Ile Thr Trp Ser Val Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0523] 50 55 60
 [0524] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0525] 65 70 75 80
 [0526] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0527] 85 90 95
 [0528] Ala Ala Ser Gly Ala Arg His Tyr Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Phe Gly
 [0529] 100 105 110
 [0530] Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0531] 115 120
 [0532] <210> 58
 [0533] <211> 372
 [0534] <212> DNA
 [0535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0536] <400> 58
 [0537] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagc ttggtgcaaa ctgggggttc tctgagactc 60
 [0538] tcctgtgaag cctctgaacg caccttcagt agcaatgccg tgggctggtt ccgccaggct 120
 [0539] ccaggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attacctgga gtgttggtac cacatactat 180
 [0540] gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
 [0541] ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agcctcagga 300
 [0542] gctcgacact atagtggtag ttacctcgac tttggttctct ggggccaggg gaccagtc 360
 [0543] accgtctcct ca 372
 [0544] <210> 59
 [0545] <211> 8

- [0546] <212> PRT
[0547] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0548] <400> 59
[0549] Glu Arg Thr Phe Ser Ser Asn Ala
[0550] 1 5
[0551] <210> 60
[0552] <211> 24
[0553] <212> DNA
[0554] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0555] <400> 60
[0556] gaacgcacct tcagtagcaa tgcc 24
[0557] <210> 61
[0558] <211> 8
[0559] <212> PRT
[0560] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0561] <400> 61
[0562] Ile Thr Trp Ser Val Gly Thr Thr
[0563] 1 5
[0564] <210> 62
[0565] <211> 24
[0566] <212> DNA
[0567] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0568] <400> 62
[0569] attacctgga gtgttgttac caca 24
[0570] <210> 63
[0571] <211> 17
[0572] <212> PRT
[0573] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0574] <400> 63
[0575] Ala Ala Ser Gly Ala Arg His Tyr Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Phe Gly
[0576] 1 5 10 15
[0577] Ser
[0578] <210> 64
[0579] <211> 51
[0580] <212> DNA
[0581] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0582] <400> 64
[0583] gcagcctcag gagctcgaca ctatagtggg agttacctcg actttggttc c 51
[0584] <210> 65
[0585] <211> 129
[0586] <212> PRT
[0587] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0588] <400> 65
 [0589] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0590] 1 5 10 15
 [0591] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Leu Asp Tyr Tyr
 [0592] 20 25 30
 [0593] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile
 [0594] 35 40 45
 [0595] Ser Cys Ile Ser Asn Ser Gly Gly Met Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 [0596] 50 55 60
 [0597] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0598] 65 70 75 80
 [0599] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0600] 85 90 95
 [0601] Ala Ala Gly Pro Ala Trp Ser Tyr Cys Ser Gly Tyr Val Pro Ala Gly
 [0602] 100 105 110
 [0603] Leu Asp Lys Phe Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0604] 115 120 125
 [0605] Ser
 [0606] <210> 66
 [0607] <211> 387
 [0608] <212> DNA
 [0609] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0610] <400> 66
 [0611] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 [0612] tctgtgcag cctctggatc cactttggat tattatgccca taggctggtt ccgccagccc 120
 [0613] ccaggaagg agcgtgaggg catctcatgt attagtaata gtggtggtat gacaaactat 180
 [0614] gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
 [0615] ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acagccgttt attactgtgc agcaggcccc 300
 [0616] gcgtggtcct actgttcagg ctatgtgccg gccggcctag ataaatttgg ttcttggggc 360
 [0617] caggggaccc aggtcacctg ctctca 387
 [0618] <210> 67
 [0619] <211> 8
 [0620] <212> PRT
 [0621] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0622] <400> 67
 [0623] Gly Ser Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala
 [0624] 1 5
 [0625] <210> 68
 [0626] <211> 24
 [0627] <212> DNA
 [0628] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0629] <400> 68

[0630] ggatccactt tggattatta tgcc 24
 [0631] <210> 69
 [0632] <211> 8
 [0633] <212> PRT
 [0634] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0635] <400> 69
 [0636] Ile Ser Asn Ser Gly Gly Met Thr
 [0637] 1 5
 [0638] <210> 70
 [0639] <211> 24
 [0640] <212> DNA
 [0641] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0642] <400> 70
 [0643] attagtaata gtggtggtat gaca 24
 [0644] <210> 71
 [0645] <211> 22
 [0646] <212> PRT
 [0647] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0648] <400> 71
 [0649] Ala Ala Gly Pro Ala Trp Ser Tyr Cys Ser Gly Tyr Val Pro Ala Gly
 [0650] 1 5 10 15
 [0651] Leu Asp Lys Phe Gly Ser
 [0652] 20
 [0653] <210> 72
 [0654] <211> 66
 [0655] <212> DNA
 [0656] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0657] <400> 72
 [0658] gcagcaggcc cggcgtggtc ctactgttca ggctatgtgc cggccggcct agataaattt 60
 [0659] ggttct 66
 [0660] <210> 73
 [0661] <211> 125
 [0662] <212> PRT
 [0663] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0664] <400> 73
 [0665] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0666] 1 5 10 15
 [0667] Ser Leu Asn Leu Ser Cys Thr Val Tyr Gly Phe Thr Ala Asp Asp Tyr
 [0668] 20 25 30
 [0669] Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Gln Gly Ile
 [0670] 35 40 45
 [0671] Ser Cys Leu Ser Arg Lys Asp Gly Ser Lys Tyr Val Ala Asp Pro Val

[0672]	50	55	60
[0673]	Leu Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ser Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Arg		
[0674]	65	70	75 80
[0675]	Leu Thr Leu Ser Ala Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0676]		85	90 95
[0677]	Ala Ala His Arg Phe Ala Thr Phe Cys Gly Thr Arg Asp Tyr Glu Tyr		
[0678]		100	105 110
[0679]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
[0680]		115	120 125
[0681]	<210> 74		
[0682]	<211> 375		
[0683]	<212> DNA		
[0684]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0685]	<400> 74		
[0686]	cagggtcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagg ctgggggctc tctgaacctc	60	
[0687]	tctgtacag tctatgggtt cactgccgat gactatgccg taggctggtt ccgccagcc	120	
[0688]	ccaggaagg gacgacaagg gatctcatgt cttagccgta aggatggcag caagtacgtg	180	
[0689]	gctgatcccg tgctgggccc agccaccatc tccagtgaca acaccaagaa cactgtgcgt	240	
[0690]	ctgaccctga gcgcattgaa acctgacgat acggccgtct attactgtgc agctcataga	300	
[0691]	tttgcacat tctgtggcac ccgtgattat gagtatgact attggggcca gggaaccag	360	
[0692]	gtcacctct cctca	375	
[0693]	<210> 75		
[0694]	<211> 8		
[0695]	<212> PRT		
[0696]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0697]	<400> 75		
[0698]	Gly Phe Thr Ala Asp Asp Tyr Ala		
[0699]	1	5	
[0700]	<210> 76		
[0701]	<211> 24		
[0702]	<212> DNA		
[0703]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0704]	<400> 76		
[0705]	gggttcactg ccgatgacta tgcc	24	
[0706]	<210> 77		
[0707]	<211> 8		
[0708]	<212> PRT		
[0709]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0710]	<400> 77		
[0711]	Leu Ser Arg Lys Asp Gly Ser Lys		
[0712]	1	5	
[0713]	<210> 78		

[0714] <211> 24
 [0715] <212> DNA
 [0716] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0717] <400> 78
 [0718] cttagccgta aggatggcag caag 24
 [0719] <210> 79
 [0720] <211> 18
 [0721] <212> PRT
 [0722] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0723] <400> 79
 [0724] Ala Ala His Arg Phe Ala Thr Phe Cys Gly Thr Arg Asp Tyr Glu Tyr
 [0725] 1 5 10 15
 [0726] Asp Tyr
 [0727] <210> 80
 [0728] <211> 54
 [0729] <212> DNA
 [0730] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0731] <400> 80
 [0732] gcagctcata gatttgcgac attctgtggc acccgtgatt atgagtatga ctat 54
 [0733] <210> 81
 [0734] <211> 122
 [0735] <212> PRT
 [0736] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0737] <400> 81
 [0738] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0739] 1 5 10 15
 [0740] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Thr Leu Gly Tyr Tyr
 [0741] 20 25 30
 [0742] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [0743] 35 40 45
 [0744] Ser Thr Ile Ser Ala Ser Gly Gly Met Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0745] 50 55 60
 [0746] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0747] 65 70 75 80
 [0748] Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0749] 85 90 95
 [0750] Ala Ala Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Arg His Phe Arg Gly Asp His Trp
 [0751] 100 105 110
 [0752] Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0753] 115 120
 [0754] <210> 82
 [0755] <211> 366

- [0756] <212> DNA
- [0757] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0758] <400> 82
- [0759] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
- [0760] tcctgtacag cctctggatt gactctgggt tattatgcca taggctgggt ccgccaggct 120
- [0761] ccaggaag agcgtgagtt tgtgtcgact attagcgcga gtggtggtat gacatactat 180
- [0762] gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
- [0763] ctggaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agcagagtat 300
- [0764] ctaggaatc tacggcactt taggggggac cactggggca aagggacca ggtcaccgtc 360
- [0765] tcctca 366
- [0766] <210> 83
- [0767] <211> 8
- [0768] <212> PRT
- [0769] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0770] <400> 83
- [0771] Gly Leu Thr Leu Gly Tyr Tyr Ala
- [0772] 1 5
- [0773] <210> 84
- [0774] <211> 24
- [0775] <212> DNA
- [0776] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0777] <400> 84
- [0778] ggattgactc tgggttatta tgcc 24
- [0779] <210> 85
- [0780] <211> 8
- [0781] <212> PRT
- [0782] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0783] <400> 85
- [0784] Ile Ser Ala Ser Gly Gly Met Thr
- [0785] 1 5
- [0786] <210> 86
- [0787] <211> 24
- [0788] <212> DNA
- [0789] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0790] <400> 86
- [0791] attagcgcga gtggtggtat gaca 24
- [0792] <210> 87
- [0793] <211> 15
- [0794] <212> PRT
- [0795] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0796] <400> 87
- [0797] Ala Ala Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Arg His Phe Arg Gly Asp His

[0798]	1	5	10	15
[0799]	<210> 88			
[0800]	<211> 45			
[0801]	<212> DNA			
[0802]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0803]	<400> 88			
[0804]	gcagcagagt atctagggaa tctacggcac tttagggggg accac 45			
[0805]	<210> 89			
[0806]	<211> 125			
[0807]	<212> PRT			
[0808]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0809]	<400> 89			
[0810]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0811]	1	5	10	15
[0812]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Val Phe Ser Ser Asp			
[0813]		20	25	30
[0814]	Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val			
[0815]		35	40	45
[0816]	Ala Ala Ile Ile Trp Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val			
[0817]		50	55	60
[0818]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr			
[0819]	65	70	75	80
[0820]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0821]		85	90	95
[0822]	Ala Val Asp Thr Arg Pro Pro Tyr Gly Leu Arg Asn Ala Asn Arg Tyr			
[0823]		100	105	110
[0824]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
[0825]		115	120	125
[0826]	<210> 90			
[0827]	<211> 375			
[0828]	<212> DNA			
[0829]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0830]	<400> 90			
[0831]	caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60			
[0832]	tcctgtgcag cctctggacg cgtcttcagt agcgatgcca tgggctggtt ccgccaggct 120			
[0833]	ccaggaacg agcgtgagtt tgtagcagct attatctgga gtggtagtag cacacactat 180			
[0834]	gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggggtat 240			
[0835]	ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agtagaact 300			
[0836]	cgccctccat acggattgag gaacgcaaac cggtatgact actggggcca ggggaccag 360			
[0837]	gtcaccgtct cctca 375			
[0838]	<210> 91			
[0839]	<211> 8			

- [0840] <212> PRT
[0841] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0842] <400> 91
[0843] Gly Arg Val Phe Ser Ser Asp Ala
[0844] 1 5
[0845] <210> 92
[0846] <211> 24
[0847] <212> DNA
[0848] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0849] <400> 92
[0850] ggacgcgtct tcagtagcga tgcc 24
[0851] <210> 93
[0852] <211> 8
[0853] <212> PRT
[0854] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0855] <400> 93
[0856] Ile Ile Trp Ser Gly Ser Ser Thr
[0857] 1 5
[0858] <210> 94
[0859] <211> 24
[0860] <212> DNA
[0861] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0862] <400> 94
[0863] attatctgga gtgtagtag caca 24
[0864] <210> 95
[0865] <211> 18
[0866] <212> PRT
[0867] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0868] <400> 95
[0869] Ala Val Asp Thr Arg Pro Pro Tyr Gly Leu Arg Asn Ala Asn Arg Tyr
[0870] 1 5 10 15
[0871] Asp Tyr
[0872] <210> 96
[0873] <211> 54
[0874] <212> DNA
[0875] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0876] <400> 96
[0877] gcagtagaca ctcgcctcc atacgattg aggaacgcaa accggtatga ctac 54
[0878] <210> 97
[0879] <211> 116
[0880] <212> PRT
[0881] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0882] <400> 97
 [0883] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0884] 1 5 10 15
 [0885] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Ala
 [0886] 20 25 30
 [0887] Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 [0888] 35 40 45
 [0889] Ala Thr Ile Thr Pro Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 [0890] 50 55 60
 [0891] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Val Val Leu
 [0892] 65 70 75 80
 [0893] Gln Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 [0894] 85 90 95
 [0895] Arg Ala Tyr Asp Thr His Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 [0896] 100 105 110
 [0897] Thr Val Ser Ser
 [0898] 115
 [0899] <210> 98
 [0900] <211> 348
 [0901] <212> DNA
 [0902] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0903] <400> 98
 [0904] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 [0905] tcctgtgcag cctctggatt tacattcagt atggctgta tgggctggta ccgccagget 120
 [0906] cctgggaagc agcgcgagtt ggtcgcaact attactcctg gtgtaaacac gtactatgta 180
 [0907] gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaagac ggtggttctg 240
 [0908] caaatgaata acctggaacc tgaggacgcg gccgtctatt actgtaatcg agcatatgat 300
 [0909] acccaactacg actactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348
 [0910] <210> 99
 [0911] <211> 8
 [0912] <212> PRT
 [0913] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0914] <400> 99
 [0915] Gly Phe Thr Phe Ser Met Ala Val
 [0916] 1 5
 [0917] <210> 100
 [0918] <211> 24
 [0919] <212> DNA
 [0920] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0921] <400> 100
 [0922] ggattacat tcagtatggc tggt 24
 [0923] <210> 101

[0924] <211> 7
 [0925] <212> PRT
 [0926] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0927] <400> 101
 [0928] Ile Thr Pro Gly Gly Asn Thr
 [0929] 1 5
 [0930] <210> 102
 [0931] <211> 21
 [0932] <212> DNA
 [0933] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0934] <400> 102
 [0935] attactcctg gtggtaacac g 21
 [0936] <210> 103
 [0937] <211> 10
 [0938] <212> PRT
 [0939] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0940] <400> 103
 [0941] Asn Arg Ala Tyr Asp Thr His Tyr Asp Tyr
 [0942] 1 5 10
 [0943] <210> 104
 [0944] <211> 30
 [0945] <212> DNA
 [0946] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0947] <400> 104
 [0948] aatcgagcat atgataccca ctacgactac 30
 [0949] <210> 105
 [0950] <211> 121
 [0951] <212> PRT
 [0952] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0953] <400> 105
 [0954] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0955] 1 5 10 15
 [0956] Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Phe Asp Phe Asp Asp Tyr
 [0957] 20 25 30
 [0958] Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Arg Lys Gly Arg Glu Gly Ile
 [0959] 35 40 45
 [0960] Ser Tyr Ile Arg Gly Ser Asp Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0961] 50 55 60
 [0962] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Tyr
 [0963] 65 70 75 80
 [0964] Leu Gln Met Asn Thr Leu Glu Pro Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0965] 85 90 95

- [0966] Asp Pro Lys Gly Ser Thr Gly Trp Asn Pro Ser Gly Asp Ser Trp Gly
 [0967] 100 105 110
 [0968] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0969] 115 120
 [0970] <210> 106
 [0971] <211> 363
 [0972] <212> DNA
 [0973] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0974] <400> 106
 [0975] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagg ctgggggatc tctgacgctc 60
 [0976] tcctgtgcac attctggatt cgatttcgat gattatgccg taggctggtt ccgccaggcc 120
 [0977] ccgcggaagg gacgtgaggg gatctcatat atacgtggta gtgatgtct gacatactat 180
 [0978] gcagactccg tgaaggccg attcaccata tcgagagaca acgccaagaa tctactgtat 240
 [0979] ctgcaaatga acaccctcga acccacggac acggccgtgt attactgtga cccgaagggg 300
 [0980] tctacgggat ggaacccttc gggggattcc tggggccagg ggaccagggt caccgtctcc 360
 [0981] tca 363
 [0982] <210> 107
 [0983] <211> 8
 [0984] <212> PRT
 [0985] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0986] <400> 107
 [0987] Gly Phe Asp Phe Asp Asp Tyr Ala
 [0988] 1 5
 [0989] <210> 108
 [0990] <211> 24
 [0991] <212> DNA
 [0992] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0993] <400> 108
 [0994] ggattcgatt tcgatgatta tgcc 24
 [0995] <210> 109
 [0996] <211> 8
 [0997] <212> PRT
 [0998] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0999] <400> 109
 [1000] Ile Arg Gly Ser Asp Gly Leu Thr
 [1001] 1 5
 [1002] <210> 110
 [1003] <211> 24
 [1004] <212> DNA
 [1005] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [1006] <400> 110
 [1007] atacgtggta gtgatgtct gaca 24

- [1008] <210> 111
- [1009] <211> 14
- [1010] <212> PRT
- [1011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1012] <400> 111
- [1013] Asp Pro Lys Gly Ser Thr Gly Trp Asn Pro Ser Gly Asp Ser
- [1014] 1 5 10
- [1015] <210> 112
- [1016] <211> 42
- [1017] <212> DNA
- [1018] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1019] <400> 112
- [1020] gaccggaagg ggtctacggg atggaaccct tcgggggatt cc 42
- [1021] <210> 113
- [1022] <211> 117
- [1023] <212> PRT
- [1024] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1025] <400> 113
- [1026] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [1027] 1 5 10 15
- [1028] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Lys Phe Ser Ile Ala
- [1029] 20 25 30
- [1030] Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
- [1031] 35 40 45
- [1032] Ala Ser Ile Thr Pro Gly Gly Asn Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Val Lys
- [1033] 50 55 60
- [1034] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
- [1035] 65 70 75 80
- [1036] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
- [1037] 85 90 95
- [1038] Asp Phe Arg Leu Ala Gly Leu Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
- [1039] 100 105 110
- [1040] Val Thr Val Ser Ser
- [1041] 115
- [1042] <210> 114
- [1043] <211> 351
- [1044] <212> DNA
- [1045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1046] <400> 114
- [1047] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
- [1048] tcctgtgcag cctctggaag caagttcagt atcgctacca tgggctggta ccgccaggct 120
- [1049] ccaggaagc agcgcgattt ggtcgcattc attacgctg gtggtaacac aacctatgca 180

- [1050] gatttcgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
- [1051] caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaatga cttccgtcta 300
- [1052] gctggtctga gggactactg gggccagggg acccaggtca ccgtctctc a 351
- [1053] <210> 115
- [1054] <211> 8
- [1055] <212> PRT
- [1056] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [1057] <400> 115
- [1058] Gly Ser Lys Phe Ser Ile Ala Thr
- [1059] 1 5
- [1060] <210> 116
- [1061] <211> 24
- [1062] <212> DNA
- [1063] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [1064] <400> 116
- [1065] ggaagcaagt tcagtatcgc tacc 24
- [1066] <210> 117
- [1067] <211> 7
- [1068] <212> PRT
- [1069] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [1070] <400> 117
- [1071] Ile Thr Pro Gly Gly Asn Thr
- [1072] 1 5
- [1073] <210> 118
- [1074] <211> 21
- [1075] <212> DNA
- [1076] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [1077] <400> 118
- [1078] attacgcctg gtgtaaacac a 21
- [1079] <210> 119
- [1080] <211> 11
- [1081] <212> PRT
- [1082] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [1083] <400> 119
- [1084] Asn Asp Phe Arg Leu Ala Gly Leu Arg Asp Tyr
- [1085] 1 5 10
- [1086] <210> 120
- [1087] <211> 33
- [1088] <212> DNA
- [1089] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [1090] <400> 120
- [1091] aatgaacttcc gtctagctgg tctgaggac tac 33

- [1092] <210> 121
 [1093] <211> 122
 [1094] <212> PRT
 [1095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1096] <400> 121
 [1097] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1098] 1 5 10 15
 [1099] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Ala Phe Ser Met Tyr
 [1100] 20 25 30
 [1101] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [1102] 35 40 45
 [1103] Ser Thr Ile Ser Ala Ser Gly Gly Met Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1104] 50 55 60
 [1105] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [1106] 65 70 75 80
 [1107] Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1108] 85 90 95
 [1109] Ala Ala Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Arg His Phe Arg Gly Asp His Trp
 [1110] 100 105 110
 [1111] Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [1112] 115 120
 [1113] <210> 122
 [1114] <211> 366
 [1115] <212> DNA
 [1116] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1117] <400> 122
 [1118] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggttcagc ctggggggc tctgagactc 60
 [1119] tcctgtacag cctctggacg cgccttcagt atgtatgtca tgggctgggt ccgccaggct 120
 [1120] ccaggaagg agcgtgagtt tgtgtcgact attagcgcga gtggtggtat gacatactat 180
 [1121] gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
 [1122] ctggaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agcagagtat 300
 [1123] ctagggaatc tacggcactt taggggggac cactggggca aagggacca ggtcaccgctc 360
 [1124] tcctca 366
 [1125] <210> 123
 [1126] <211> 8
 [1127] <212> PRT
 [1128] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1129] <400> 123
 [1130] Gly Arg Ala Phe Ser Met Tyr Val
 [1131] 1 5
 [1132] <210> 124
 [1133] <211> 24

- [1134] <212> DNA
- [1135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1136] <400> 124
- [1137] ggacgcgcct tcagtatgta tgtc 24
- [1138] <210> 125
- [1139] <211> 8
- [1140] <212> PRT
- [1141] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1142] <400> 125
- [1143] Ile Ser Ala Ser Gly Gly Met Thr
- [1144] 1 5
- [1145] <210> 126
- [1146] <211> 24
- [1147] <212> DNA
- [1148] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1149] <400> 126
- [1150] attagcgcga gtggtggtat gaca 24
- [1151] <210> 127
- [1152] <211> 15
- [1153] <212> PRT
- [1154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1155] <400> 127
- [1156] Ala Ala Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Arg His Phe Arg Gly Asp His
- [1157] 1 5 10 15
- [1158] <210> 128
- [1159] <211> 45
- [1160] <212> DNA
- [1161] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1162] <400> 128
- [1163] gcagcagagt atctagggaa tctacggcac tttagggggg accac 45
- [1164] <210> 129
- [1165] <211> 124
- [1166] <212> PRT
- [1167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1168] <400> 129
- [1169] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [1170] 1 5 10 15
- [1171] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Thr Leu Asp Asp Tyr
- [1172] 20 25 30
- [1173] Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
- [1174] 35 40 45
- [1175] Ala Cys Ile Ser Ala Ser Glu Leu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[1176]	50	55	60
[1177]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr		
[1178]	65	70	75 80
[1179]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1180]		85	90 95
[1181]	Ala Ala Arg Val Gly Arg Ile Val Asp Val Thr Ser Thr Gln Tyr Gln		
[1182]		100	105 110
[1183]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
[1184]		115	120
[1185]	<210>	130	
[1186]	<211>	372	
[1187]	<212>	DNA	
[1188]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1189]	<400>	130	
[1190]	cagggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc	60	
[1191]	tctgtgcag cctctgggac cactttggat gattacgccg taggctggtt ccgccagcc	120	
[1192]	ccaggcaagg agcgcgaggg ggtcgcattg attagcgcta gtgagcttag cacatattat	180	
[1193]	gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgcaaaaa cacgatgtat	240	
[1194]	ctgcaaataa acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agccccagtt	300	
[1195]	gggagaatag tggacgttac tagtacacag tatcagtact ggggccaggg gaccaggtc	360	
[1196]	accgtctcct ca	372	
[1197]	<210>	131	
[1198]	<211>	8	
[1199]	<212>	PRT	
[1200]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1201]	<400>	131	
[1202]	Gly Thr Thr Leu Asp Asp Tyr Ala		
[1203]	1	5	
[1204]	<210>	132	
[1205]	<211>	24	
[1206]	<212>	DNA	
[1207]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1208]	<400>	132	
[1209]	gggaccactt tggatgatta cgcc	24	
[1210]	<210>	133	
[1211]	<211>	8	
[1212]	<212>	PRT	
[1213]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1214]	<400>	133	
[1215]	Ile Ser Ala Ser Glu Leu Ser Thr		
[1216]	1	5	
[1217]	<210>	134	

[1218] <211> 24
 [1219] <212> DNA
 [1220] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1221] <400> 134
 [1222] attagcgcta gtgagcttag caca 24
 [1223] <210> 135
 [1224] <211> 17
 [1225] <212> PRT
 [1226] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1227] <400> 135
 [1228] Ala Ala Arg Val Gly Arg Ile Val Asp Val Thr Ser Thr Gln Tyr Gln
 [1229] 1 5 10 15
 [1230] Tyr
 [1231] <210> 136
 [1232] <211> 51
 [1233] <212> DNA
 [1234] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1235] <400> 136
 [1236] gcagcccagag ttgggagaat agtggacggt actagtacac agtatcagta c 51
 [1237] <210> 137
 [1238] <211> 124
 [1239] <212> PRT
 [1240] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1241] <400> 137
 [1242] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1243] 1 5 10 15
 [1244] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 [1245] 20 25 30
 [1246] Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Ala Val
 [1247] 35 40 45
 [1248] Ala Ala Ile Ser Arg Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1249] 50 55 60
 [1250] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1251] 65 70 75 80
 [1252] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1253] 85 90 95
 [1254] Ala Asp Ser Gly Ala Arg Ala Tyr Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Phe Gly
 [1255] 100 105 110
 [1256] Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [1257] 115 120
 [1258] <210> 138
 [1259] <211> 372

- [1260] <212> DNA
[1261] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1262] <400> 138
[1263] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc 60
[1264] tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt agctataaca tgggctggtt cgcaggct 120
[1265] ccagggcagg ggctcgaggc tgtagcagct attagccggg gtggtggtag tacatactat 180
[1266] gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acagcaagaa cacgttgtat 240
[1267] ctgcaaatga acagcctgcg agctgaggac acggccgttt attactgtgc agactcagga 300
[1268] gctcgagcct atagtggtag ttacctgac tttggttctt ggggccaggg gaccaggctc 360
[1269] accgtctcct ca 372
[1270] <210> 139
[1271] <211> 8
[1272] <212> PRT
[1273] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1274] <400> 139
[1275] Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Asn
[1276] 1 5
[1277] <210> 140
[1278] <211> 24
[1279] <212> DNA
[1280] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1281] <400> 140
[1282] ggacgcacct tcagtagcta taac 24
[1283] <210> 141
[1284] <211> 8
[1285] <212> PRT
[1286] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1287] <400> 141
[1288] Ile Ser Arg Gly Gly Gly Ser Thr
[1289] 1 5
[1290] <210> 142
[1291] <211> 24
[1292] <212> DNA
[1293] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1294] <400> 142
[1295] attagccggg gtggtggtag taca 24
[1296] <210> 143
[1297] <211> 17
[1298] <212> PRT
[1299] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1300] <400> 143
[1301] Ala Asp Ser Gly Ala Arg Ala Tyr Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Phe Gly

[1302]	1	5	10	15
[1303]	Ser			
[1304]	<210> 144			
[1305]	<211> 51			
[1306]	<212> DNA			
[1307]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1308]	<400> 144			
[1309]	gcagactcag gagctcgagc ctatagtggg agttacctcg actttgggtc c 51			
[1310]	<210> 145			
[1311]	<211> 22			
[1312]	<212> PRT			
[1313]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1314]	<400> 145			
[1315]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro			
[1316]	1	5	10	15
[1317]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro			
[1318]	20			
[1319]	<210> 146			
[1320]	<211> 66			
[1321]	<212> DNA			
[1322]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1323]	<400> 146			
[1324]	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccg ctttctgctg 60			
[1325]	atcccc 66			
[1326]	<210> 147			
[1327]	<211> 46			
[1328]	<212> PRT			
[1329]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1330]	<400> 147			
[1331]	Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser			
[1332]	1	5	10	15
[1333]	Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly			
[1334]	20	25	30	
[1335]	Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr			
[1336]	35	40	45	
[1337]	<210> 148			
[1338]	<211> 138			
[1339]	<212> DNA			
[1340]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1341]	<400> 148			
[1342]	actaccccag caccgaggcc gccaccccg gctcctacca tgcctccca gcctctgtcc 60			
[1343]	ctgctccgg aggcatttag accgcagct ggtggggccg tgcatacccg ggtctttgac 120			

- [1344] ttcgcctgcg atatctac 138
- [1345] <210> 149
- [1346] <211> 24
- [1347] <212> PRT
- [1348] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1349] <400> 149
- [1350] Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
- [1351] 1 5 10 15
- [1352] Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
- [1353] 20
- [1354] <210> 150
- [1355] <211> 72
- [1356] <212> DNA
- [1357] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1358] <400> 150
- [1359] atttgggccc ctctggetgg tacttgcggg gtctgetgc tttcactegt gatcactett 60
- [1360] tactgtaagc gc 72
- [1361] <210> 151
- [1362] <211> 42
- [1363] <212> PRT
- [1364] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1365] <400> 151
- [1366] Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
- [1367] 1 5 10 15
- [1368] Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
- [1369] 20 25 30
- [1370] Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
- [1371] 35 40
- [1372] <210> 152
- [1373] <211> 126
- [1374] <212> DNA
- [1375] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1376] <400> 152
- [1377] ggtcggaaga agctgctgta catctttaag caacccttca tgaggcctgt gcagactact 60
- [1378] caagaggagg acggctgttc atgccggttc ccagaggagg aggaaggcgg ctgcgaactg 120
- [1379] cgcgtg 126
- [1380] <210> 153
- [1381] <211> 110
- [1382] <212> PRT
- [1383] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1384] <400> 153
- [1385] Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn

[1386]	1	5	10	15
[1387]	Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val			
[1388]		20	25	30
[1389]	Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg			
[1390]		35	40	45
[1391]	Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys			
[1392]		50	55	60
[1393]	Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
[1394]		65	70	75
[1395]	Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
[1396]		85	90	95
[1397]	Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[1398]		100	105	110
[1399]	<210> 154			
[1400]	<211> 330			
[1401]	<212> DNA			
[1402]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1403]	<400> 154			
[1404]	aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac 60			
[1405]	gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 120			
[1406]	ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc 180			
[1407]	caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattgta tgaaagggga acgcagaaga 240			
[1408]	ggcaaaggcc acgacggact gtaccagga ctcagaccg ccaccaagga cacctatgac 300			
[1409]	gctcttcaca tgcaggccct gccgctcgg 330			
[1410]	<210> 155			
[1411]	<211> 23			
[1412]	<212> PRT			
[1413]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1414]	<400> 155			
[1415]	Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp			
[1416]	1	5	10	15
[1417]	Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro			
[1418]		20		
[1419]	<210> 156			
[1420]	<211> 69			
[1421]	<212> DNA			
[1422]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1423]	<400> 156			
[1424]	ctcgagggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacaat gcggtgacgt ggaggagaat 60			
[1425]	cccggccct 69			
[1426]	<210> 157			
[1427]	<211> 1179			

- [1428] <212> DNA
- [1429] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1430] <400> 157
- [1431] ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60
- [1432] ggaggggtcg gcaattgaac cggcgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120
- [1433] gatgtcgtgt actggctccg ctttttccc gaggtgggg gagaaccgta tataagtga 180
- [1434] gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgcg ccagaacaca ggtaagtgcc 240
- [1435] gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg gccttgaatt 300
- [1436] acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatccccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg 360
- [1437] gagagttega ggccttgcgc ttaaggagcc ctttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg 420
- [1438] cctgggcgct ggggcccgcc cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgctg tctcgtctgt 480
- [1439] ttcgataagt ctctagccat ttaaaat tttt tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg 540
- [1440] caagatagtc ttgtaaagtc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc 600
- [1441] gcgggcggcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga 660
- [1442] gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgctt 720
- [1443] ggctcgcgc cgccgtgtat cgccccgcc tgggcggcaa ggctggcccc gtcggcacca 780
- [1444] gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg caggagctc aaaatggagg 840
- [1445] acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaaaag ggcctttccg 900
- [1446] tcctcagccg tcgcttcgat tgactccacg gactaccggg cgccgtccag gcacctcgat 960
- [1447] tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcatg 1020
- [1448] gatttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa 1080
- [1449] ttctccttgg aatttgcct ttttgagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca 1140
- [1450] gtggttcaaa gttttttct tccattcag gtgtcgtga 1179
- [1451] <210> 158
- [1452] <211> 23
- [1453] <212> PRT
- [1454] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1455] <400> 158
- [1456] Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His
- [1457] 1 5 10 15
- [1458] Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro
- [1459] 20
- [1460] <210> 159
- [1461] <211> 69
- [1462] <212> DNA
- [1463] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1464] <400> 159
- [1465] aggatgcttc tectggtgac aagccttctg ctctgtgagt taccacacc agcattctc 60
- [1466] ctgatcca 69
- [1467] <210> 160
- [1468] <211> 335
- [1469] <212> PRT

[1470]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[1471]	<400>	160
[1472]	Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu	
[1473]	1	5 10 15
[1474]	Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile	
[1475]		20 25 30
[1476]	Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe	
[1477]		35 40 45
[1478]	Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr	
[1479]		50 55 60
[1480]	Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn	
[1481]		65 70 75 80
[1482]	Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg	
[1483]		85 90 95
[1484]	Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile	
[1485]		100 105 110
[1486]	Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val	
[1487]		115 120 125
[1488]	Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp	
[1489]		130 135 140
[1490]	Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn	
[1491]		145 150 155 160
[1492]	Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu	
[1493]		165 170 175
[1494]	Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser	
[1495]		180 185 190
[1496]	Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu	
[1497]		195 200 205
[1498]	Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln	
[1499]		210 215 220
[1500]	Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly	
[1501]		225 230 235 240
[1502]	Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro	
[1503]		245 250 255
[1504]	His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr	
[1505]		260 265 270
[1506]	Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His	
[1507]		275 280 285
[1508]	Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro	
[1509]		290 295 300
[1510]	Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala	
[1511]		305 310 315 320

[1512] Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
 [1513] 325 330 335
 [1514] <210> 161
 [1515] <211> 1005
 [1516] <212> DNA
 [1517] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1518] <400> 161
 [1519] cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 60
 [1520] acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 120
 [1521] gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctcctc tggatccaca ggaactggat 180
 [1522] attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggettgc gcctgaaaac 240
 [1523] aggacggacc tccatgcctt tgagaacctg gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 300
 [1524] ggtcagtttt ctcttgagcgt cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 360
 [1525] aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tccggaaaca aaaattttgtg ctatgcaaat 420
 [1526] acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaacaaaat tataagcaac 480
 [1527] agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 540
 [1528] ggctgctggg gcccgagacc caggactgc gtctcttggc ggaatgtcag ccgaggcagg 600
 [1529] gaatgcgtgg acaagtgcaa ctttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct 660
 [1530] gactgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga 720
 [1531] cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggccccca ctgcgtcaag 780
 [1532] acctgcccgg caggagtcac gggagaaaac aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc 840
 [1533] ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt 900
 [1534] gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg cactgggat ggtgggggcc 960
 [1535] ctctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggectct tcatg 1005

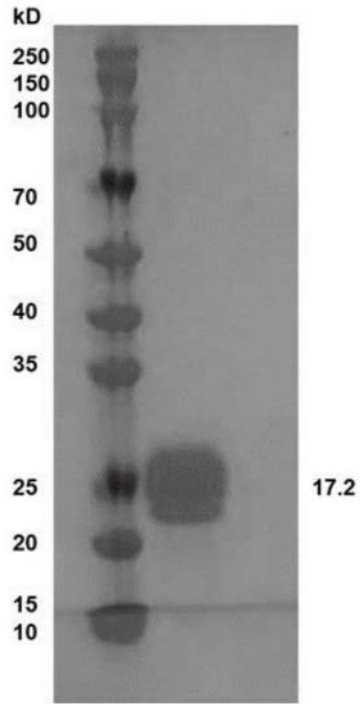


图1

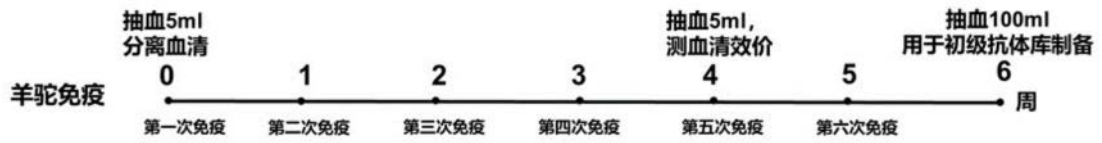


图2

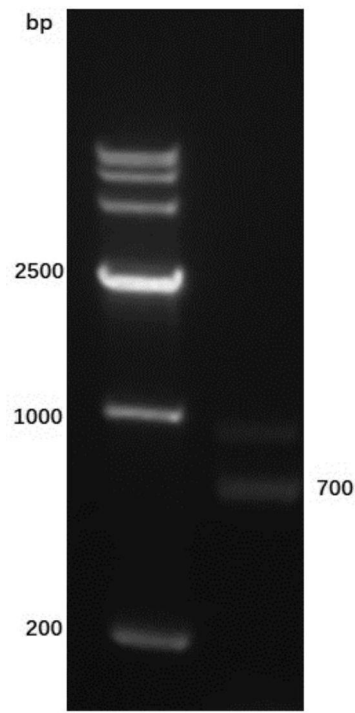


图3

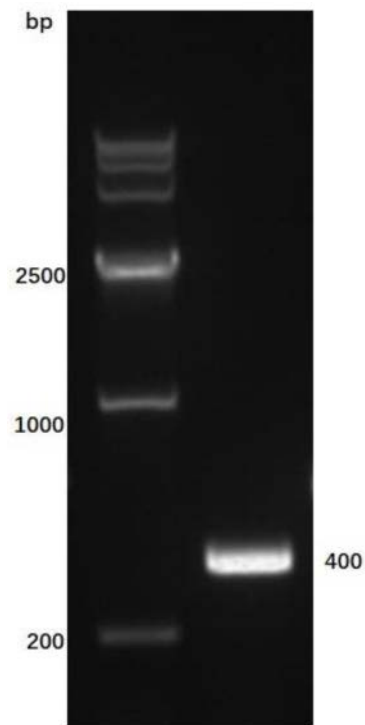


图4

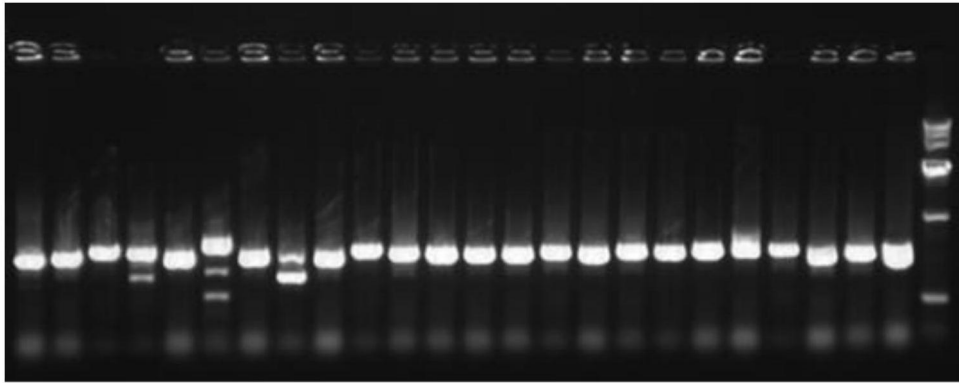


图5

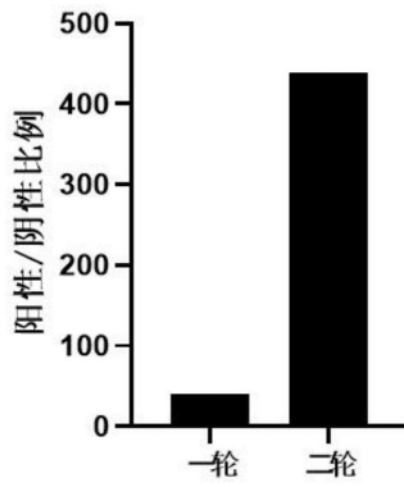


图6

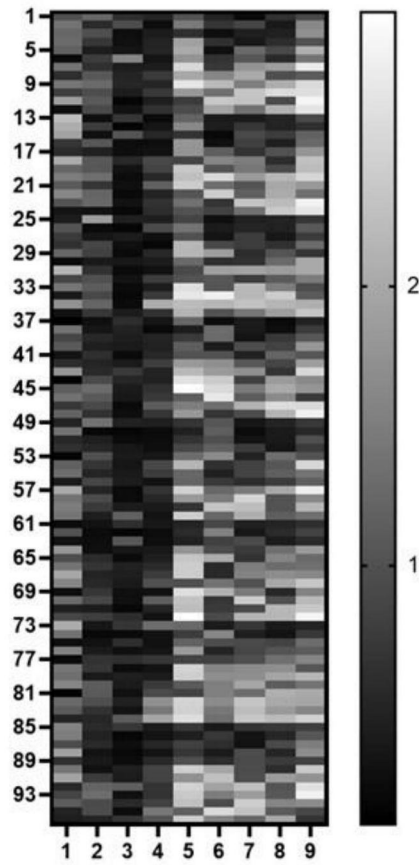


图7

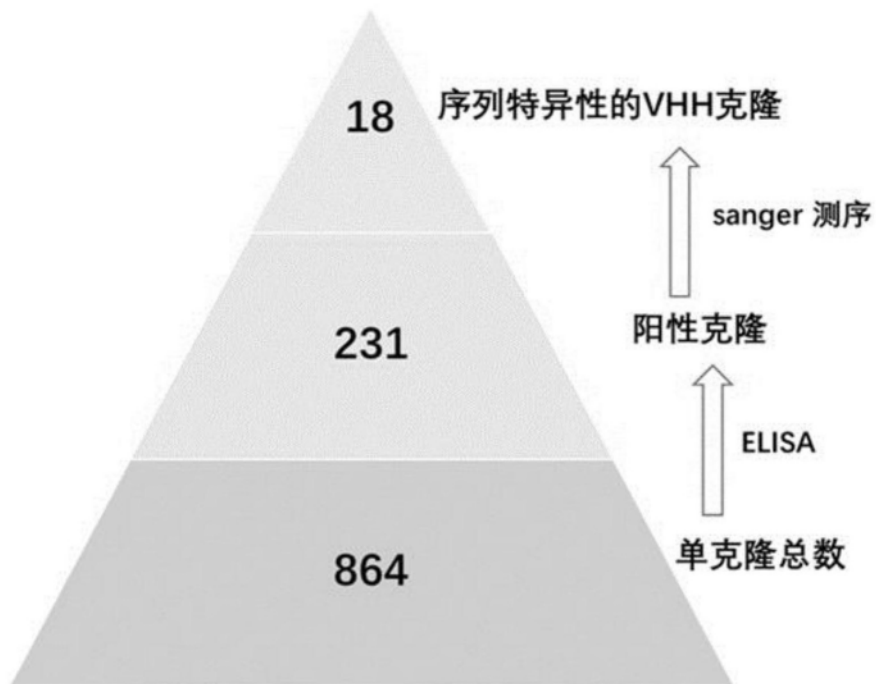


图8

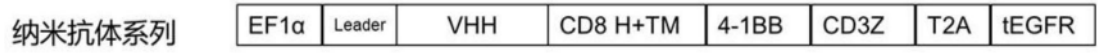


图9

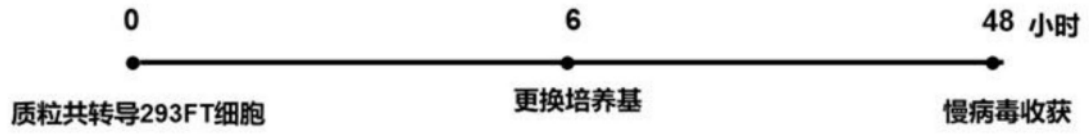


图10

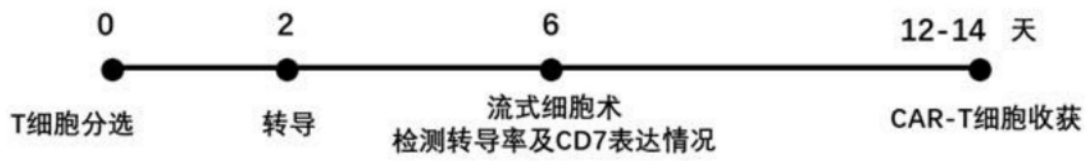


图11

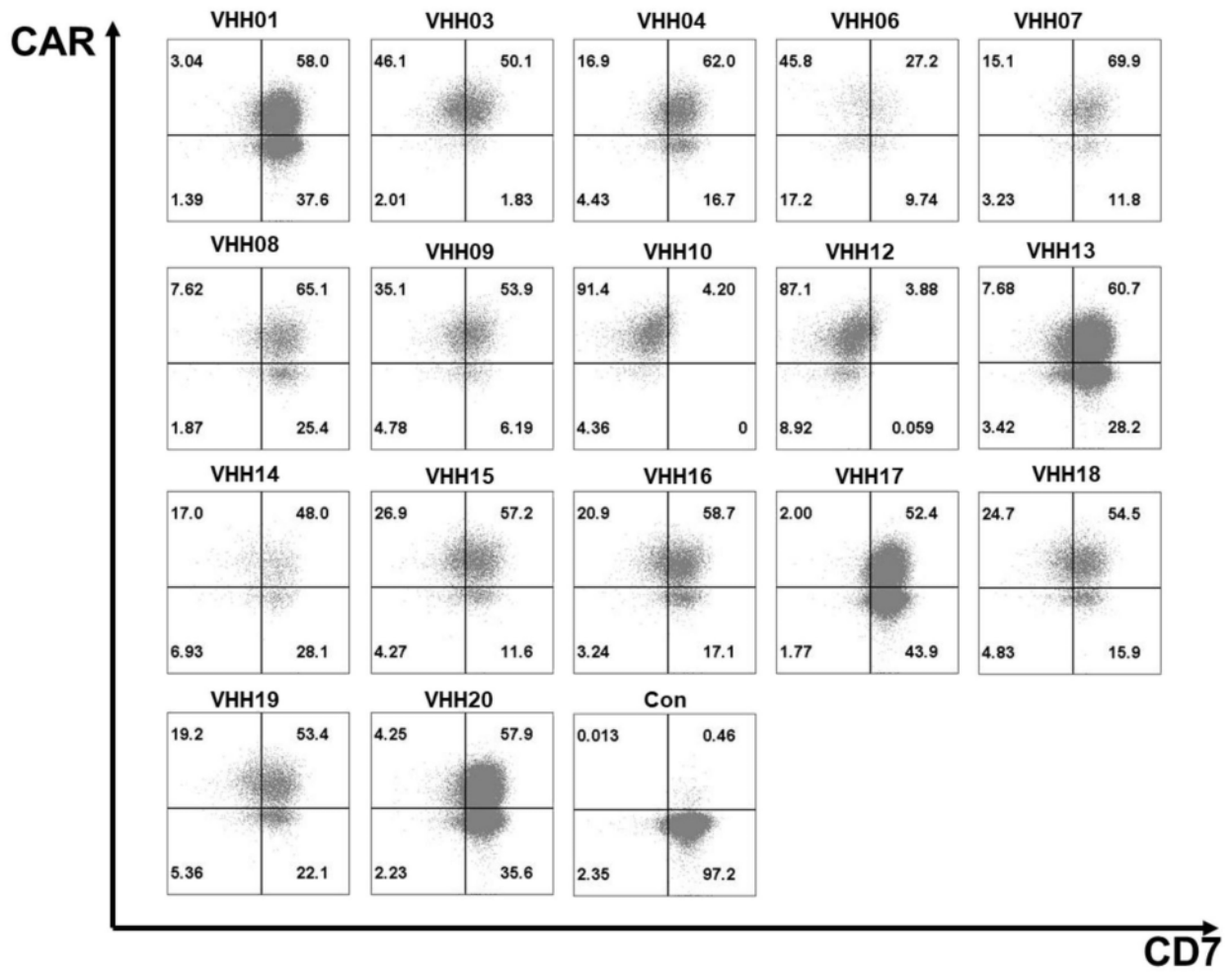


图12

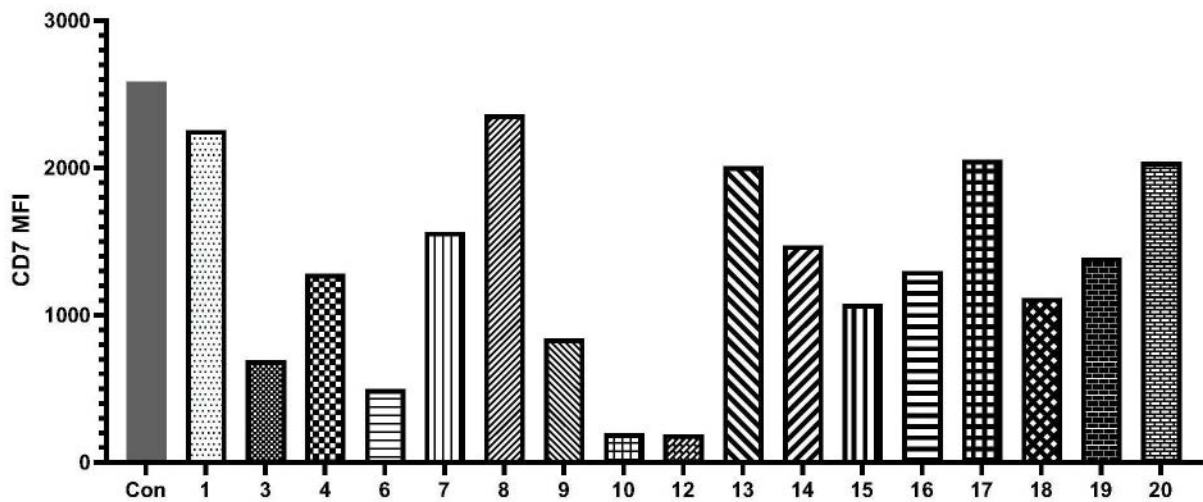


图13

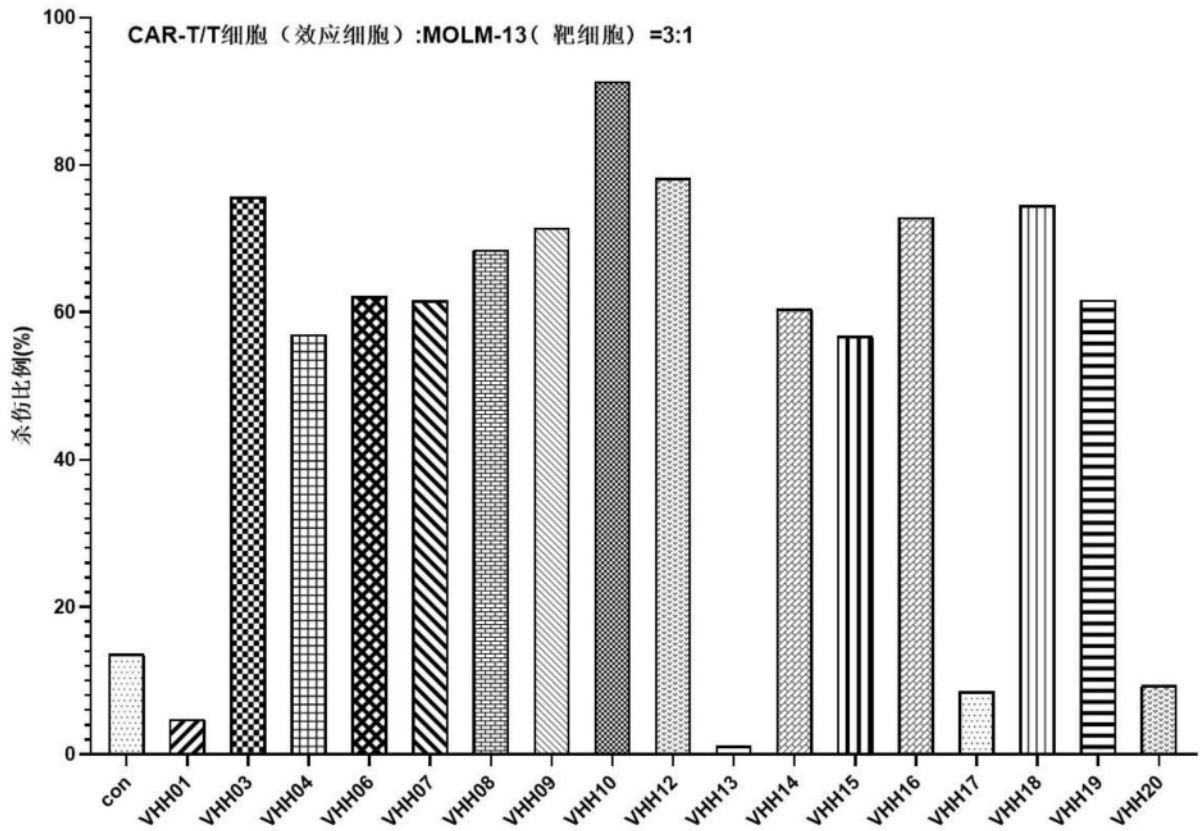


图14

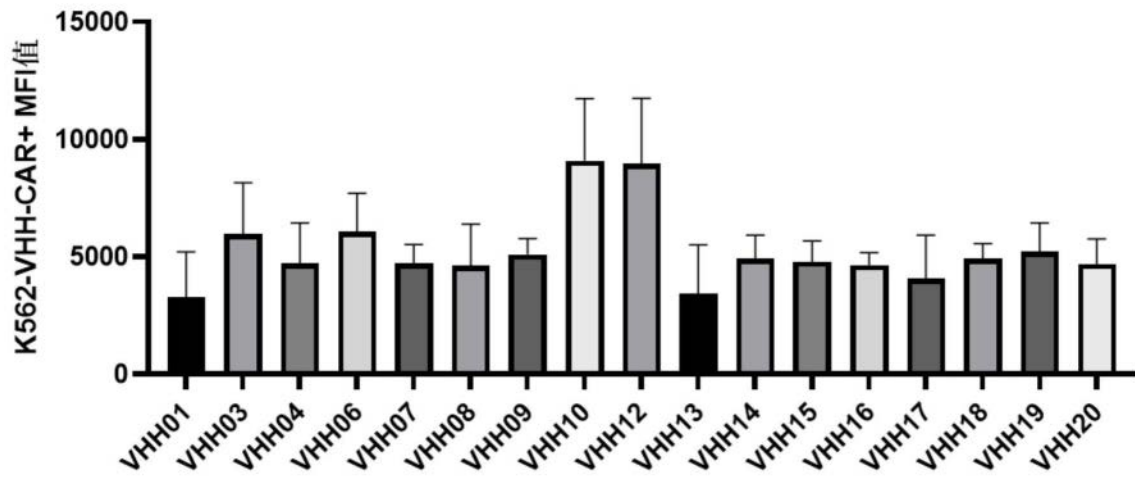


图15

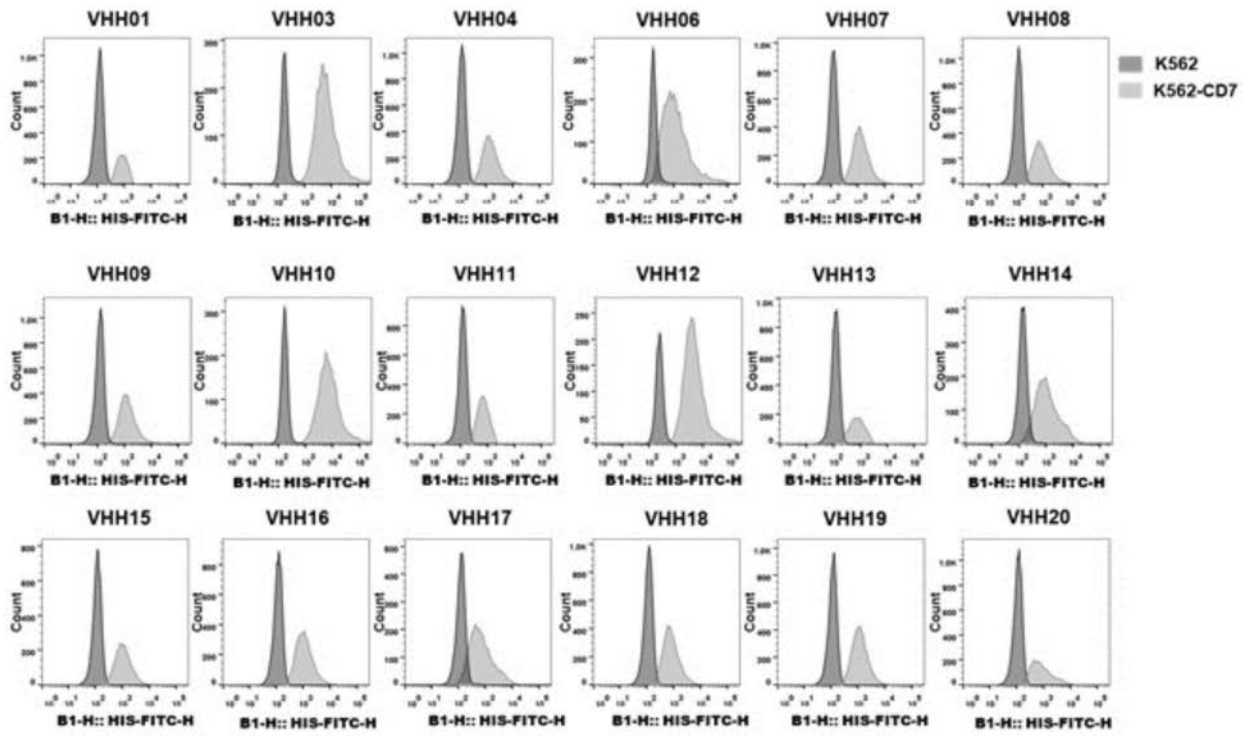


图16

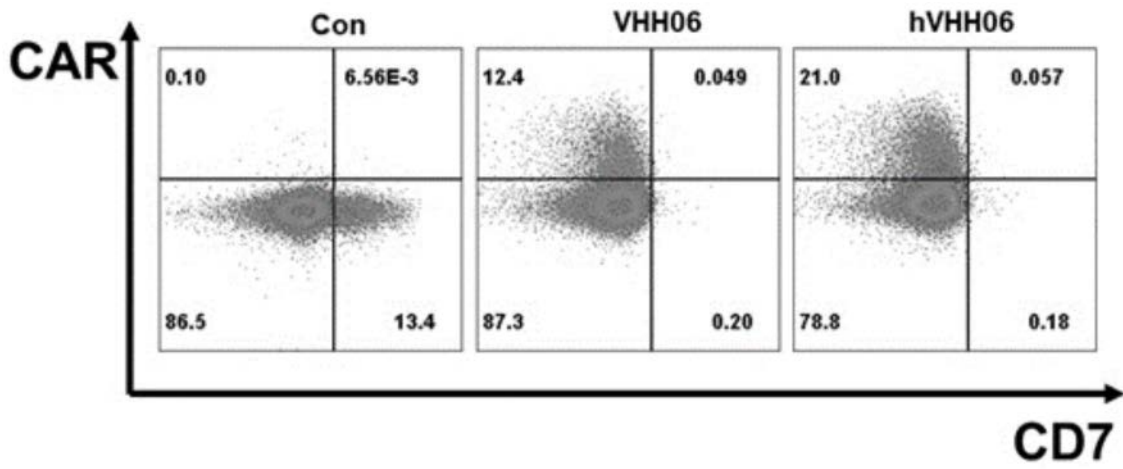


图17

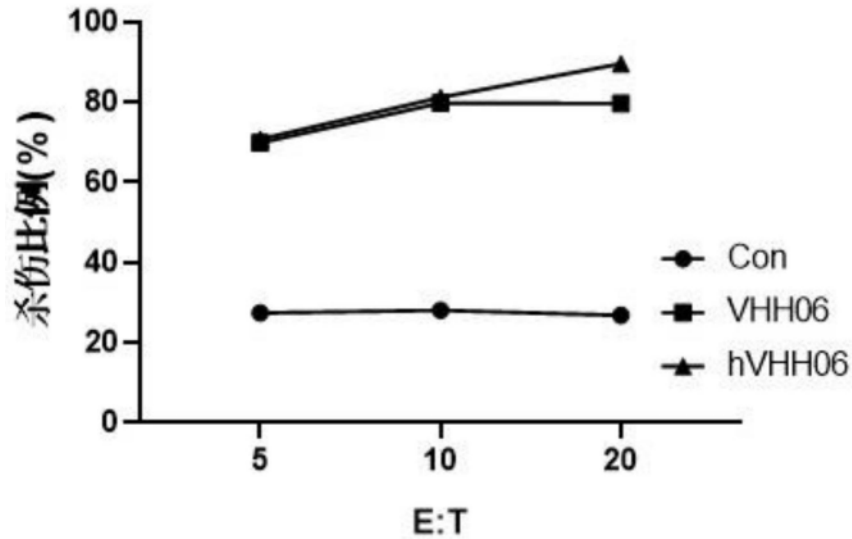


图18

DP-47 .seq	EVQLLESSGG	GLVQ P GGSLR	LSCAASGFTF	SSYAMSWVRQ	APG KGLEW VVS
VHH06 .seq	QVQLQES-GG	GLVQ A GGSLR	LSCAASGRTE	SSYNMGWFRQ	APG AERE FVA
hVHH06 .seq	QVQLQES-GG	GLVQ P GGSLR	LSCAASGRTE	SSYNMGWFRQ	APG QGLEA VA

DP-47 .seq	AISGSGGSTY	YADSVKGRFT	ISRDN S KNT L	YLQMNSLR A E	DTAVYYCAKS
VHH06 .seq	AISRGGGSTY	YADSVKGRFT	ISRDN A KNT V	YLQMNSLR P E	DTAVYYCADS
hVHH06 .seq	AISRGGGSTY	YADSVKGRFT	ISRDN S KNT L	YLQMNSLR A E	DTAVYYCADS

DP-47 .seq	-----YG	AFDYWGQGTL	VTVSS
VHH06 .seq	GARAYSGSYL	DFGSWGQGTQ	VTVSS
hVHH06 .seq	GARAYSGSYL	DFGSWGQGTQ	VTVSS

图19

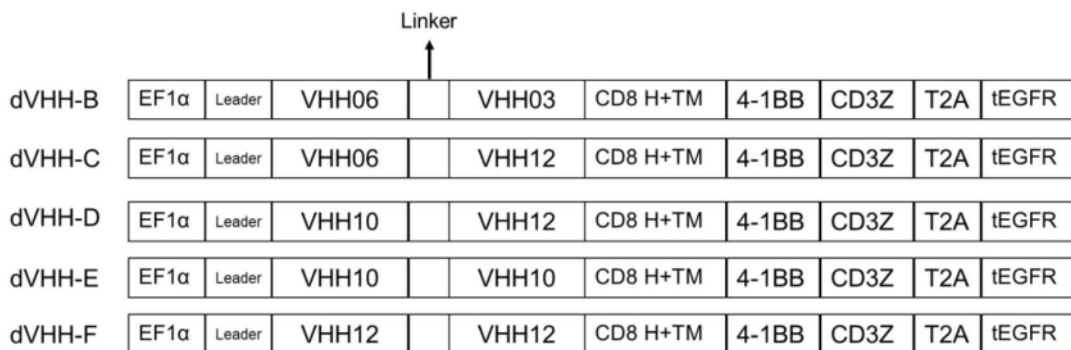


图20

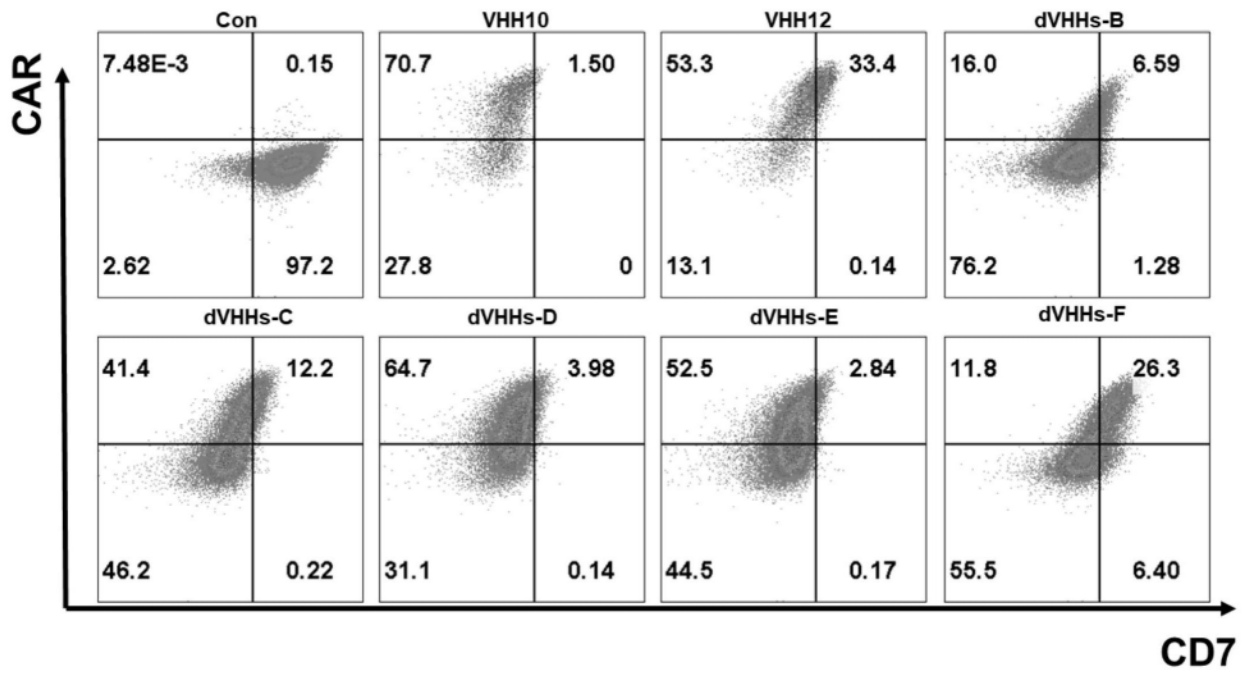


图21

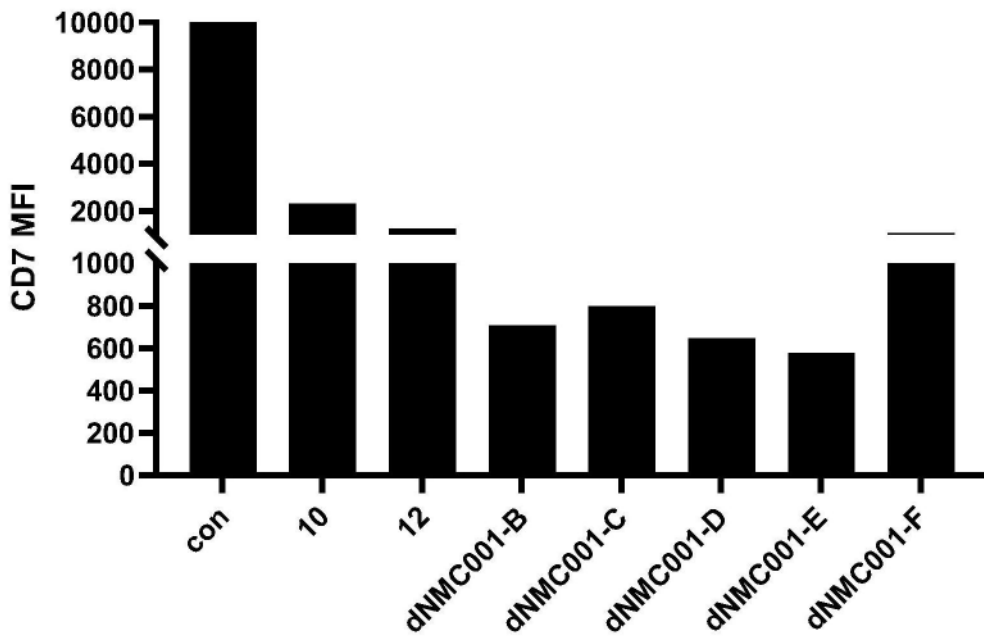


图22

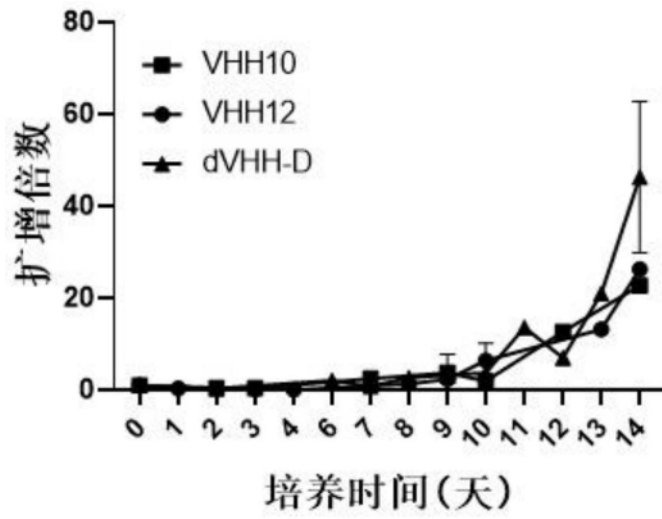


图23

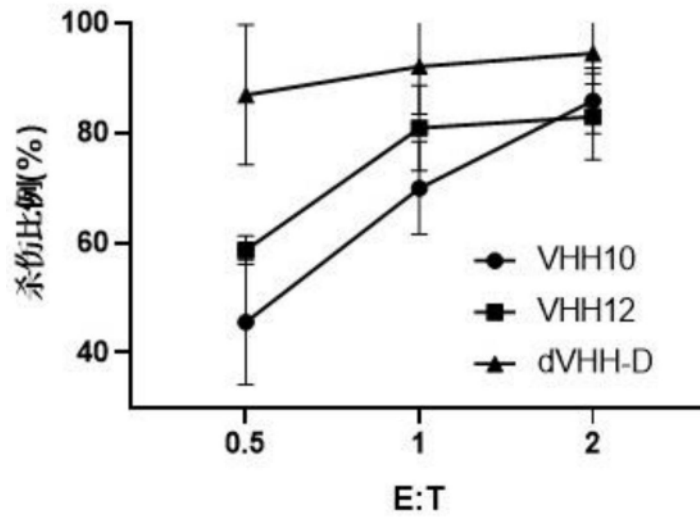


图24

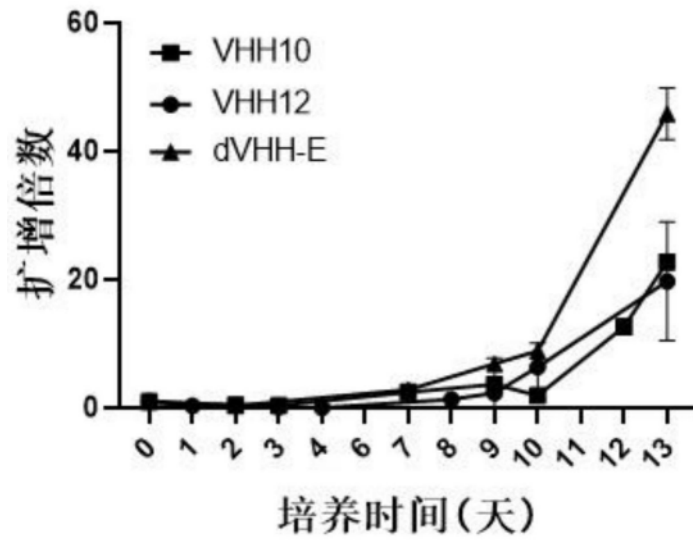


图25

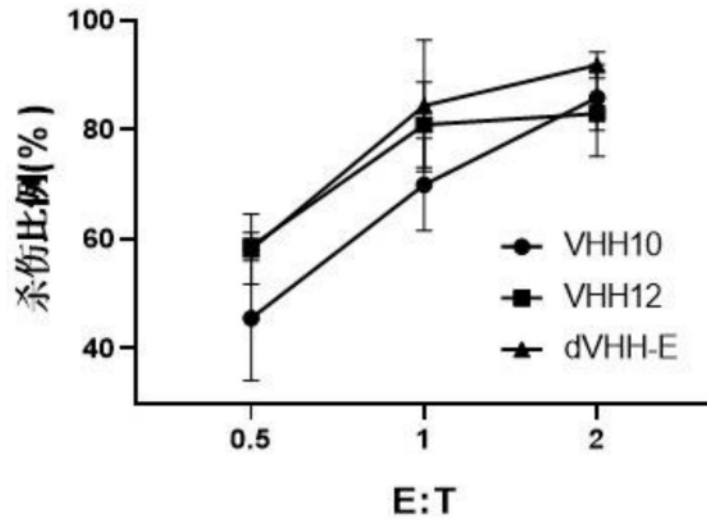


图26