



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118496374 A

(43) 申请公布日 2024.08.16

(21) 申请号 202410399887.X

(22) 申请日 2020.07.17

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2019/096360 2019.07.17 CN

PCT/CN2020/090587 2020.05.15 CN

(62) 分案原申请数据

202080047990.8 2020.07.17

(71) 申请人 南京传奇生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技小镇6号楼3、4层(江宁高新园)

(72) 发明人 赵涛 彭园园 唐安 王素娟

杨帅 张望 武术 郝瑞栋

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038

专利代理师 刘海罗

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书9页 说明书60页  
序列表(电子公布) 附图30页

(54) 发明名称

一种抗DLL3嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要

本文提供抗DLL3嵌合抗原受体(CAR)、DLL3结合蛋白及这种CAR或DLL3结合蛋白在治疗小细胞肺癌等DLL3相关病症中的用途。

1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 该嵌合抗原受体包含DLL3结合域, 其中该DLL3结合域包含或源自单域抗体 (sdAb) 或单链可变片段 (scFv),

(i) 其中所述sdAb部分包含:

(1) 具有如SEQ ID NO:279中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(2) 具有如SEQ ID NO:294中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(3) 具有如SEQ ID NO:297中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(4) 具有如SEQ ID NO:300中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(5) 具有如SEQ ID NO:307中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(6) 具有如SEQ ID NO:312中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(7) 具有如SEQ ID NO:280中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(8) 具有如SEQ ID NO:281中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;或

(9) 具有如SEQ ID NO:282中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(ii) 其中所述scFv部分包含:

(1) 轻链可变区 (VL), 其包含具有如SEQ ID NO:507所示轻链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3, 和重链可变区 (VH), 其包含具有如SEQ ID NO:508所示重链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3;或

(2) 轻链可变区 (VL), 其包含具有如SEQ ID NO:509所示轻链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3, 和重链可变区 (VH), 其包含具有如SEQ ID NO:510所示重链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3。

2. 如权利要求1所述的CAR, 其中该sdAb包含多肽, 该多肽包含: 包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体; 包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体; 以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的CAR, 其中该sdAb包含多肽, 该多肽包含: 包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2; 以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3, 或在该CDR1、该CDR2及该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的多肽变体。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的CAR, 其中该sdAb包含多肽, 该多肽包含以下中的任一种:

(1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;或

(9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的CAR,其中该sdAb包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

(1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3;

(2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3;

(3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3;

(4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3;

(5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3;

(6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3;

(7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3;

(8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3;或

(9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的CAR,其中该sdAb为针对人类或恒河猴DLL3产生的骆驼sdAb。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的CAR,其中该sdAb包含与SEQ ID NO:274-354中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的CAR,其中该sdAb通过CDR移植进行人源化。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的CAR,其中该人源化sdAb包含与SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

10. 如权利要求1所述的CAR,其中该scFv包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中该scFv的VH包含SEQ ID NO:498或504中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:499或505中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:500或506中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体,且该scFv的VL包含SEQ ID NO:495或501中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:496或502中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:497或503中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

11. 如权利要求1或权利要求10所述的CAR,其中该scFv的VH包含SEQ ID NO:498中所示的CDR1、SEQ ID NO:499中所示的CDR2及SEQ ID NO:500中所示的CDR3,且该scFv的VL包含SEQ ID NO:495中所示的CDR1、SEQ ID NO:496中所示的CDR2及SEQ ID NO:497中所示的CDR3;或该scFv的VH包含SEQ ID NO:504中所示的CDR1、SEQ ID NO:505中所示的CDR2及SEQ ID NO:506中所示的CDR3,且该scFv的VL包含SEQ ID NO:501中所示的CDR1、SEQ ID NO:502中所示的CDR2及SEQ ID NO:503中所示的CDR3。

12. 如权利要求1,10-11中任一项所述的CAR,该scFv的VH包含与SEQ ID NO:508中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv的VL包含与SEQ ID NO:507中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列;或该scFv的VH包含与SEQ ID NO:510中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv的VL包含与SEQ ID NO:509中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

13. 如权利要求1,10-12中任一项所述的CAR,其中该scFv从合成人类Fab噬菌体文库获得。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的CAR,其中该DLL3为人类或恒河猴DLL3。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的CAR,其中该CAR自N末端至C末端包含信号肽、该

DLL3结合域、铰链域、跨膜域及细胞内信号传导域。

16. 如权利要求15所述的CAR,其中该细胞内信号传导域源自CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d。

17. 如权利要求15或权利要求16所述的CAR,其中该细胞内信号传导域进一步包含细胞内共刺激序列。

18. 如权利要求17所述的CAR,其中该细胞内共刺激序列源自选自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83配体及其组合。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的CAR,其中该CAR包含与选自由SEQ ID NO:476-484、SEQ ID NO:485-494或SEQ ID NO:515-516组成的组的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

20. 如权利要求1至19中任一项所述的CAR,其中该DLL3结合域包含彼此连接的两个sdAb。

21. 如权利要求20所述的CAR,其中这些sdAb中的每一者独立地包含与SEQ ID NO:356或SEQ ID NO:366具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

22. 如权利要求20所述的CAR,其包含第一单域抗体和第二单域抗体,其中:

所述第一单域抗体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2,以及SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3;

所述第二单域抗体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2,以及SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3。

23. 如权利要求22所述的CAR,其中:

所述第一单域抗体包含SEQ ID NO:366的氨基酸序列,

所述第二单域抗体包含SEQ ID NO:356的氨基酸序列。

24. 如权利要求20至23中任一项所述的CAR,其中该CAR包含与选自由SEQ ID NO:518-520组成的组的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

25. 如权利要求20至24中任一项所述的CAR,其中该CAR包含SEQ ID NO:520的氨基酸序列。

26. 一种DLL3结合蛋白,该DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的单域抗体(sdAb)部分,其中该sdAb部分包含多肽,该多肽包含:

(1) 具有如SEQ ID NO:279中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(2) 具有如SEQ ID NO:294中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(3) 具有如SEQ ID NO:297中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(4) 具有如SEQ ID NO:300中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(5) 具有如SEQ ID NO:307中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2

和CDR3;

(6) 具有如SEQ ID NO:312中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(7) 具有如SEQ ID NO:280中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;

(8) 具有如SEQ ID NO:281中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3;或

(9) 具有如SEQ ID NO:282中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列相同的CDR1、CDR2和CDR3。

27. 一种DLL3结合蛋白,该DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的单域抗体(sdAb)部分,其中该sdAb部分包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

28. 如权利要求26或权利要求27所述的DLL3结合蛋白,其中该sdAb部分包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3,或在该CDR1、该CDR2及该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的多肽变体。

29. 如权利要求26至28中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该sdAb部分包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

(1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

(8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;或

(9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体。

30. 如权利要求26至29中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该sdAb部分包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

(1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3;

(2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3;

(3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3;

(4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3;

(5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3;

(6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3;

(7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3;

(8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3;或

(9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3。

31. 如权利要求26至30中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该sdAb部分为针对人类或恒河猴DLL3产生的骆驼sdAb。

32. 如权利要求26至31中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该sdAb部分包含与SEQ ID NO:274-354中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

33. 如权利要求26至32中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该sdAb部分通过CDR移植进行人源化。

34. 如权利要求26至33中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该人源化sdAb包含与SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

35. 如权利要求26至34中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该DLL3为人类或恒河猴DLL3。

36. 一种DLL3结合蛋白,该DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的单链可变片段(scFv)部分,其中该scFv部分包含:

(1) 轻链可变区(VL),其包含具有如SEQ ID NO:507所示轻链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3,和重链可变区(VH),其包含具有如SEQ ID NO:508所示重链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3;或

(2) 轻链可变区(VL),其包含具有如SEQ ID NO:509所示轻链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3,和重链可变区(VH),其包含具有如SEQ ID NO:510所示重链可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3。

37. 一种DLL3结合蛋白,该DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的单链可变片段(scFv)部分,其中该scFv部分包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中该scFv部分的VH包含SEQ ID NO:498或504中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:499或505中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:500或506中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体,且该scFv部分的VL包含SEQ ID NO:495或501中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:496或502中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:497或503中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

38. 如权利要求36或权利要求37所述的DLL3结合蛋白,其中该scFv部分的VH包含SEQ ID NO:498中所示的CDR1、SEQ ID NO:499中所示的CDR2及SEQ ID NO:500中所示的CDR3,且该scFv部分的VL包含SEQ ID NO:495中所示的CDR1、SEQ ID NO:496中所示的CDR2及SEQ ID NO:497中所示的CDR3;或该scFv部分的VH包含SEQ ID NO:504中所示的CDR1、SEQ ID NO:505中所示的CDR2及SEQ ID NO:506中所示的CDR3,且该scFv部分的VL包含SEQ ID NO:501中所示的CDR1、SEQ ID NO:502中所示的CDR2及SEQ ID NO:503中所示的CDR3。

39. 如权利要求36至38中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该scFv部分的VH包含与SEQ ID NO:508中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv部分的VL包含与SEQ ID NO:507中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列;或该scFv部分的VH包含与SEQ ID NO:510中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv部分的VL包含与SEQ ID NO:509中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

40. 如权利要求36至39中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该scFv部分自合成人类Fab噬菌体文库获得。

41. 如权利要求36至40中任一项所述的DLL3结合蛋白,其中该DLL3为人类或恒河猴DLL3。

42. 一种经分离的核酸分子,该经分离的核酸分子编码如权利要求1至25中任一项所述的CAR或如权利要求26至35或权利要求36至41中任一项所述的DLL3结合蛋白。

43. 如权利要求42所述的经分离的核酸分子,其中该经分离的核酸分子包含选自由SEQ ID NO:368-448组成的组的多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码骆驼单域抗体(sdAb)。

44. 如权利要求42所述的经分离的核酸分子,其中该经分离的核酸分子包含选自由SEQ ID NO:449-461组成的组的多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码人源化骆驼sdAb。



45. 如权利要求42所述的经分离的核酸分子,其中该核酸分子包含选自SEQ ID NO: 511-514组成的组的多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码人类scFv的VL或VH结构域。

46. 如权利要求42至45中任一项所述的经分离的核酸分子,其中该核酸分子进一步包含编码嵌合转换受体(CSR)或显性负性受体(DNR)的多核苷酸序列。

47. 如权利要求42至45中任一项所述的经分离的核酸分子,其中该核酸分子进一步包含编码PD-1显性负性受体(PD-1DNR)、PD-1嵌合转换受体(PD-1CSR)或TGF- $\beta$ 显性负性受体(TGF- $\beta$ DNR)的多核苷酸序列。

48. 如权利要求47所述的经分离的核酸分子,其中该PD-1DNR包含与SEQ ID NO:523具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列;该PD-1CSR包含与SEQ ID NO:524具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

49. 如权利要求47所述的经分离的核酸分子,其中该TGF- $\beta$ DNR包含与SEQ ID NO:529具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

50. 如权利要求46至49中任一项所述的经分离的核酸分子,其中编码该PD-1DNR、该PD-1CSR或该TGF- $\beta$ DNR的多核苷酸序列通过编码2A自裂解肽的多核苷酸序列连接至编码该CAR的多核苷酸序列。

51. 如权利要求50所述的经分离的核酸分子,其中该2A自裂解肽为T2A或P2A肽。

52. 如权利要求46至51中任一项所述的经分离的核酸分子,其中该核酸分子在5'至3'方向上包含编码该CAR的多核苷酸序列、编码该2A自裂解肽的多核苷酸序列以及编码该PD-1DNR、该PD-1CSR或该TGF- $\beta$ DNR的多核苷酸序列。

53. 如权利要求46至52中任一项所述的经分离的核酸分子,其中该核酸分子编码与SEQ ID NO:521或522具有至少约95%序列同一性的肽,或该核酸分子编码与选自SEQ ID NO: 525-528组成的组的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的肽。

54. 一种表达载体,该表达载体包含如权利要求42至53中任一项所述的经分离的核酸分子。

55. 一种经工程改造的免疫细胞,该经工程改造的免疫细胞包含如权利要求42至53中任一项所述的经分离的核酸分子或如权利要求54所述的表达载体。

56. 如权利要求55所述的经工程改造的免疫细胞,其中该经工程改造的免疫细胞选自以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞及自然杀伤细胞。

57. 一种经工程改造的免疫细胞,该经工程改造的免疫细胞表达如权利要求1至25中任一项所述的CAR。

58. 如权利要求57所述的经工程改造的免疫细胞,其中该经工程改造的免疫细胞还表达CSR或DNR。

59. 如权利要求58所述的经工程改造的免疫细胞,其中该CSR为PD-1CSR,该DNR为PD-1DNR或TGF- $\beta$ DNR。

60. 如权利要求59所述的经工程改造的免疫细胞,其中该PD-1DNR包含与SEQ ID NO: 523具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列;该PD-1CSR包含与SEQ ID NO:524具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

61. 如权利要求59所述的经工程改造的免疫细胞,其中该TGF- $\beta$ DNR包含与SEQ ID NO:

529具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

62. 如权利要求58至61中任一项所述的经工程改造的免疫细胞,其中该CAR及该CSR、或该CAR及该DNR通过2A自裂解肽共表达。

63. 如权利要求62所述的经工程改造的免疫细胞,其中该2A自裂解肽为T2A或P2A肽。

64. 如权利要求57至63中任一项所述的经工程改造的免疫细胞,其中该经工程改造的免疫细胞表达该CAR及该PD-1CSR。

65. 如权利要求57至63中任一项所述的经工程改造的免疫细胞,其中该经工程改造的免疫细胞表达该CAR及该TGF- $\beta$ DNR,且在TGF- $\beta$ 存在下经表达DLL3的细胞刺激。

66. 如权利要求57至65中任一项所述的经工程改造的免疫细胞,其中该经工程改造的免疫细胞选自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤T细胞、 $\gamma$   $\delta$ T细胞、NKT细胞及自然杀伤细胞。

67. 一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1至25中任一项所述的CAR、如权利要求26至35或权利要求36至41中任一项所述的DLL3结合蛋白、如权利要求54所述的表达载体或如权利要求55至66中任一项所述的经工程改造的免疫细胞,及生理学上可接受的赋形剂。

68. 如权利要求55至66中任一项所述的经工程改造的免疫细胞或如权利要求67所述的一种药物组合物在制备治疗DLL3相关病症的药物中的应用,其包括向该受试者施用如权利要求55至66中任一项所述的经工程改造的免疫细胞或如权利要求67所述的药物组合物。

69. 如权利要求68所述的应用,其中该DLL3相关病症为选自由以下组成的组的癌症:肺癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病及淋巴瘤。

70. 如权利要求68所述的应用,其中该DLL3相关病症为小细胞肺癌。

71. 如权利要求68至70中任一项所述的应用,其中该癌症表达DLL3及PD-L1。

72. 如权利要求68至71中任一项所述的应用,其中该癌症与对应正常组织相比具有较高TGF- $\beta$ 表达水平。

73. 如权利要求1至25中任一项所述的CAR、如权利要求26至35或权利要求36至41中任一项所述的DLL3结合蛋白、如权利要求54所述的表达载体或如权利要求55至66中任一项所述的经工程改造的免疫细胞用于制备用以治疗DLL3相关病症的药物的应用。

74. 一种用于治疗DLL3相关病症的药物,该药物包含如权利要求1至25中任一项所述的CAR、如权利要求26至35或权利要求36至41中任一项所述的DLL3结合蛋白、如权利要求54所述的表达载体或如权利要求55至66中任一项所述的经工程改造的免疫细胞。

## 一种抗DLL3嵌合抗原受体及其用途

[0001] 本发明是申请号为202080047990.8的母案的分案申请,该母案的申请日为2020年7月17日,发明名称为“抗DLL3嵌合抗原受体及其用途”。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及靶向DLL3的嵌合抗原受体(CAR)及对DLL3具有特异性的结合蛋白。本发明还涉及编码这些CAR或这些结合蛋白的核酸序列、表达这些CAR的经修饰的免疫细胞以及其用于治疗DLL3相关病症的用途。

### 背景技术

[0003] 细胞免疫疗法的发展已提供一种有前景的治疗多种肿瘤的方法。一种这样的治疗涉及免疫细胞、特别是T细胞的基因工程化,以在细胞表面上表达嵌合抗原受体(CAR)。嵌合抗原受体是在通常型式下将单克隆抗体(mAb)的特异性与T细胞的效应功能相结合的蛋白质。一旦CAR在T细胞中表达,经CAR修饰的T细胞(CAR-T或CAR-T细胞)即可获得一些特性,诸如抗原特异性识别、抗肿瘤反应性及增殖,因此可充当“活药物”来根除所靶向的肿瘤细胞。原则上,这些CAR-T细胞可靶向任何抗原(例如细胞表面分子)。CAR-T细胞疗法可克服对自体抗原的耐受性,且提供一种不依赖于患者MHC状态的治疗。近来的试验使用经工程改造以表达靶向CD19的嵌合抗原受体的T细胞,已证明在白血病及淋巴瘤患者中具有显著临床反应。

[0004] CAR表达为跨膜蛋白,包括抗原特异性结合位点、跨膜区及信号传导胞内结构域(例如CD3 $\zeta$ 链)。抗原特异性结合位点通常为源自单克隆抗体的单链可变片段(scFv),由经柔性接头接合的重链及轻链组成。近来CAR构建体已合并来自CD28或4-1BB等共刺激分子的另外的胞内结构域以增强活体内T细胞存活率。还对CAR进行其他遗传修饰,例如添加细胞因子基因或避免肿瘤部位处免疫抑制机制的基因。

[0005] 已发现DLL3( $\delta$ 样配体3)蛋白在临床上与多种增生性病症相关,这些增生性病症包括展现神经内分泌特征的肿瘤,诸如小细胞肺癌(SCLC)。起源于神经内分泌祖细胞的SCLC大约占有所有肺癌的15%,且具有最低的5年存活率之一(存活率为6%)(Alvarado-Luna等人,2016,Transl Lung Cancer Res 5:26-38;Siegel等人,2017,CA Cancer J Clin 67:7-30)。这是因为其具有高度侵袭性,约三分之二的患者在诊断时患有转移性疾病,且为常规治疗(例如基于铂的化学疗法)极难医治的。

[0006] 需要改良的治疗SCLC及其他表达DLL3的癌症的治疗方法。

### 发明内容

[0007] 在一方面,本披露提供一种嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体靶向DLL3(抗DLL3 CAR)。抗DLL3 CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含或源自单域抗体(sdAb)或单链可变片段(scFv)。

[0008] 在一些实施例中,sdAb包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的

氨基酸序列的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0009] 在一些实施例中,sdAb包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3,或在CDR1、CDR2及CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的多肽变体。

[0010] 在一些实施例中,sdAb包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

[0011] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0012] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0013] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0014] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0015] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0016] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0017] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0018] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;或

[0019] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0020] 在一些实施例中,sdAb包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

[0021] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3;

[0022] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3;

[0023] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3;

[0024] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3;

[0025] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR 3;

[0026] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR 3;

[0027] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR 3;

[0028] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR 3;或

[0029] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR 3。

[0030] 在一些实施例中,sdAb为针对人类或恒河猴DLL3产生的骆驼sdAb。

[0031] 在一些实施例中,sdAb包含与SEQ ID NO:274-354中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施例中,sdAb通过CDR移植进行人源化。

[0033] 在一些实施例中,人源化sdAb包含与SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施例中,scFv包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:498或504中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:499或505中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:500或506中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:495或501中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:496或502中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:497或503中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0035] 在一些实施例中,该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:498中所示的CDR1、SEQ ID NO:499中所示的CDR2及SEQ ID NO:500中所示的CDR3,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:495中所示的CDR1、SEQ ID NO:496中所示的CDR2及SEQ ID NO:497中所示的CDR3;或该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:504中所示的CDR1、SEQ ID NO:505中所示的CDR2及SEQ ID NO:506中所示的CDR3,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:501中所示的CDR1、SEQ ID NO:502中所示的CDR2及SEQ ID NO:503中所示的CDR3。

[0036] 在一些实施例中,该scFv的VH结构域包含与SEQ ID NO:508中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv的VL结构域包含与SEQ ID NO:507中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列;或该scFv的VH结构域包含与

SEQ ID NO:510中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv的VL结构域包含与SEQ ID NO:509中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施例中,scFv自合成人类Fab噬菌体文库获得。

[0038] 在一些实施例中,DLL3为人类或恒河猴DLL3。

[0039] 在一些实施例中,抗DLL3 CAR自N末端至C末端包含信号肽、DLL3结合域、铰链域、跨膜域及细胞内信号传导域。

[0040] 在一些实施例中,细胞内信号传导域源自CD3 $\zeta$ 、FcR  $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d。

[0041] 在一些实施例中,细胞内信号传导域进一步包含细胞内共刺激序列。

[0042] 在一些实施例中,细胞内共刺激序列源自选自以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83配体及其组合。

[0043] 在一些实施例中,CAR包含与选自SEQ ID NO:476-484、SEQ ID NO:485-494或SEQ ID NO:515-516组成的组的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0044] 在一些实施例中,DLL3结合域包含彼此连接的两个sdAb。

[0045] 在一些实施例中,sdAb中的每一者独立地包含与SEQ ID NO:356或SEQ ID NO:366具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0046] 在一些实施例中,CAR包含与选自SEQ ID NO:518-520组成的组的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0047] 在一些实施例中,CAR包含SEQ ID NO:520的氨基酸序列。

[0048] 在另一方面,本披露提供DLL3结合蛋白,该DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的单域抗体(sdAb)部分,其中该sdAb部分包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0049] 在一些实施例中,sdAb部分包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3,或在CDR1、CDR2及CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的多肽变体。

[0050] 在一些实施例中,sdAb部分包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

[0051] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR 2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0052] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0053] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0054] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0055] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0056] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0057] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0058] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR 2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;或

[0059] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0060] 在一些实施例中,sdAb部分包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

[0061] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR 3;

[0062] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR 3;

[0063] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR 3;

[0064] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3;

[0065] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3;

[0066] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3;

[0067] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3;

[0068] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3;或

[0069] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的

CDR2;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3。

[0070] 在一些实施例中,sdAb部分为针对人类或恒河猴DLL3产生的骆驼sdAb。

[0071] 在一些实施例中,sdAb部分包含与SEQ ID NO:274-354中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0072] 在一些实施例中,sdAb部分通过CDR移植进行人源化。

[0073] 在一些实施例中,人源化sdAb包含与SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0074] 在一些实施例中,DLL3为人类或恒河猴DLL3。

[0075] 在另一方面,本披露提供一种DLL3结合蛋白,该DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的单链可变片段(scFv)部分,其中该scFv部分包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中该scFv部分的VH结构域包含SEQ ID NO:498或504中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:499或505中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:500或506中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体,且该scFv部分的VL结构域包含SEQ ID NO:495或501中所示的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体、SEQ ID NO:496或502中所示的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体以及SEQ ID NO:497或503中所示的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0076] 在一些实施例中,scFv部分包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中该scFv部分的VH结构域包含SEQ ID NO:498中所示的CDR1、SEQ ID NO:499中所示的CDR2及SEQ ID NO:500中所示的CDR3,且该scFv部分的VL结构域包含SEQ ID NO:495中所示的CDR1、SEQ ID NO:496中所示的CDR2及SEQ ID NO:497中所示的CDR3;或该scFv部分的VH结构域包含SEQ ID NO:504中所示的CDR1、SEQ ID NO:505中所示的CDR2及SEQ ID NO:506中所示的CDR3,且该scFv部分的VL结构域包含SEQ ID NO:501中所示的CDR1、SEQ ID NO:502中所示的CDR2及SEQ ID NO:503中所示的CDR3。

[0077] 在一些实施例中,该scFv部分的VH结构域包含与SEQ ID NO:508中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv部分的VL结构域包含与SEQ ID NO:507中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列;或该scFv部分的VH结构域包含与SEQ ID NO:510中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列,且该scFv部分的VL结构域包含与SEQ ID NO:509中所示的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0078] 在一些实施例中,scFv部分自合成人类Fab噬菌体文库获得。

[0079] 在一些实施例中,DLL3为人类或恒河猴DLL3。

[0080] 在另一方面,本披露提供一种经分离的核酸分子,该经分离的核酸分子编码如上所述的抗DLL3 CAR或DLL3结合蛋白。

[0081] 在一些实施例中,该经分离的核酸分子包含选自由SEQ ID NO:368-448组成的组的多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码骆驼单域抗体(sdAb)。

[0082] 在一些实施例中,该经分离的核酸分子包含选自由SEQ ID NO:449-461组成的组的多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码人源化骆驼sdAb。

[0083] 在一些实施例中,该核酸分子包含选自由SEQ ID NO:511-514组成的组的多核苷



酸序列,该多核苷酸序列编码人类scFv的VL或VH结构域。

[0084] 在一些实施例中,该核酸分子进一步包含编码嵌合转换受体(CSR)或显性负性受体(DNR)的多核苷酸序列。

[0085] 在一些实施例中,该核酸分子进一步包含编码PD-1显性负性受体(PD-1DNR)、PD-1嵌合转换受体(PD-1CSR)或TGF- $\beta$ 显性负性受体(TGF- $\beta$ DNR)的多核苷酸序列。

[0086] 在一些实施例中,PD-1DNR包含与SEQ ID NO:523具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0087] 在一些实施例中,PD-1CSR包含与SEQ ID NO:524具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0088] 在一些实施例中,TGF- $\beta$ DNR包含与SEQ ID NO:529具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0089] 在一些实施例中,编码PD-1DNR、PD-1CSR或TGF- $\beta$ DNR的多核苷酸序列通过编码2A自裂解肽的多核苷酸序列连接至编码CAR的多核苷酸序列。

[0090] 在一些实施例中,2A自裂解肽为T2A或P2A肽。

[0091] 在一些实施例中,核酸分子在5'至3'方向上包含编码CAR的多核苷酸序列、编码2A自裂解肽的多核苷酸序列以及编码PD-1DNR、PD-1CSR或TGF- $\beta$ DNR的多核苷酸序列。

[0092] 在一些实施例中,该核酸分子编码与SEQ ID NO:521或522具有至少约95%序列同一性的肽,或该核酸分子编码与选自SEQ ID NO:525-528组成的组的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性的肽。

[0093] 在另一方面,本披露提供一种表达载体,该表达载体包含如上所述的经分离的核酸分子。

[0094] 在另一方面,本披露提供一种经工程改造的免疫细胞,该经工程改造的免疫细胞包含如上所述的经分离的核酸分子。

[0095] 在一些实施例中,该经工程改造的免疫细胞选自以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤T细胞、 $\gamma$   $\delta$ T细胞、NKT细胞及自然杀伤细胞。

[0096] 在另一方面,本披露提供一种经工程改造的免疫细胞,该经工程改造的免疫细胞表达如上所述的抗DLL3 CAR。

[0097] 在一些实施例中,该经工程改造的免疫细胞还表达CSR或DNR。

[0098] 在一些实施例中,该CSR为PD-1CSR,该DNR为PD-1DNR或TGF- $\beta$ DNR。

[0099] 在一些实施例中,PD-1DNR包含与SEQ ID NO:523具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0100] 在一些实施例中,PD-1CSR包含与SEQ ID NO:524具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0101] 在一些实施例中,TGF- $\beta$ DNR包含与SEQ ID NO:529具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0102] 在一些实施例中,该CAR及该CSR、或该CAR及该DNR通过2A自裂解肽共表达。

[0103] 在一些实施例中,2A自裂解肽为T2A或P2A肽。

[0104] 在一些实施例中,该经工程改造的免疫细胞表达CAR及PD-1DNR,且经表达DLL3及PD-L1的细胞刺激。

[0105] 在一些实施例中,该经工程改造的免疫细胞表达CAR及PD-1CSR,且经表达DLL3及PD-L1的细胞刺激。

[0106] 在一些实施例中,该经工程改造的免疫细胞表达CAR及TGF- $\beta$ DNR,且在TGF- $\beta$ 存在下经表达DLL3的细胞刺激。

[0107] 在一些实施例中,该经工程改造的免疫细胞选自自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤T细胞、 $\gamma$   $\delta$ T细胞、NKT细胞及自然杀伤细胞。

[0108] 在另一方面,本披露提供一种药物组合物,该药物组合物包含如上所述的抗DLL3CAR、经分离的DLL3结合蛋白、表达载体或经工程改造的免疫细胞,以及生理学上可接受的赋形剂。

[0109] 在另一方面,本披露提供一种用于治疗受试者的DLL3相关病症的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如上所述的经工程改造的免疫细胞或治疗有效量的如上所述的药物组合物。

[0110] 在另一方面,本披露提供如上所述的抗DLL3 CAR、经分离的DLL3结合蛋白、表达载体或经工程改造的免疫细胞用于制备用以治疗DLL3相关病症的药物的用途。

[0111] 在另一方面,本披露提供一种用于治疗DLL3相关病症的药物,该药物包含如上所述的抗DLL3 CAR、DLL3结合蛋白、表达载体或经工程改造的免疫细胞。

[0112] 在一些实施例中,DLL3相关病症为选自自由以下组成的组的癌症:肺癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病及淋巴瘤。

[0113] 在一些实施例中,癌症表达DLL3及PD-L1。

[0114] 在一些实施例中,癌症与对应正常组织相比具有较高TGF- $\beta$ 表达水平。

[0115] 在一些实施例中,DLL3相关病症为小细胞肺癌。

## 附图说明

[0116] 图1显示基于V<sub>H</sub>的CAR构建体的示意图。可用于构建体中的序列在SEQ ID NO: 462-472、474及475中列出。

[0117] 图2显示表达包含多种骆驼抗DLL3 sdAb的示例性单特异性CAR的T细胞针对小细胞肺癌细胞系SHP-77的活体外细胞毒性测定的结果,E:T为2:1或5:1。CAR的结果以右侧显示的图例中的次序描绘。

[0118] 图3显示在与表达DLL3的肿瘤细胞系SHP-77共同培育之后表达包含多种骆驼抗DLL3 sdAb的示例性单特异性CAR的T细胞的细胞因子释放水平的结果。IFN- $\gamma$ 释放水平及TNF- $\alpha$ 释放水平(E:T为2:1或5:1)分别显示于图3A及图3B中。各图中,CAR的结果以右侧显示的图例中的次序描绘。

[0119] 图4显示在用小细胞肺癌细胞系SHP-77长期刺激之后,表达包含多种骆驼抗DLL3 sdAb的示例性单特异性CAR的T细胞的扩增倍数。

[0120] 图5显示在SHP-77肿瘤模型中表达具有骆驼抗DLL3 sdAb的CAR的CAR-T细胞的活体内抗肿瘤功效的结果。此模型中,各小鼠输注100万CAR-T细胞的剂量。

[0121] 图6显示表达包含多种人源化骆驼抗DLL3 sdAb的示例性单特异性CAR的T细胞针对小细胞肺癌细胞系SHP-77(图6A、6B)及NCI-H82(图6C、6D)的活体外细胞毒性测定的结果。

[0122] 图7显示在经SHP-77刺激之后表达包含多种人源化骆驼抗DLL3 sdAb的示例性单特异性CAR的T细胞的细胞因子释放水平的结果。IFN- $\gamma$  释放水平及TNF- $\alpha$ 释放水平(E:T为3:1或10:1)分别显示于图7A及图7B中。各图中,CAR的结果以右侧显示的图例中的次序描绘。

[0123] 图8显示在用小鼠肺癌细胞系SHP-77长期刺激之后,表达包含多种人源化骆驼抗DLL3 sdAb的示例性单特异性CAR的T细胞的扩增倍数。

[0124] 图9显示在SHP-77肿瘤模型中表达具有人源化骆驼抗DLL3 sdAb的CAR的CAR-T细胞的活体内抗肿瘤功效的结果。此模型中,各小鼠输注20万CAR-T细胞的剂量。图9A中比较9组的结果。各组中各小鼠的结果分别显示于图9B-9J中。

[0125] 图10显示串联CAR(图10A)及装甲的CAR构建体的示意图(图10B、10C)。

[0126] 图11显示通过量测短期细胞毒性(图11A-11E、11V)及细胞因子释放(图11F-11K、11W-11X)以及通过长期刺激测定(图11L-11U、11Y-11Z)对串联CAR-T细胞及单特异性CAR-T细胞活体外功能活性比较的结果。

[0127] 图12分别显示靶向PD-1DNR或PD-1CSR装甲的CAR-T细胞及T3的SHP-77细胞(图12A、12B)及SHP-77/PD-L1(图12C、12D)的活体外功能比较结果。

[0128] 图13显示TGF- $\beta$ -DNR增强DLL3 CAR-T细胞的活体外及活体内抗肿瘤功效。图13A显示TGF- $\beta$ -DNR装甲的CAR的示意图。图13B显示相应CAR-T细胞上CAR及TGF- $\beta$ -DNR的阳性比率。在短期(图13C、13D)及长期刺激测定(图13E-13G)中评估活体外抗肿瘤功效。图13H显示活体内抗肿瘤功效。图13I显示在治疗之后SHP77异种移植模型的外周血中CAR-T细胞的药物动力学。

## 具体实施方式

[0129] 除非另外定义,否则本文中使用的技术及科学术语具有与所属领域的普通技术人员通常所了解的含义相同的含义。与本文所述的方法、装置及材料类似或等同的任何方法、装置及材料可用于实施本发明。提供以下定义以帮助了解本文中常用的某些术语,且不意欲限制本披露的范畴。

[0130] 冠词“一个/种(a/an)”在本文中用以指一个或多于一个(即,至少一个)的该冠词的语法宾语。例如,“元件”意指一种元件或超过一种元件。

[0131] 如本文所用的,术语“结合蛋白”是指结合靶分子(例如,DLL3)的分子或分子的一部分。在一些实施例中,结合蛋白包含抗体。在一些实施例中,结合蛋白包含抗体的抗原结合片段。在一些实施例中,结合蛋白可进一步包含小分子量组分,诸如小分子药物或毒素。结合蛋白也可为抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,结合蛋白包含受体的配体结合域。在一些实施例中,结合蛋白包含跨膜受体的细胞外结构域。结合蛋白也可为受体的配体结合域,或跨膜受体的细胞外结构域。在一些实施例中,结合蛋白包含单域抗体(sdAb)或单链可变片段(scFv)。在一些实施例中,结合蛋白可为sdAb或scFv。DLL3结合蛋白可为DLL3结合域。在一些实施例中,DLL3结合蛋白包含结合DLL3的抗体或抗体的抗原结合片段。在一些实施例中,DLL3结合蛋白可为抗体或抗体的抗原结合片段。在一些实施例中,DLL3结合蛋白包含结合DLL3的单域抗体(sdAb)或单链可变片段(scFv)。在一些实施例中,DLL3结合蛋白可为sdAb或scFv。

[0132] 术语“抗体”泛指由四条多肽链-两条重(H)链及两条轻(L)链构成的任何免疫球蛋白(Ig)分子或其保持Ig分子的基本表位结合特征的任何功能片段。在全长抗体中,每条重链由重链可变区(本文中缩写为HCVR或VH)及重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2及CH3构成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为LCVR或VL)及轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。VH及VL区可进一步再分成高变区,称为互补决定区(CDR),中间散布更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH及VL由三个CDR及四个FR构成,从氨基端至羧基端按以下次序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可具有任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、类别(例如IgG 1、IgG2、IgG 3、IgG4、IgA1及IgA2)或子类。在广泛意义上,术语“抗体”进一步指不源自具有四条多肽链的免疫球蛋白分子的scFv或sdAb。

[0133] 抗体片段为抗体的一部分,例如F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv、scFv、sdAb及其类似物。全长抗体的功能片段保持全长抗体的靶特异性。因此诸如scFv(单链可变链片段)的重组功能抗体片段已用于研发作为基于mAb的治疗剂的替代物的治疗剂。scFv片段(约25kDa)由两个可变域VH及VL组成。天然地,VH及VL结构域经由疏水性相互作用非共价缔合,且往往解离。然而,稳定片段可通过用亲水性柔性接头将这些结构域连接,建立scFv来工程改造。

[0134] 如本文所用,术语“单域抗体”(sdAb)具有其在所属领域中的通用含义,且是指在骆驼科哺乳动物中可发现的类型的抗体的单个重链可变域,且天然缺乏轻链。这种单域抗体也称为V<sub>H</sub>或“奈米抗体(Nanobody)”。可认为单域抗体的氨基酸序列及结构由四个框架区(FR1、FR2、FR3及FR4)及三个互补决定区(CDR1、CDR2及CDR3)构成。因此,单域抗体可定义为具有以下通用结构的氨基酸序列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其类似于可变域VH或VL。sdAb用作单抗原结合蛋白或用作较大蛋白质或多肽中的抗原结合域提供许多显著优于使用常规抗体或抗体片段(例如scFv)的优势。sdAb的优点包括:仅仅要求单个结构域以高亲和力及高选择性结合抗原;面对变性剂或包括热、pH值及蛋白酶在内的条件,sdAb高度稳定;且sdAb可接近常规抗体无法接近的靶及表位。虽然典型地在骆驼科(诸如美洲驼)中产生sdAb,但也可使用所属领域中熟知的技术以合成方式产生。

[0135] 如本文所用,术语“人源化sdAb”意指在天然存在的V<sub>H</sub>序列的氨基酸序列中的一或多个氨基酸残基经在来自人类的常规4链抗体的VH结构域中的对应位置处存在的一或多个氨基酸残基置换的sdAb。这可通过所属领域中熟知的方法进行。举例而言,sdAb的FR可经人类可变FR置换。因此人源化sdAb在施用人体时具有较小抗原性。

[0136] 如本文所用,术语“仅重链抗体”或“HCAb”是指包含重链,但缺乏通常在4链抗体中发现的轻链的功能抗体。已知骆驼科动物(诸如骆驼、美洲驼或羊驼)产生HCAb。

[0137] “DLL3”又名“δ样配体3”,为参与Notch信号传导路径的跨膜蛋白。Notch信号传导路径首次是在秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)及果蝇(*Drosophila*)中鉴别,随后证明自无脊椎动物至脊椎动物进化保守,参与一系列基本生物过程,包括正常胚胎发育、成人组织体内平衡及干细胞维持。在果蝇中,Notch信号传导主要由一种Notch受体基因及被称为Serrate及Delta的两种配体基因介导(Wharton等人,1985;Rebay等人,1991)。人类中,存在四种已知的Notch受体及五种DSL(Delta-Serrate LAG2)配体,即Serrate的两种同源物,称为Jagged1及Jagged 2,以及Delta的三种同源物,称为δ样配体或DLL1、DLL3及DLL4。人类中,DLL3基因位于染色体19q13上,且由跨越9.5kb的8个外显子组成。在最后一个外显子内的选

择性剪接产生两种蛋白质同种型。两者在其细胞外结构域及其跨膜域上共享整体100%同一性,不同之处在于较长同种型含有延长的胞内尾。

[0138] 如本文所用,术语“特异性地结合”或“特异性结合”或其任何同义词是指如通过标准活体外测定所测定,单域抗体(sdAb)等多肽能够特异性地识别及可检测地结合于DLL3分子。举例而言,如本文所用,结合是使用充分描述的抗原-抗体结合测定、流式细胞术及所属领域的技术人员已知的其他测定通过本发明的抗DLL3多肽识别细胞表面上的DLL3分子的能力来量测。

[0139] 如本文所用,术语“表达载体”为重组或合成产生的核酸构建体或序列,具有允许另一核酸在宿主细胞中转录和/或表达的特定核酸元件。表达载体可为质粒、病毒或核酸片段的一部分。在一个实例中,表达载体为DNA载体,例如质粒,其包含至少一个启动子序列及至少一个终止子序列(例如多腺苷酸化序列)以及任选地一个或多个复制起点(ori)序列及任选地选择或可选择标记物序列。任选地,表达载体可进一步包含至少一个所关注的核苷酸编码序列,该核苷酸编码序列编码至少一种多肽,其中至少一个启动子序列与该至少一个编码序列可操作地连接。术语“表达”包括多肽产生中所涉及的任何步骤,包括(但不限于)转录、转录后修饰、转译、转译后修饰和/或分泌。

[0140] 术语“分离”是指物质实质上或基本上不含在其天然状态下通常伴随其的组分。物质可为细胞或大分子,例如蛋白质或核酸。举例而言,如本文所用,“经分离的核酸”是指已自在天然存在状态下位于侧面的序列纯化的多核苷酸,例如已自通常相邻的序列移除的DNA片段。可替代地,如本文所用,“经分离的抗体”或“经分离的多肽”及其类似物是指抗体或多肽分子自其天然细胞环境及与细胞的其他组分的缔合中进行活体外分离和/或纯化。

[0141] 非人类(例如骆驼科)抗体的“人源化”形式为含有来源于非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一些实施例中,人源化抗体是人类免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者高变区(HVR)的残基经来自具有期望的特异性、亲和力和/或能力的小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物等非人类物种(供体抗体)HVR的残基置换。在一些情况下,人类免疫球蛋白的框架区(“FR”)残基经对应的非人类残基置换。此外,人源化抗体可包含未在接受者抗体中或供体抗体中发现的残基。可进行这些修饰以进一步改进抗体性能,例如结合亲和力。一般而言,人源化抗体将包含至少一个及典型地两种可变域的基本上全部,其中高变环的全部或基本上全部与非人类免疫球蛋白序列的高变环对应,且FR区的全部或基本上全部为人类免疫球蛋白序列的FR区,不过FR区可包括一或多个提高结合亲和力、异构化、免疫原性等抗体性能的单独FR残基取代。FR中这些氨基酸取代的数目典型地在H链中至多6个,且在L链中至多3个。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc),典型地人类免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。关于进一步细节,参见例如Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见例如Vaswani及Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle及Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);以及美国专利第6,982,321号及第7,087,409号。

[0142] 关于肽、多肽或抗体序列的“序列同一性”及“同源性”定义为在比对序列及必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比后且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部

分下,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可根据所属领域技能内的多种方式,使用公众可获得的计算器软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件,实现比对,以确定氨基酸序列同一性百分比。所属领域技术人员可确定用于量测比对的适当参数,包括实现所比较的全长序列上的最大比对所需的任何算法。

[0143] 解离常数( $K_D$ 或 $K_d$ )用作展示抗体对抗原的亲合力的指标。举例而言,通过Scatchard方法使用用多种标记试剂标记的抗体,以及通过使用非处方量测试剂盒BiacoreX(Amersham Biosciences制造)或类似试剂盒,根据与试剂盒连接的使用者手册及实验操作方法容易分析。可使用这些方法获得的 $K_D$ 值以单位M(Mo1)表示。

[0144] 如本文所用,“嵌合转换受体(CSR)”是指一种受体,建立所述受体以逆转其原始信号传导路径的结果,以赋予免疫细胞(例如CAR T细胞)所期望的活性,诸如能够克服免疫抑制肿瘤微环境及允许其具有更大活体内持久性。在一些实施例中,CSR可利用由癌细胞表达的抑制分子来进一步刺激CAR T细胞。在非限制性实例中,CAR T细胞可经工程改造以表达由人类抑制受体程序化细胞死亡蛋白1(PD-1)的细胞外配体结合域与CD28的跨膜及胞内共刺激信号传导域融合所构成的CSR。当CAR T细胞施用于患有表达DLL3及程序化细胞死亡配体1(PD-L1)的癌症的受试者时,所表达的CAR可结合于DLL3且所表达的转换受体可结合于PD-L1。PD-1/CD28嵌合转换受体融合蛋白的性质阻止正常PD1/PD-L1介导的T细胞抑制,代之以促进经由CD28域的信号传导,这引起对CAR T细胞的刺激。因此,PD-1的跨膜及胞内结构域用CD28的跨膜及胞内结构域替换将PD-L1转化成CAR T细胞的共刺激配体。这将诱发增强的针对表达PD-L1的癌细胞的毒性。在其他实施例中,CSR还可用于抑制CAR T细胞对非预期靶细胞的作用。

[0145] 如本文所用,“显性负性受体(DNR)”是指能够结合配体但不会诱发细胞内的信号传导级联的受体。DNR通常具有完整配体结合区,但缺少胞内酶催化区。其可为全长受体的突变形式或受体的截短形式。在CAR T细胞免疫疗法后,一些癌症、尤其是实体癌可能使结合于CAR T细胞上的抑制受体的抑制配体上调。此适应性抗性使嵌合CAR T细胞疗法的功效打折。已知一些癌症、特别是实体癌分泌转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ ),建立免疫抑制环境。已知TGF- $\beta$ 诱发或促进转移且有效抑制免疫系统。因此,在一些实施例中,使用TGF- $\beta$ 受体TGFBR11的截短型式作为TGF- $\beta$ DNR以提高本文披露的CAR T细胞的抗肿瘤性能。在一些实施例中,通过使用2A自裂解肽使CAR及TGF- $\beta$ DNR在T细胞表面上共表达。在一些实施例中,通过使用两种表达载体使CAR及TGF- $\beta$ DNR在T细胞表面上分开表达。发现TGF- $\beta$ DNR在引入本文披露的抗DLL3 CAR T细胞中时,能够增强CAR T细胞针对一些DLL3阳性癌细胞、例如SCLC细胞的细胞毒性。类似地,在一些实施例中,使用PD-1受体的截短型式作为PD-1DNR以提高本文披露的CAR T细胞的抗肿瘤性能。

[0146] 如本文所用,“治疗(treatment或treating)”包括对疾病或病理性疾患的症状或病理的任何有益或合乎需要的作用,且可包括甚至例如癌症、自体免疫性疾病、免疫病症等所治疗的疾病或疾患之一或多个可量测标记物最低程度的减少。治疗可任选地涉及延迟疾病或疾患的进展。“治疗”不一定指示完全根除或医治疾病或疾患或其相关症状。

[0147] 本发明的一些方面是指一种DLL3结合蛋白,该DLL3结合蛋白对人类或恒河猴DLL3蛋白具有结合特异性。

[0148] 在一些实施例中,DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的单域抗体(“sdAb”)部分,其中该sdAb部分包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0149] 在一些实施例中,sdAb包含多肽,该多肽包含:包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3,或在CDR区中包含至多约3个氨基酸取代的多肽变体。在一些实施例中,抗DLL3抗体为或包含单域抗体(sdAb),该抗体是在用人类或恒河猴DLL3蛋白免疫接种后自骆驼产生。在一些实施例中,sdAb包含如表1的每行中所列出的CDR组(即CDR1、CDR2及CDR3的组合)。

[0150] 在一些实施例中,sdAb包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

[0151] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR 2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0152] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0153] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0154] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0155] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0156] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0157] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0158] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR 2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;或

[0159] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及

包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR 3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0160] 在一些实施例中,sdAb包含多肽,该多肽包含以下中的任一种:

[0161] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR 3;

[0162] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR 3;

[0163] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR 3;

[0164] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3;

[0165] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3;

[0166] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3;

[0167] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3;

[0168] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3;或

[0169] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3。

[0170] 在一些实施例中,sdAb包含与SEQ ID NO:274-354中的任一者的氨基酸序列具有至少约95% (例如约96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:274-354中的任一者的氨基酸序列。在其他实施例中,sdAb进行人源化,且包含与SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列具有至少约95% (例如约96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列。人源化抗体可使用所属领域中已知的多种技术产生,这些技术包括但不限于CDR移植(参见例如美国专利第5,225,539号、第5,530,101号及第5,585,089号)、饰面(veneering)或者表面重构(resurfacing)(参见例如欧洲专利第EP 592,106号及第P519,596号)及链改组(参见例如美国专利第5,565,332号)。一般地,在人源化期间,受体抗体(例如人类抗体)的CDR残基替换为供体抗体(例如啮齿动物抗体)的CDR残基,以保持抗原结合特异性,同时将活体内免疫原性减至最少。经常,框架区中的框架残基也用来自供体抗体的对应残基取代,以改变,例如提高抗原结合。通过所属领域熟知的方法,例如通过建模CDR与框架残基的相互作用鉴别对于抗原结合而言重要的框架残基且进行序列比较以鉴别特定位置处的不寻常框架残基,来鉴别这些框架取代,例如保守取代(参见例如Queen等人,美国专利第5,585,089号;及Riechmann等人,1988,Nature,332:323)。

[0171] 在一些情况下,sdAb可与人类IgG铰链片段及Fc片段融合,形成重链抗体(HCAb)。在一些情况下,sdAb可与对除DLL3以外的抗原具有特异性的另一sdAb或scFv融合,形成双特异性抗体。在一些情况下,sdAb可与对除DLL3以外的抗原具有特异性的两种或更多种



sdAb或scFv融合,形成多特异性抗体。在其他情况下,sdAb可进行化学修饰以携带药物分子。因此,抗DLL3 sdAb可在活体内用于将药物分子引导至表达DLL3的细胞。

[0172] 在一些实施例中,DLL3结合蛋白为或包含特异性地结合DLL3的单链可变片段(scFv)。在一些情况下,通过重复数轮的噬菌体淘选自合成的人类Fab或scFv噬菌体文库分离scFv,其中每轮淘选涉及结合、移除非特异性噬菌体以及洗脱及扩增所结合的噬菌体以进行下一轮过程。在一些实施例中,DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的scFv部分,其中该scFv包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:498或504中所示的CDR1、SEQ ID NO:499或505中所示的CDR2以及SEQ ID NO:500或506中所示的CDR3,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:495或501中所示的CDR1、SEQ ID NO:496或502中所示的CDR2以及SEQ ID NO:497或503中所示的CDR3。在一些实施例中,DLL3结合蛋白包含特异性地结合于DLL3的scFv部分,其中该scFv包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:498中所示的CDR1、SEQ ID NO:499中所示的CDR2以及SEQ ID NO:500中所示的CDR3,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:495中所示的CDR1、SEQ ID NO:496中所示的CDR2以及SEQ ID NO:497中所示的CDR3;或该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:504中所示的CDR1、SEQ ID NO:505中所示的CDR2以及SEQ ID NO:506中所示的CDR3,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:501中所示的CDR1、SEQ ID NO:502中所示的CDR2以及SEQ ID NO:503中所示的CDR3。

[0173] 在一些情况下,scFv可与对除DLL3以外的抗原具有特异性的另一sdAb或scFv融合,形成双特异性抗体。在一些情况下,scFv可与对除DLL3以外的抗原具有特异性的两种或更多种sdAb或scFv融合,形成多特异性抗体。在其他情况下,scFv可进行化学修饰以携带药物分子。因此,抗DLL3 scFv可在活体内用于将药物分子引导至表达DLL3的细胞。

[0174] 本发明的一些方面是关于包含DLL3结合域的CAR或CAR-T细胞(抗DLL3 CAR或抗DLL3 CAR-T细胞)。

[0175] 本发明的CAR包含细胞外结构域、跨膜结构域及细胞内结构域。在一些实施例中,CAR还包括在N末端的信号肽及介于细胞外结构域与跨膜域之间的铰链区。细胞外结构域包括靶特异性结合元件(也称为抗原识别域或抗原结合域)。细胞内结构域或胞内结构域经常包括一或多个共刺激信号传导域及CD3 $\zeta$ 链部分。共刺激信号传导域是指包括共刺激分子的细胞内结构域在内的CAR的一部分。

[0176] 通过CAR分子识别抗原或靶向抗原最常涉及抗体或抗体片段的使用。根据本发明,抗原结合域为特异性地结合于DLL3的抗体或抗体片段。较佳地,本发明的CAR的抗原结合域为如上所提及的抗DLL3 scFv或sdAb。

[0177] 跨膜域可源自天然或合成来源。在来源为天然的情况下,结构域可源自任何膜结合或跨膜蛋白。本发明中具体使用的跨膜区可源自以下(即至少包含以下的一个或多个跨膜区):例如T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\xi$ 链,CD8 $\alpha$ 链。

[0178] 本发明的CAR的细胞内信号传导域引起免疫细胞的至少一种正常效应功能的活化。术语“效应功能”是指细胞的专门功能。T细胞的效应功能例如可为细胞溶解活性,或辅助活性,包括分泌细胞因子。因此,术语“细胞内结构域”是指转导效应功能信号且指导细胞进行专门功能的蛋白质部分。虽然通常可采用整个胞内结构域,但多数情况下不需要使用整条链。在使用胞内结构域的截短部分的程度上,此类截短部分可代替完整链使用,只要其

转导效应功能信号即可。因此术语胞内结构域意欲包括足够转导效应功能信号的胞内结构域的任何截短部分。用于本发明CAR中的胞内结构域的较佳实例包括协调一致以在抗原受体接合后开始信号转导的T细胞受体 (TCR) 及共受体的胞内序列,以及这些序列的任何衍生物或变体及具有相同功能能力的任何合成序列。在一些实施例中,胞内信号传导域源自CD3 $\zeta$ 、FcR  $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d。

[0179] 常常,单单通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞。因此,使用第二或共刺激信号。因此,据说T细胞活化由两类不同胞内信号传导序列介导:通过TCR开始抗原依赖性初级活化的信号传导序列(初级胞内信号传导序列)及以非抗原相关性方式作用以提供第二或共刺激信号的信号传导序列(第二胞内信号传导序列)。共刺激信号传导序列是指包括共刺激分子的胞内结构域在内的CAR的一部分。共刺激分子为淋巴细胞对抗原的高效反应所需的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。这样的分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83配体及其组合。

[0180] 介于CAR的胞外结构域与跨膜域之间的铰链区一般意指多肽链中用于将跨膜域连接至胞外结构域的任何寡肽或多肽。铰链区可为至多300个氨基酸,较佳2至100个氨基酸且最佳2至10个氨基酸。

[0181] 除抗原结合域、跨膜域、胞内结构域及铰链区外,本发明的CAR还可包括连接至CAR的N末端的信号肽序列。信号肽序列存在于许多分泌蛋白及膜蛋白的N末端,且典型地具有15至30个氨基酸的长度。因为许多上述提及的蛋白质分子具有信号肽序列,所以这些信号肽可以用作本发明CAR的信号肽。

[0182] 在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含或源自单域抗体(sdAb)或单链可变片段(scFv)。

[0183] 在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含或源自单域抗体(sdAb),其中该sdAb包括包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1或其在该CDR1中包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2或其在该CDR2中包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3或其在该CDR3中包含至多约3个氨基酸取代的变体。在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含或源自单域抗体(sdAb),其中该sdAb包括包含SEQ ID NO:1-81中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:82-162中的任一者的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:163-243中的任一者的氨基酸序列的CDR3。

[0184] 在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包括包含以下中的任一者的sdAb:

[0185] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0186] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及

包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0187] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0188] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0189] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0190] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0191] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0192] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;

[0193] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR2,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR3,或其包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0194] 在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包括包含以下中的任一种的sdAb:

[0195] (1) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的CDR3;

[0196] (2) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的CDR3;

[0197] (3) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的CDR3;

[0198] (4) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的CDR3;

[0199] (5) 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR 3;

[0200] (6) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的CDR 3;

[0201] (7) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDR2;以及包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的CDR 3;

[0202] (8) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的

CDR2;以及包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的CDR 3;或

[0203] (9) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR 2;以及包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的CDR 3。

[0204] 在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含骆驼sdAb,其中该sdAb包含与SEQ ID NO:274-354中的任一者的氨基酸序列具有至少约95% (例如96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包括包含SEQ ID NO:274-354中的任一个的氨基酸的骆驼sdAb。在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含人源化sdAb,其中该sdAb包含与SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列具有至少约95% (例如96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含人源化sdAb,该人源化sdAb包含SEQ ID NO:355-367中的任一者的氨基酸序列。

[0205] 在一些实施例中,CAR包含DLL3结合域,其中该DLL3结合域包含或源自单链可变片段(scFv),其中该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:498中所示的CDR1、SEQ ID NO:499中所示的CDR2以及SEQ ID NO:500中所示的CDR3,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:495中所示的CDR1、SEQ ID NO:496中所示的CDR2以及SEQ ID NO:497中所示的CDR3;或该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:504中所示的CDR1、SEQ ID NO:505中所示的CDR2以及SEQ ID NO:506中所示的CDR3,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:501中所示的CDR1、SEQ ID NO:502中所示的CDR2以及SEQ ID NO:503中所示的CDR3。在一些实施例中,该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:508中所示的氨基酸序列,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:507中所示的氨基酸序列;或该scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:510中所示的氨基酸序列,且该scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:509中所示的氨基酸序列。

[0206] 在一些实施例中,本发明的CAR包含本文中提供为DLL3结合域的骆驼sdAb且包含与SEQ ID NO:476-484中的任一者的氨基酸序列具有至少约95% (例如96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的CAR包含本文中提供为DLL3结合域的骆驼sdAb且具有选自由SEQ ID NO:476-484组成的组的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的CAR包含本文中提供为DLL3结合域的人源化sdAb且包含与SEQ ID NO:485-494中的任一者的氨基酸序列具有至少约95% (例如96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。在其他实施例中,本发明的CAR包含本文中提供为DLL3结合域的人源化sdAb且具有选自由SEQ ID NO:485-494组成的组的氨基酸序列。

[0207] 在一些实施例中,本发明的CAR包含本文中提供为DLL3结合域的人类scFv且包含与SEQ ID NO:515-516中的任一者的氨基酸序列具有至少约95% (例如96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的CAR包含本文中提供为DLL3结合域的人类scFv且具有选自由SEQ ID NO:515-516组成的组的氨基酸序列。

[0208] 在一些实施例中,本发明的CAR自N末端至C末端包含信号肽、DLL3结合域、铰链区、跨膜域以及胞内信号传导域。在具体实施例中,本发明的CAR自N末端至C末端包含如SEQ ID NO:465中所示的CD8 $\alpha$ 信号肽、DLL3结合域、如SEQ ID NO:466中所示的CD8 $\alpha$ 铰链域、如SEQ ID NO:467中所示的CD8 $\alpha$ 跨膜域、如SEQ ID NO:468中所示的CD137胞内结构域、如SEQ ID NO:469中所示的CD28胞内结构域及如SEQ ID NO:470中所示的CD3 $\zeta$ 胞内结构域。

[0209] 本发明的一些方面涉及一种经分离的核酸分子,该经分离的核酸分子编码本发明

的sdAb、scFv或CAR。在一些实施例中,核酸分子编码骆驼sdAb且包含选自SEQ ID NO: 368-448组成的组的多核苷酸序列。在一些实施例中,核酸分子编码人源化sdAb且包含选自SEQ ID NO:449-461组成的组的多核苷酸序列。在一些实施例中,核酸分子编码scFv的VH及VL结构域,其中VH结构域编码序列包含SEQ ID NO:512或514的多核苷酸序列,VL结构域编码序列包含SEQ ID NO:511或513的多核苷酸序列。

[0210] 本发明的一些方面涉及一种经工程改造的免疫细胞,该经工程改造的免疫细胞包含上述提供的任一种CAR、上述任一种经分离的核酸或上述任一种载体。在一些实施例中,经工程改造的免疫细胞为细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞及自然杀伤细胞。在一些实施例中,细胞包含携带本发明的经分离的核酸分子的表达载体。用表达载体对细胞进行基因修饰以表达由核酸分子的一部分编码的多肽为所属领域中熟知的一项遗传技术。

[0211] 本发明的一些方面涉及本发明的DLL3结合蛋白、抗DLL3 CAR、核酸分子或CAR-T细胞。在一些实施例中,本发明的CAR-T细胞用生理学上可接受的赋形剂调配成药物组合物。如本文所用,“生理学上可接受的赋形剂”包括不限于对于在人类或家畜中使用可接受的任何助剂、载体、稀释剂、防腐剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等张剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。在一些实施例中,本发明的CAR-T细胞或包含该CAR-T细胞的药物组合物用于治疗受试者的DLL3相关病症。因此,提供一种用于治疗DLL3相关病症的方法,该方法包括向罹患DLL3相关病症的受试者施用治疗有效量的本发明的CAR-T细胞或药物组合物。抗体、CAR-T细胞或药物组合物的“治疗有效量”可根据受试者(例如患者)的疾病状况、年龄、性别及重量等因素变化。术语“治疗有效量”可包括有效“治疗”受试者的量。当指示治疗剂量时,在具体实施例中考虑的待施用的精确量可由医师考虑受试者的状况确定。在一些实施例中,DLL3相关病症为表达DLL3作为细胞表面蛋白的癌症,例如黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病及淋巴瘤。较佳地,DLL3相关病症为肺癌,尤其是小细胞肺癌(SCLC)。

[0212] 实例

[0213] 本文所述的实例不意欲表示以下实验均进行或只进行这些实验。努力确保关于所用数字(例如量、温度等)的准确性,但应考虑一些实验误差及偏差。除非另外指示,否则份为重量份,分子量为重量平均分子量,温度为摄氏度,且压力为大气压或接近大气压。

[0214] 实例1. 动物免疫及抗体文库构建

[0215] 本实例证明,免疫骆驼显示对人类或恒河猴DLL3蛋白具有良好的免疫反应且所获得的免疫文库显示优良质量。

[0216] 动物免疫

[0217] 将包含具有N末端FLAG标签的人类DLL3蛋白(AdipoGen, AG-40B-0151)的细胞外结构域(aa27-466)或/及表达DLL3的质粒或表达DLL3的细胞(CHO-K1/DLL3和/或CHO-K1/EGF4)的免疫原与助剂或PBS混合且注入骆驼中。典型地,骆驼进行免疫2-4次,时间间隔为1周至2周。在多轮免疫后,通过用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)及流式细胞术测定进行血清滴定来评定针对靶抗原DLL3的免疫反应。

[0218] 噬菌体展示文库构建

[0219] 使用TRIZOL®试剂,根据制造商的方案,自免疫骆驼的淋巴细胞提取全部RNA。

cDNA是基于RNA模板,利用寡(dT) 20引物,使用PRIMESCRIPT™第一链cDNA合成试剂盒,根据制造商的方案来合成。自骆驼cDNA扩增 $V_H$ H,以产生 $V_H$ H噬菌体文库。

#### [0220] 实例2.抗DLL3抗体的产生

[0221] 本文提供的抗DLL3抗体包括自免疫骆驼或自合成人类Fab文库分离的人类Fab产生的单域抗体(sdAb)。

#### [0222] 噬菌体展示

[0223] 噬菌体展示文库是用通过免疫(包含具有N末端FLAG标签的人类DLL3蛋白(AdipoGen,AG-40B-0151)的细胞外结构域(aa27-466)或/及表达DLL3的质粒或表达DLL3的细胞(CHO-K1/DLL3或/及CHO-K1/EGF4)的免疫原)获得的sdAb构建。合成另一人类Fab噬菌体展示文库。拯救两个噬菌体文库且在过滤杀菌后储存在4°C下以供进一步使用。使用基于蛋白质的淘选以及基于细胞的淘选,利用上述提及的两种噬菌体文库分离结合的噬菌体。使用两个文库,针对基于蛋白质及基于细胞的淘选方法进行至少一轮淘选,直至DLL3特异性噬菌体克隆的百分比达到30%。评定每轮输出噬菌体的总输出克隆的数目,通过ELISA评定DLL3阳性克隆的百分比,及DLL3特异性克隆的序列多样性。基于这些结果,选择最佳淘选输出进行高通量筛选。

#### [0224] 高通量筛选

[0225] 将选择的输出噬菌体用于感染指数生长的大肠杆菌细胞。提取输出噬菌体的双链DNA。自噬菌粒载体上切割sdAb/Fab插入物,且插入抗体片段表达载体中以供高通量筛选。使用所得质粒转化指数生长的大肠杆菌细胞,随后将这些细胞接种并在37°C生长过夜。逐一挑选数千个菌落且在含有1mL 2×YT培养基的96深孔板中生长。添加1mM IPTG来诱导抗体片段的表达。

[0226] 通过ELISA,分析上清液中的sdAb/Fab蛋白结合DLL3 ECD蛋白的能力,以及通过FACS,分析结合表达DLL3的SHP-77细胞系(美国典型培养物保藏中心(ATCC)®CRL-2195™)及CHO-K1/人类DLL3(内部产生)的能力。测序所有结合物。移除冗余序列。总共获得同时结合人类及恒河猴DLL3蛋白及细胞系的81个骆驼sdAb及2个人类Fab结合剂。所有这些结合剂均具有独特的序列。

[0227] 在BIAcore T200仪(通用电气医疗集团(GE Healthcare))上通过表面等离子共振(SPR)来对这些独特的结合物中的一些进行进一步表征。实验如下进行:通过亲和力标签将粗sdAb/Fab蛋白质捕捉至传感器芯片上。高浓度(100nM)人类DLL3流过传感器芯片表面,且使其结合抗体片段300秒,接着注射运行缓冲液,以使所形成的复合物解离。基于一个缔合及解离曲线大致计算缔合速率( $k_a$ )及解离速率( $k_d$ ),且用于估计平衡解离常数( $K_D$ )。表7中显示这些独特结合剂中的一些结合剂的结合亲和力。

[0228] 表1中列出抗DLL3骆驼sdAb的CDR序列且表2中列出抗DLL3人类scFv的CDR序列。

[0229] 表1.抗DLL3骆驼sdAb CDR序列

[0230]

| sdAb    | ID | CDR1 序列     | ID  | CDR2 序列             | ID  | CDR3 序列               |
|---------|----|-------------|-----|---------------------|-----|-----------------------|
| AS63930 | 1  | GYTYSGNVMA  | 82  | VVYNIDGGGRFTTYADSVK | 163 | EVADPTWGSRDQRRYKY     |
| AS63932 | 2  | GYTYGSTFMG  | 83  | VIYTGSGSTWYASSVKG   | 164 | RYGSGNVNY             |
| AS63951 | 3  | RDIYGNNCMA  | 84  | SIYPAGGRPPYADSVKG   | 165 | RSFSIACVATRSGITRSNFAY |
| AS63984 | 4  | GYTYSSNFMG  | 85  | TIVSGGGTTYADSVR     | 166 | GGPVTNAPRWYPLRPPGYNY  |
| AS63987 | 5  | GYRNCMA     | 86  | VIYTPSGITDYASSVKG   | 167 | DRPFVCNIANMRRSSN      |
| AS63997 | 6  | FSGYGVSTMA  | 87  | AITVSGSNTYYADSVKG   | 168 | GYLSGGSWDVPGRYNY      |
| AS64047 | 7  | QYVYRWDLMG  | 88  | AVYTG DGITYYADSVKG  | 169 | GFVSGGRWNQSYRYKY      |
| AS64052 | 8  | GYTYRSNFMG  | 89  | TIHSGVATTYADSVKG    | 170 | GGPPANADRWYPLRPPGYNY  |
| AS64062 | 9  | RSPYSSRCMG  | 90  | ALYTG GGSYADSVKG    | 171 | VVPRGGSCRLDERGYHY     |
| AS64072 | 10 | GYSYYINLMA  | 91  | AHGPVSGTAYYTDVKG    | 172 | ETTMGWAHERGYRY        |
| AS64097 | 11 | GYTYSRNCMG  | 92  | AINTGGGSTYYADSLE    | 173 | GPDLGGSWCRPVERAFTY    |
| AS64114 | 12 | GNTYSTNYMG  | 93  | VIYTRGGHTYYVDSVR    | 174 | ASRHRLRLNNPRDYDY      |
| AS64123 | 13 | GYTYTSNWL   | 94  | IYTGSGSTHYRSSVKG    | 175 | RFSEYNY               |
| AS64130 | 14 | GYTYRSNFMG  | 95  | TIDSRGTITYYADSVKG   | 176 | GGPRTNDDRWYPLRPPGYNY  |
| AS64137 | 15 | GSTYSTNFMG  | 96  | TLVTWVERTAYADSVKG   | 177 | AAASTDVRLDPGDFAY      |
| AS64142 | 16 | GFTFDRNAMR  | 97  | CIDWTGANIAYADSVKG   | 178 | DTTSGYCSGFWSTSRYS     |
| AS64154 | 17 | GYTYRYLYMG  | 98  | CIYTGSGSTGYADSVKG   | 179 | SSPRWGGTCRRWSQYNY     |
| AS64160 | 18 | VYTSSSYCMG  | 99  | AMCFGGLVTHYADSVKG   | 180 | DFGRDKNYLRPLLPHAYNY   |
| AS64228 | 19 | GVSYNRCSMG  | 100 | RIQPGGNTYYADSVKG    | 181 | LCWRENVNY             |
| AS64300 | 20 | GDIYNLMSMA  | 101 | YINTIIGNTYYTDVKG    | 182 | FNYGGAWYEERSYKY       |
| AS64380 | 21 | GNTYSSNYMG  | 102 | VIYTRGGHTYYVDSVR    | 183 | SSRHRLGLNNPRDYDY      |
| AS64395 | 22 | GSTYSTNFMG  | 103 | TLVTWAERTAYADSVKG   | 184 | AASTAVRLDPGDFAY       |
| AS64443 | 23 | GYTDSSVYIG  | 104 | IYTGGESTHYRSSVKG    | 185 | RFPVAVTY              |
| AS64511 | 24 | RATYSTNYIS  | 105 | TITTDGGETAYADSVKG   | 186 | NLRIGGDWFDGRDFRA      |
| AS64536 | 25 | RYTDNFVYMG  | 106 | LIYPPGGSTYYASSVKG   | 187 | KWGLGGGGLKSDTYMY      |
| AS64597 | 26 | GYTYRVNFMG  | 107 | TIDSGVGTYYADSVKG    | 188 | GGPPTDGDRWYPLRPPGYNY  |
| AS64617 | 27 | GYTDRCMA    | 108 | RISTSGFTNYAASVKG    | 189 | IVGRTCSLNY            |
| AS64634 | 28 | GYSFRGDFMCM | 109 | VFYPPGGSTNYADSAKG   | 190 | RRWVSGTCYWDSDFHY      |

[0231]

|         |    |            |     |                          |     |                              |
|---------|----|------------|-----|--------------------------|-----|------------------------------|
| AS69498 | 29 | GNTYSSNYMA | 110 | VIYTRGGHTYYIDSVR<br>G    | 191 | SSRHRLRLSDPRDYDY<br>G        |
| AS69500 | 30 | RYTYSSACMG | 111 | SIFTGTGGSTYYADSVK<br>G   | 192 | RAFQVGYCYLRDVTYNY<br>Y       |
| AS69527 | 31 | RYTFSSTCMA | 112 | AIYTDGGSWYADSVK<br>G     | 193 | RRWACPRVGSWHEFAY             |
| AS68280 | 32 | GSTYSSNYLG | 113 | AISTGDGATAYADSVK<br>G    | 194 | ARGRFIDWTKATQYDY             |
| AS68355 | 33 | GYTYSGVCMG | 114 | AIDSDGTSYADSVK<br>G      | 195 | AIVGGFNAYCSGGYVLD<br>FGA     |
| AS69443 | 34 | GFTFDDSDMA | 115 | TISSDGSTYYADSVK<br>G     | 196 | DFLTGFYYSDSPHPAPCS<br>ASDFGY |
| AS75376 | 35 | GYTYSSHSMG | 116 | VIYTGDSYADSVK<br>G       | 197 | DPNPDYMLPFRPSRRSW            |
| AS75387 | 36 | GYPYSSPCMA | 117 | VAYTGGDIQYLTDVSK<br>G    | 198 | DLRLPRAGGCAYSY               |
| AS75695 | 37 | GYTVSAYCMG | 118 | FIDAGGATYADPVK<br>G      | 199 | DRRGRVRRCEYNA                |
| AS76169 | 38 | GYIYSSFCMG | 119 | YIRDNIMTSYTDVSK<br>G     | 200 | DRGGYANSCAVAARYDY            |
| AS63931 | 39 | FSGYGVSTMA | 120 | AITVGSNTYYADSVT<br>G     | 201 | GWLSGGSWHVPGRYNY             |
| AS63937 | 40 | GSTISSRPMA | 121 | CIHTGLGRYYADSVK<br>G     | 202 | DSRRPCMVAAGYTY               |
| AS63948 | 41 | GYTYRYLYMG | 122 | CIYTGSGSTGYADSVK<br>G    | 203 | ASPRWGGTCRRWSEYN<br>Y        |
| AS63956 | 42 | GFTYSNCCMR | 123 | LINSSGGTYADSVRG          | 204 | YQAKYCSGPCAPPTD              |
| AS63965 | 43 | GYSSGSCRMG | 124 | KVISDGTTVYADSVK<br>G     | 205 | WCREYPPGILNNG                |
| AS63993 | 44 | GFTFDDLVA  | 125 | LVATAGNSVYADSVK<br>G     | 206 | RTDSEHAFKF                   |
| AS63999 | 45 | GYTYSSNWMG | 126 | IYTGISTHYRSSVSK<br>G     | 207 | RYTDYNY                      |
| AS64006 | 46 | GYTGDTTYIG | 127 | LIYTSYTSEYYADSVK<br>G    | 208 | RSRTMMY                      |
| AS64057 | 47 | GFTFDRNAMR | 128 | CISWTGANIAYADSVK<br>G    | 209 | DTTSGSCSGFWSTSRYY<br>G       |
| AS64060 | 48 | GSTYCTYRMS | 129 | VIDSGGTSYADSVK<br>G      | 210 | DPTIGCPQTYRYNY               |
| AS64071 | 49 | GNTYRLNSMG | 130 | FIVMIRGTTYGASVK<br>G     | 211 | STKDQFYVFNPIGYDS             |
| AS64093 | 50 | RYIYGNNCMA | 131 | SIYPAGGRYYADSVK<br>G     | 212 | RSFSIGVCATQSGITWSN<br>FAY    |
| AS64118 | 51 | GYTYSACRMA | 132 | FINSAGSTYYADSVK<br>G     | 213 | TWDSSCRFQY                   |
| AS64120 | 52 | RYIYGNNCMA | 133 | SIYPAGGRPYADSVK<br>G     | 214 | RSFSIADCATQSGITRSNF<br>AY    |
| AS64124 | 53 | TYTPSNNYMG | 134 | AIATIGGTRYADSVK<br>G     | 215 | GRPYSLPLPLESGAYR<br>Y        |
| AS64135 | 54 | TSTYCRYMR  | 135 | AMQPDGTTSYSDSVK<br>G     | 216 | DPMGGSRTPTSA                 |
| AS64163 | 55 | GYRYRWNCMA | 136 | AISTGSGSTYYAGSVK<br>G    | 217 | DPSVCPGGMWYSKEYR<br>Y        |
| AS64182 | 56 | GQTSRYLYMG | 137 | CIYTGSGSTGYADSVK<br>G    | 218 | SSPHWGGTCRRWSEYK<br>Y        |
| AS64183 | 57 | GHTYSANCMA | 138 | SVYTDDDSTMYTDSVK<br>G    | 219 | DLSSGPAGCGYTH                |
| AS64207 | 58 | GYTYSSNFMG | 139 | TIVSGGGTTYADSVR<br>G     | 220 | GGPPTNGAKWYPLRPPG<br>YNY     |
| AS64276 | 59 | GYTGSSRCMA | 140 | QIFTGRGTTGYADSVK<br>G    | 221 | SLGPGRGACGYNY                |
| AS64336 | 60 | GRTYSSCSMG | 141 | HIFSDGSRYYADSVK<br>G     | 222 | RTGWAPRCVPGY                 |
| AS64346 | 61 | GYTYFMG    | 142 | TIGTGDIFNGAAYYVDS<br>VKG | 223 | VQSKSSNYVLRDASTYN<br>Y       |



|        |         |    |                  |     |                          |     |                            |
|--------|---------|----|------------------|-----|--------------------------|-----|----------------------------|
| [0232] | AS64420 | 62 | GDTSRSVWMG       | 143 | TISTAGGSTWYTDSVK<br>G    | 224 | RSRYATY                    |
|        | AS64473 | 63 | GYTYRYLYMA       | 144 | CIYTGSGTTGYADSVK<br>G    | 225 | SSPQWGGTCRRWSEYN<br>Y      |
|        | AS64475 | 64 | GYTWSRNWMG       | 145 | TITISGGSTWYADSVKG        | 226 | RDTARTY                    |
|        | AS64513 | 65 | DYPYIDNCMG       | 146 | AACTGGGSTYYADSVK<br>G    | 227 | GYYSGSGPGYLLPWRYN<br>Y     |
|        | AS64562 | 66 | GYTARRDFMA       | 147 | VIHTGGDTTYADSVK<br>G     | 228 | GFRPRGGGYTGDVLAQ<br>AAAYNY |
|        | AS64583 | 67 | GFTIAVYTMG       | 148 | CTSWAGGRTYTADSVK<br>G    | 229 | KAHPDCSGDWSPSGYEY          |
|        | AS64594 | 68 | GYTYNSNYMG       | 149 | LIYTGGGSTYYADSVK<br>G    | 230 | RTQTRNY                    |
|        | AS64605 | 69 | RYPYSSICMG       | 150 | RIYTGSTWYTDSVK<br>G      | 231 | RSNSYSYSSCDYGPLTRG<br>GYNF |
|        | AS64606 | 70 | GYTSRSNYMG       | 151 | AFYLIYTRGGSTYYASS<br>VKG | 232 | RLDEKMY                    |
|        | AS68121 | 71 | GYTYSRNCMG       | 152 | TDYIRFGRTYADSVK<br>G     | 233 | DPGSRTDDSCGTSYNKG<br>NFGY  |
|        | AS68170 | 72 | GYTYRSNCMG       | 153 | TIYTGGRNLYYADSV<br>KG    | 234 | ASDVAVGVNSCGGRTAG<br>FDA   |
|        | AS63964 | 73 | GYTYSYNNMG       | 154 | AISGGRFTAYADSVKG         | 235 | EVVDPTWGSRDQRRYK<br>Y      |
|        | AS64116 | 74 | GYYISCVG         | 155 | GISTGGGGTVYADSVK<br>G    | 236 | DRWNSFANCGAWGRYT<br>Y      |
|        | AS68270 | 75 | GYPSSYYMLSM<br>A | 156 | AITSGTGSTSYADSVKD        | 237 | ASGWIVPSRSLTANLYRY         |
|        | AS68320 | 76 | GYTYNTNYMG       | 157 | AIYRHSGNTAYADSVK<br>G    | 238 | GRAGPWALMRPTEFGY           |
|        | AS68351 | 77 | GDTFRAYYMN       | 158 | GISASGGRTSYADSVKG        | 239 | GAVRLSTSSVRDSS             |
|        | AS75378 | 78 | GNTRSTTYMG       | 159 | IVYTGGRDITYAASVK<br>G    | 240 | RSYEYTY                    |
|        | AS75383 | 79 | GYTFSSYCLG       | 160 | TFNNRGVANYHDSVKG         | 241 | DRRYGRQWYQPCWNT            |
|        | AS75751 | 80 | GYFYNTYYFMG      | 161 | AIDTDGRTSYADSVKG         | 242 | GFGYMNVIQALNGMRQ<br>NPDY   |
|        | AS76422 | 81 | GYTFAGNCLG       | 162 | TYNFNGVANYADSVKG         | 243 | DRRDGRRWSQPCEWNT           |

[0233] 表2.Anti-DLL3 human scFv CDR sequences

| Ab     | ID      | CDR1 序列   | ID         | CDR2 序列                                     | ID         | CDR3 序列                         |
|--------|---------|---|------------|---|------------|---------------------------------|
| [0234] | AS56704 | 495<br>498<br>VL: RASQSVSSAVA<br>VH: GFNISSSYMH | 496<br>499 | VL: SASSLYS<br>VH:<br>YIYPSYGYTSY<br>ADSVKG | 497<br>500 | VL: QQASWSPIT<br>VH: GGYYYHGMDY |
|        | AS56788 | 501<br>504<br>VL: RASQSVSSAVA<br>VH: GFNISSSYMH | 502<br>505 | VL: SASSLYS<br>VH:<br>YISSYYGYTTY<br>ADSVKG | 503<br>506 | VL: QQHYAPSLIT<br>VH: YSYYYGMDY |

[0235] 表3中列出抗DLL3 sdAb氨基酸序列。sdAb的CDR加下划线。编码抗DLL3 sdAb的核酸序列显示于SEQ ID NO:368-448中。

[0236] 表3. 抗DLL3骆驼sdAb氨基酸序列

[0237]

| SEQ ID | 骆驼 sdAb | 氨基酸序列   |
|--------|---------|---|
| 274    | AS63930 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSNGNYMAWFRQAP<br>GNEREGVAVVYNIDGGGRFTTYADSVKGRFTISRGNKNTVYL<br>QMNSLKPEDSGMYCYAAEVADPTWGSRDQRRYKYWGQGTQ<br>VTVSS |
| 275    | AS63932 | QVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYTYGSTFMGWFRQNP<br>KEREGVAVIYTGGSSTWYASSVKGRFTISQDNAKNTVYLMN<br>SLKPEDTAMYYCAARYGSGNVNYWGQGTQVTVSS                  |
| 276    | AS63951 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLACETSRIYGNNCMAWFRQAP<br>GKEREGVASIYPAGGRPYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLMN<br>SLKPEDTAMYYCAARSFSIAVCAITRSGITRSNFAYWGQGTQVT<br>VSS  |
| 277    | AS63984 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSNFMGWFRQAPG<br>KEREGVATIVSGGGTITYADSVRGRFTISQDNAKNTVYLMNS<br>LKPEDTAMYYCAAGGPVTNAPRWYPLRPPGYNYWGQGTQVT<br>VSS   |
| 278    | AS63987 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCEATGYRNCMAWFRQAPGKER<br>EGVAVIYTPSGITDYASSVKGRFTISQNNARNTQYLMNSLKP<br>EDTAMYYCAADRPFCNIANMRRSSNWGRGTQVTVSS              |
| 279    | AS63997 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCAGSFGYGVSTMAWFRQAPG<br>KEREGVAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNARTVFLQMN<br>LKPEDTAMYYCAVGYLSGGSDVDPGRYNYWGQGTQVTVSS              |
| 280    | AS64047 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCAASQYVYRWDLMGWFRQAP<br>GKEREAVAAYTGDGITYADSVKGRFISQDNAKNTVYLMN<br>NSLKPEDTGMFYCAAGFVSGGRWNQSYRYKYWGQGTQVTVS<br>S        |
| 281    | AS64052 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYRSNFMGWFRQAP<br>GKEREGVATIHSGVATTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLMN<br>SLKPEDTAMYYCAAGPPANADRWYPLRPPGYNYWGQGTQV<br>TVSS   |
| 282    | AS64062 | QVRLVESGGGSVQVGGSLRLSCAASRSPYSSSRRCMGWFRQAP<br>GKEREGVAALYTGGSSTYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLMN<br>NSLKPEDTAMYYCAAVPRGGSCRLDERGYYHWGQGTQVT<br>VSS    |
| 283    | AS64072 | QVQLVESGGGSVQAGGFLRLSCALSGYSYINLMAWFRQAPG<br>KEREVAHAHPVSGTAYYTDVSKGRFTISRDPGKNTMYLQMF<br>LQPEDTALYYCAAETTMGWAHERGYRYWGQGTQVTVSS              |
| 284    | AS64097 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYTYSRNCMGWFRQAP<br>GKEREGVAINTGGGSTYYADSLRFTISQDNAKNTMYLQ<br>NSLKPEDTAMYYCAAGPDLGGSWCRPVERAFTYWGQGTQVT<br>VSS       |
| 285    | AS64114 | QVQLQESGGGSVQAGGSLTLSCASGNTYSTNYMGWFRQAPG<br>KEREVAVIYTRGGHTYVDSVGRFTISQDNAKNTVYLMN<br>SLKPEDTAMYYCAAASRHRLRLNNPRDYDWGQGTQVTVSS               |
| 286    | AS64123 | QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSNWLGWFRQAP<br>GKEREEVAIYTGSGSTHYRSSVKGRFTISQDNAKNTVYLMN<br>SLKPEDTAMYYCAARFSEYNYWGQGTQVTVSS                     |
| 287    | AS64130 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYRSNFMGWFRQAP<br>KEREGVATIDSRGTITYADSVKGRFTISQDNEKNTVYLMNS<br>LKPEDTAMYYCAAGGPRINDRWYPLRPPGYNYWGQGTQVT<br>VSS     |
| 288    | AS64137 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTYSTNFMGWFRQAPG<br>KEREGVATLVTWVERTAYADSVKGRFTISQDRAKNTVYLMN<br>SLKPEDTAMYYCAAAAASDVRLLDPGDFAYWGQGTQVTVSS          |

[0238]

|     |         |  |
|-----|---------|--|
| 289 | AS64142 | QVHLMESGGGLVQTGGSLRLSCTASGFTFDNRNAMRWYRQAPG<br>KEREVSCIDWTGANIAYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS<br>LKPEDTGMYYCAADTTSGYCSGFWSTSRYSWGQGTQVTVSS        |
| 290 | AS64154 | QVQLKESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTYRYLYMGWFRQTPG<br>KEREVACIYTGSGSTGYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>NLKPEDTAMYYCAASSPRWGGTCRRWSQYNYWGQGTQVTVS<br>S    |
| 291 | AS64160 | EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASVYTSSSYCMGWFRQAPG<br>KEREVAAAMCFGGLVTHYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAADFGRDKNYLRPLLPHAYNYWGQGTQVT<br>VSS |
| 292 | AS64228 | QVQLKESGGGSIQAGGSLRLSCAASGVSYNRCSMGWYRQAPG<br>KRELVSRIQPGGNTYYADSVKGRFTVSQDNAKNTVSLQMNS<br>LKPEDTAMYYCNALCWRENVNYWGQGTQVTVSS                 |
| 293 | AS64300 | QVHLVESGGGSVQTGGSLRLSCAVSGDIYNLMSMAWFRRAPG<br>KEREVAYINTIIGNTYYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN<br>LKPEDTAMYYCAAFNYGGAWYEERSYKYWGQGTQVTVSS            |
| 294 | AS64380 | EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCEASGNTYSSNYMGWFRQAPG<br>KEREVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAASSRHLRGLNNPRDYDYWGQGTQVTVSS         |
| 295 | AS64395 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTYSTNFMGWFRQAPG<br>KEREVATLVTAERTAYADSVKGRFTISQDRAKNTVYLQMN<br>GLKPEDTAMYYCAAAASTAVRLLDPGDFAYWGQGTQVTVSS          |
| 296 | AS64443 | QVHLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTDSSVYIGWFRQAPG<br>KEREVAVIITGGESTHYRSSVKGRFTVSQDNAKNTLYLQMN<br>LKPEDTAMYYCAARFPAVTYWGQGTQVTVSS                   |
| 297 | AS64511 | QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGK<br>EREAVATITTDGETAYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMN<br>LKPEDTAMYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGTQVTVSS           |
| 298 | AS64536 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASRYTDNFVYMGWFRQAP<br>GKEREVALIYPGGGSTYYASSVKGRFTISQDNAKNTVHLQMN<br>NLKPEDTAMYYCAAKWGLGGGGLKSDTYMYWGQGTQVTVS<br>S     |
| 299 | AS64597 | QVHLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYRVNFMGWFRQTPG<br>KEREVATIDSGVGTYYADSVKGRFTISHNNAKNTIYLQMN<br>LKPEDTAMYYCAAGPPTDGRWYPLRPPGYNYWGQGTQVT<br>VSS     |
| 300 | AS64617 | QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTDRCSMAWYRQAPG<br>KERELVSRISTSGFTNYAASVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLNPGDTGMYYCAIIVGRTCSLNYWNGILVTVSS                 |
| 301 | AS64634 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYSFRGDFMCMGWFRQ<br>TPGKREGVAVFYPPGGSTNYADSAKGRFTISQDNAKNTMYL<br>QMNTLKPEDTAMYYCAARRWVSGTCYWDSDFHYWGQGTQV<br>TVSS   |
| 302 | AS69498 | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCEASGNTYSSNYMAWFRQAPG<br>KEREVAVIYTRGGHTYYIDSVRGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>LKPEDTAMYYCAASSRHLRLSDPRDYDYWGQGTQVTVSS           |
| 303 | AS69500 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCAADRYTYSSACMGWFRQAPG<br>KEREVASIFTGTGGSTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLKPEDTAIYYCAARAFQVGYCYLRTDVYNYWGQGTQVTVSS       |
| 304 | AS69527 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCVASRYTFSSTCMAWFRQAPG<br>KEREVAAIYTDDGSTWYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAARRWACPRVGSWHEFAYWGQGTQVTVSS          |

[0239]

|     |         |  |
|-----|---------|--|
| 305 | AS68280 | QVQLVESGGGSVHPGGSLRLSCAASGSTYSSNYLGWFRQAPG<br>KGRDWVAAISTGDGATAYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLKLEDSAMYYCAAARGRFIDWTKATQYDYWGQGTQVTVSS  |
| 306 | AS68355 | QMQLVESGGDSVQAGGSLRLSCAASGYTYSVCMGWFRQAP<br>GKEREGVA <del>A</del> IDS <del>D</del> GS <del>T</del> SYADSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMN<br>LKPEDTAMYYCAA <del>A</del> I <del>V</del> GG <del>F</del> NAYCSGGYVLD <del>F</del> GA <del>W</del> GQGTQVT<br>VSS |
| 307 | AS69443 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLS <del>C</del> ASGFTFDDSDMAWYRQAPG<br>DGCDLVSTISSDGSTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMHSL<br>KPEDTAVYYCAADFLTGFYYSDSPHPAPCSASDFGYWGQGTQV<br>TVSS   |
| 308 | AS75376 | QVQLKESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSSHSMGWFRQAPG<br>KEREGVA <del>V</del> IYTGDGSTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAADPNPDYMLPFRPSRRS <del>W</del> WGQGTQVTVSS   |
| 309 | AS75387 | QVH <del>L</del> VESGGGSVQAGGSLRLSCAASGY <del>P</del> YSSPCMAWFRQAPG<br>KEREGVL <del>V</del> AYTGGDIQYL <del>T</del> DSV <del>K</del> GRFTISR <del>D</del> NAKNTVYLQMN<br>LKPEDTAMYYCAADLRLPRAGGCAYS <del>Y</del> WGQGTQVTVSS                      |
| 310 | AS75695 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLS <del>C</del> VASGYTVSAYCMGWFRQVLG<br>KGRERIAFIDAGGATTYADPVKGRFTISKDNAKNTLYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCVADRRGRVRRCEYN <del>A</del> WGQGTQVTVSS  |
| 311 | AS76169 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIYSSFCMGWFRQAPG<br>KEREVVA <del>V</del> YIRDNIMTSYT <del>S</del> TVKGRFTISKDNAKNTLYLQMN<br>GLKPEDTGMYYCAVDRGGYANSCAVAARYDYWGRGTQVTVSS   |
| 312 | AS63931 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLS <del>C</del> AGSFSGYGVSTMAWFRQAPG<br>KEREGVA <del>A</del> ITVGSNTYYADSVTGRFTISRDNARTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAAGWLSGGSWHVPGRYNYWGQGTQVTVSS  |
| 313 | AS63937 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTISSRPMWFRQAPGK<br>EREGVACIHTGLGR <del>T</del> YYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQVNSL<br>KPEDTAMYYCAADSRRPCMVAAAGTYWGQGTQVTVSS  |
| 314 | AS63948 | QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTYRYLYMGWFRQTPG<br>KEREGVACIYTGSGSTGYADSVKGRFTISQDNAENTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAAASPRWGGTCRRWSEYNYWGQGTQVTVSS   |
| 315 | AS63956 | QVH <del>L</del> VESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTYSNCCMRWYRQAPG<br>KARELVSLINSSGGTYADSVRGRFTISKDNAKNTLYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAA <del>Y</del> QAKYCSGPCAPPTDWGQGTQVTVSS   |
| 316 | AS63965 | QVQLVESGGGSVQAGGSLRLS <del>C</del> VASGYSSGSCRMGWYRQAPG<br>KERELVSK <del>V</del> ISDGT <del>T</del> VYADSVKGRFTLSQGN <del>A</del> KNTVYLQMSL<br>LPEDTAMYYCNAWCREYPPGILNNGWGQGTQVTVSS   |
| 317 | AS63993 | QVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGFTFDDLVMAWFRQAPG<br>KERQLVSLVATAGNSVYADSVKGRFTLSRDNAHSTAYLQMN<br>GLKPEDTAMYYCAARTDSEHAFKFWGQGTQVTVSS   |
| 318 | AS63999 | EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSSNWMGWFRQAP<br>GKEREEVA <del>I</del> IYTGISTHYR <del>S</del> SVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAARYTDYNYWGQGTQVTVSS  |
| 319 | AS64006 | QVH <del>L</del> VESGGGSVQAGGSLRLSCEVSGYTGDDTYIGWFRQAPG<br>KEREGVALIYTS <del>G</del> TSEYADSVKGRFIISRDNAKNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCGARSRTMMYWGQGTQVTVSS  |
| 320 | AS64057 | QVQLEESGGGLVQTGGSLRLSCTASGFTFDRNAMRWYRQAPG<br>KEREGVSCISWTGANIAYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMN<br>SLKPEDTGMYYCAADTTS <del>G</del> SCSGFWSTSRYYWGQGTQVTVSS   |
| 321 | AS64060 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTYCTYRMSWFRQAPG<br>KEREFVA <del>V</del> IDS <del>G</del> SGSTSYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCKTDPTIGCPQTYRYNYWGQGTQVTVSS   |

[0240]

|     |         |   |
|-----|---------|---|
| 322 | AS64071 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCVASGNTYRLNSMGWFRQAP<br>GKEREGVAFIVMIRGTTYGASVKGRFTISQDNAQTTVYLQMS<br>SLKPEDTAMYYCAASTKDQFYVFNPIGYDSWGQGTQVTVSS          |
| 323 | AS64093 | QVHVESGGGSVQAGGSLRLSCATSRYIYGNNCMAWFRQAPG<br>KEREGVASIYPAGGRTYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQIDSL<br>KPEDTAMYYCAARSFSIGVCATQSGITWSNFAYWGQGTQVTVS<br>S  |
| 324 | AS64118 | QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSACRMAWYRQAP<br>GKERELVVSFINSAGSTYYADSVKGRFAISRDNACTTVYLQMNA<br>LKAEDTAIYYCNTWDSSCRFQYWGQGTQVTVSS                |
| 325 | AS64120 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCETSRYIYGNNCMAWFRQAPG<br>KEREGVASIYPAGGRPYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMDS<br>LKPEDTAMYYCAARSFSIADCATQSGITRSNFAYWGQGTQVTV<br>SS |
| 326 | AS64124 | QVKLVESGGGSVQTGGSLRLSCAVSTYTPSNMYMGWFRQAPG<br>KEREGVAIATIGGTTYADSVKGRFTISQDGAKNTIYLMNGL<br>KPEDTAMYYCAAGRPYSLPLPLESGAYRYWGQGTQVTVSS           |
| 327 | AS64135 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTSTYCRYMRWYRQAPG<br>KEREFVSAMQPDGTTSYSDSVKGRFTMSQDRANMLYLQMN<br>SLRPEDTAMYYCKRDPMGGSRTPCTSAWGQGTQVTVSS               |
| 328 | AS64163 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCAVSGYRWRNCMAWFRQAP<br>GKEREGVAISTGSGSTYYAGSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAADPSVCPGGMWYSKEYRYWGQGTQVTVS<br>S      |
| 329 | AS64182 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCTASGQTSRYLYMGWFRQTPG<br>KEREGVACIYTGSGTGYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQTN<br>LKPEDTAMYYCAASSPHWGGTCRRWSEYKYWGQGTQVTVSS          |
| 330 | AS64183 | QVHVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGHTYSANCMAWFRRAP<br>GKEREWVASVYTDGDDSTMYTDSVKGRFTIFQDNAKNTVYLQ<br>MNSLKPEDTAMYYCAADLSSGPGAGCGYTHWGQGTQVTVSS           |
| 331 | AS64207 | EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSNFMGWFRQAPG<br>KEREGVATIVSGGGTTYADSVRGRFTISQDNAKNTVYLQMNS<br>LKPEDTAMYYCAAGPPTNGAKWYPLRPPGYNYWGQGTQVT<br>VSS    |
| 332 | AS64276 | QVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCVVSQYTGSSRCMAWFRQAP<br>GKEREAQAQIFTGRGTTGYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>SLRPEDTAIYYCAASLGPGRGACGYNYWGQGTQVTVSS            |
| 333 | AS64336 | QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTTSGRTYSSCSMGWYRQAPG<br>KERELVSHIFSDGSRYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSL<br>KPEDTAMYYCNRRTGWAPRCVAPGYWGQGTQVTVSS             |
| 334 | AS64346 | QVHVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYFMGWFRQAPQKE<br>REWVATIGTGDIENGAAYYVDSVKGRFAISQDNAKNTVYLQMN<br>NSLKPEDTAVYVCAAVQSKSSNYVLRDASTYNYWGQGTQVT<br>VSS   |
| 335 | AS64420 | EVQLVESGGGSVQAEGLRLSCAASGDTSRVWGMWARQVP<br>GKEREVVATISTAGGSTWYTDSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMN<br>NSLKPEDTAIYYCAARSRYATYWGQGTQVTVSS                   |
| 336 | AS64473 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTYRYLYMAWFRQTPG<br>KEREGVACIYTGSGTGYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNS<br>LNAEDTAMYYCAASSPQWGGTCRRWSEYNYWGQGTQVTVSS         |
| 337 | AS64475 | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTWSRNWGMWFRQAP<br>GKEREGFATITISGGSTWYADSVKGRFTISLDNAGNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAARDTARTYWGQGTQVTVSS                  |

|     |         |  |
|-----|---------|--|
| 338 | AS64513 | EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASDYPIDNCMGWFRQGP<br>KREGVAAACTGGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMN<br>SLKPEDTDVYYCATGYYS <del>SGSGPYLLPWRYNYWGQGTQVT</del><br>SS                             |
| 339 | AS64562 | EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTARRDFMAWFRQVPG<br>KREGVAVIHTGGDTTYADSVKGRFTISRDNAQNIMNLQMN<br>LKPEDTAMYYCAAGFRPRGGGYTGDVLAQAAAYNYWGQGT<br>QVTVSS                                   |
| 340 | AS64583 | EVQLAESGGGLVQAGGSLRLSCTASGFTIAVYTMGWFRQAPG<br>KEREGISCTSWAGGRTYTADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS<br>LKPEDTAMYYCAAKAHPDCSGDWSPSGYEWGQGTQVTVSS   |
| 341 | AS64594 | QVHLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTNSNYMGWFRQAP<br>GKEREGVALIYTG <del>GGSTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMN</del><br>NSLKPEDTAMYYCSVRTQTRNYWGQGTQVTVSS  |
| 342 | AS64605 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCAVSRYPYSSICMGWFRQAPG<br>KESEGVARIYTG <del>TGSTWYTD</del> SVKGRFTIARDNAQNTVYLQMN<br>SLKPEDTAMYYCAARSNSYSYSSCDYGPLTRGGYNFWGQGTQ<br>VTVSS                   |
| 343 | AS64606 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAVSGYTSRSNYMGWFRQAPG<br>KREGVALIYTRGGSTYYASSVKGRFTISQDSAKKTYLQMN<br>SVKPEDTAMYYCALRLDEKMYWGQGTQVTVSS   |
| 344 | AS68121 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCDASGYTSRNCMGWFRQAP<br>GKEREGVAAFYTDYIRFGRTYADSVKGRFTIFQDNAKNTVYL<br>QMNSLKPEDTAMYYCAADPGSRTDDSCGTSYNGKNGFGYWGQ<br>GTQVTVSS                               |
| 345 | AS68170 | QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTYRSNCMGWFRQAPG<br>KREGVATIYTG <del>GGRNLY</del> ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMN<br>SLKPEDSARYYCAAASDVAVGVNSCGGRTAGFDAWGQGTQVT<br>VSS                       |
| 346 | AS63964 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCSASGYTYSYNNMGWFRQAPG<br>NEREGVA <del>AISGGRFTAYADSVKGRFTISRDNAENTLYLQMN</del><br>NLKPEDTGMYYCAA <del>EVVDPTWGRDQRRYKYWGQGTQVT</del><br>VSS               |
| 347 | AS64116 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIYSCVGFWRQAPGKE<br>REGVAGISTGGGGTVYADSVKQFTISRDNANTVYLQMDSL<br>KPEDTAMYYCAADRWN <del>SFANCGAWGRYTYWGQGTQVT</del><br>VSS                             |
| 348 | AS68270 | QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYPSSTYYMLMAWFRQ<br>APGKREGVA <del>AITS</del> GTGTSYADSVKDRFTISKDYANNTLYLHI<br>NNLKPEDTAMYYCAAASGWIVPSRSLTANLYRYWGQGTQVT<br>VSS                       |
| 349 | AS68320 | QVHLVESGGDSVQAGGSLRLSCAASGYTYNTNYMGWFRQAP<br>GKEREGVA <del>AIYRHS</del> GN <del>TAYADSVKGRFTISQDYAKNTVYLQMN</del><br>NSLKPEDTAMYYCAAGRAGPWALMRPTEFGYWGQGTQVT<br>VSS            |
| 350 | AS68351 | QVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDTFRAYYMNWVRQAPG<br>KGF <del>EWVSGISASGGRTSYADSVKGRFTISRDNANTLYLQ</del> NS<br>LSTEDTGMYYCVKGA <del>VRLSTSSVRDSSWGQGTQVT</del><br>VSS                 |
| 351 | AS75378 | QVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCVVS <del>GNTRSTTYMGWFRQAPG</del><br>KREGVA <del>IVYT</del> GGRD <del>TYAASVKGRFTISQDNAKTTIYLQMN</del><br>LEPEDTAMYYCAARS <del>YEYTYWGRGTQVT</del><br>VSS |
| 352 | AS75383 | EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYTFSSYCLGWFRQAPG<br>KQRQGVATFN <del>NRGVANYHDSVKGRFTASVDNAKNTLLQMN</del><br>SLEPDDTAMYYCAADRRYGRQWYQPC <del>EWN</del> TWGQGTQVT<br>VSS               |
| 353 | AS75751 | QVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYFYNTYYFMGWFRQAP<br>GKEREGVA <del>AIDTDGRTSYADSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMN</del><br>LKPEDTAMYYCAAGFGYMNVIQALN <del>GMRQNPDYWGQGTQV</del><br>TVSS           |
| 354 | AS76422 | QVKLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTFAGNCLGWFRQAPG<br>KREGVVTYNNFGVANYADSVKGRFTVSDNAKNTLLQMN<br>SLEPEDTAMYYCAADRRD <del>GRRWSQPCEWN</del> TWGQGTQVT<br>VSS                             |

[0241] 表4中列出抗DLL3人类scFv的VH及VL结构域的氨基酸序列。编码抗DLL3人类scFv

的VH或VL结构域的核酸序列显示于SEQ ID NO:511-514中。

[0244] 表4. 抗DLL3人类scFv氨基酸序列

| scFv    | SEQ ID | 氨基酸序列   |
|---------|--------|---|
| AS56704 | 507    | VL:<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP<br>KLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQ   |
|         | 508    | VH:<br>ASWSPITFGQGTKVEIK<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSYMHVWRQAPGK<br>GLEWVAYIYPSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARGGYHYHGM DYWGQGLTVTVSS |
| AS56788 | 509    | VL:<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP<br>KLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQ   |
|         | 510    | VH:<br>HYAPSLITFGQGTKVEIK<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSYSMHVWRQAPGK<br>GLEWVAYISSYYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARYSYYGMDYWGQGLTVTVSS   |

[0246] 实例3. 单特异性骆驼CAR的产生

[0247] 上述表3中提供抗DLL3骆驼sdAb片段的氨基酸序列,且在SEQ ID NO:368-448中提供抗DLL3骆驼sdAb片段的核酸序列。表3的sdAb片段及另外的序列用于产生CAR构建体 (SEQ ID NO:476-484)。CAR3 scFv (SEQ ID NO:473) 为一种人类抗DLL3 scFv,也用于产生作为参考的CAR构建体 (CAR3)。全长CAR自N末端至C末端含有:CD8 $\alpha$ 信号肽 (SEQ ID NO:465)、表3中提供的DLL3结合域sdAb、CD8 $\alpha$ 铰链域 (SEQ ID NO:466)、CD8 $\alpha$ 跨膜域 (SEQ ID NO:467)、CD137细胞内结构域 (SEQ ID NO:468) 或CD28细胞内结构域 (SEQ ID NO:469) 及CD3 $\zeta$ 细胞内结构域 (SEQ ID NO:470)。图1中显示CAR构建体的示意图。接着将编码CAR片段的核酸克隆至慢病毒载体中以在单个编码框中建立全长CAR构建体,使用人EF1 $\alpha$ 启动子进行表达。所得CAR主链载体命名为“PLLV-hEF1 $\alpha$ -DLL3”。

[0248] 实例4. 骆驼抗DLL3 CAR-T细胞的产生

[0249] 慢病毒的制备

[0250] 将包括pCMV- $\Delta$ R-8.47及pMD2.G的慢病毒包装质粒混合物 (Addgene, 目录号12259) 与PLLV-hEF1 $\alpha$ -DLL3载体以预先优化比率 (1:1:1:2) 在聚乙烯亚胺存在下预先混合,接着添加至HEK293细胞中。在培育隔夜后收集上清液。含病毒的上清液经0.45 $\mu$ m PES过滤器过滤,且进行超离心以浓缩慢病毒。将病毒团粒用预先冷却的DPBS冲洗。将病毒适当等分,然后立即储存在-80 $^{\circ}$ C下。通过用流式细胞术测定确定转导至supT1细胞系的效率来确定病毒效价。

[0251] T淋巴细胞的收集及转导

[0252] 通过单采自健康供体收集白细胞。使用Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS培养基,根据制造商方案,分离外周血单核细胞 (PBMC)。使用Pan T细胞分离试剂盒 (Miltenyi, 目录号130-096-535),根据制造商方案,自PBMC纯化人类T细胞。经纯化的T细胞随后用人T细胞活化/扩增试剂盒 (Miltenyi, 目录号130-091-441),根据制造商方案预先活化48小时,其中抗CD3/CD28 MACSiBead颗粒以1:2的珠粒与细胞比率添加。在7 $\mu$ g/mL聚凝胺存在下将预先活化的T细胞用慢病毒原液转导。接着将转导细胞转移至细胞培育箱中,以在合适条件下表达转基因。

[0253] 实例5.骆驼抗DLL3 CAR-T细胞的活体外活性的评估

[0254] 活体外细胞毒性测定

[0255] 在转导后第6天,收获转导T细胞,且与表达DLL3的肿瘤细胞系SHP-77以2:1及5:1的效应细胞(CAR-T)与靶细胞比率共同培育20小时。在所有测定中CAR3CAR-T细胞用作参考以比较测定变化,和/或充当对照。未转导的T细胞(UnT)用作阴性对照。

[0256] 通过乳酸去氢酶(LDH)测定来确定转导T细胞的细胞毒性。结果表明CAR3CAR-T及一些抗DLL3 CAR-T在活体外展现强烈的针对SHP-77细胞的抗肿瘤活性,而UnT无靶细胞杀死作用(图2)。

[0257] IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 释放检测

[0258] 另外,自活体外细胞毒性测定收集上清液,以评定CAR诱发的细胞因子释放,例如干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )及TNF- $\alpha$ 释放。如图3A及图3B所示,CAR3 CAR-T及一些抗DLL3 CAR-T经SHP-77刺激,产生IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ ,而UnT几乎不产生IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 。检测IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 释放的方案可涉及CISBIO的人类TNF- $\alpha$ 试剂盒及IFN- $\gamma$ 试剂盒。

[0259] 通过长期刺激测定确定CAR-T扩增

[0260] 在第0天,将 $1 \times 10^5$ 个SHP-77细胞接种在24孔板中以建立单层。在第1天,计数转导T细胞且在新鲜培养基中在缺乏细胞因子下将 $2 \times 10^5$ 个活CAR<sup>+</sup>T细胞接种在SHP-77细胞上面。在第3天,将新的 $1 \times 10^5$ 个SHP-77细胞单层接种在CAR-T细胞上面。在第4天,计数每个孔的活CAR-T细胞。在同一天,将来自经扩增的孔的 $2 \times 10^5$ 个CAR<sup>+</sup>T细胞(具有至少这个量的细胞)再接种以建立新的单层,如在第1天。重复该过程以提供3-4轮刺激。每次刺激后的扩增倍数计算为[第4天的活CAR<sup>+</sup>T细胞]/ $2 \times 10^5$ ,每次刺激第1天接种的CAR T细胞的量。为对每次新刺激下丢弃的细胞归一化,通过[(扩增倍数)  $\times$  (扩增倍数+1)  $\cdots$ ]确定累积扩增倍数。

[0261] 在3轮刺激后,计算不同CAR-T构建体的扩增倍数。如图4所示,在SHP-77肿瘤细胞的3轮刺激下,大部分CAR-T构建体扩增超过CAR3 CAR-T。

[0262] 实例6.通过CAR-T细胞介导的肿瘤生长抑制对骆驼CAR进行活体内功效评估

[0263] 在SHP-77肿瘤模型中评估骆驼CAR的抗肿瘤活性。将SHP-77细胞皮下植入NOD/SCID小鼠中且随机化成7组(每组4只小鼠,第0天)。第1组:媒剂(仅仅PBS);第2组:UnT(阴性对照);第3组:CAR3;第4组:CAS64380;第5组:CAS64511;第6组:CAS63931;第7组:CAS63997。当肿瘤可触知( $100\text{mm}^3$ )时开始用CAR-T细胞、UnT细胞或媒剂(仅仅PBS)治疗,且当肿瘤体积达约 $3000\text{mm}^3$ 时对小鼠施以安乐死。每周量测肿瘤体积2次。静脉内施用CAR-T细胞,各小鼠 $1 \times 10^6$ 个CAR阳性T细胞。在肿瘤细胞植入后监测小鼠及肿瘤约21天。

[0264] 如图5所示,所有选择的骆驼CAR证明在此动物肿瘤模型中具有抗肿瘤活性。

[0265] 实例7.骆驼sdAb的人源化

[0266] 使用CDR移植技术(参见例如美国专利第5,225,539号)将所选择的骆驼sdAb(SEQ ID NO:279、294、297、312)人源化。简而言之,将骆驼sdAb序列与结构生物信息学研究合作社(Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)(RCSB)蛋白质数据库中的序列进行比较。每种骆驼sdAb的同源性模型基于最接近的VH结构产生。自模型结构鉴别在CDR附近或埋在分子内(即侧链溶剂可及表面积小于15%)的残基。

[0267] 随后,针对NCBI人类生殖系V基因数据库,将各骆驼sdAb序列BLAST化,以鉴别与sdAb具有最高同一性的人类VH生殖系序列(即人接受体)(参见例如Foote及Winter,



J.Mol.Biol.224:487-499(1992);Morea V.等人,Methods 20:267-279(2000);Chothia C.等人,J.Mol.Biol.186:651-663(1985)。在CDR移植方法中,人类接受体的CDR经骆驼sdAb的CDR置换,产生直接移植(straight-graft)序列。直接移植抗体通常丧失结合活性,这需要通过用非人类残基置换对于抗体活性来说关键的框架残基来恢复。在CDR附近或埋在分子内的氨基酸残基通常对于抗体的活性及结构而言是重要的,因此应该为潜在回复突变位点。使用此方法,设计出一系列人源化变体。表5中显示这些人源化变体的CDR氨基酸序列。表6中显示人源化变体的全长氨基酸序列。CDR加下划线。

[0268] 表5.抗DLL3人源化sdAb CDR序列

| Ab             | ID  | CDR1 序列        | ID  | CDR2 序列               | ID  | CDR3 序列              |
|----------------|-----|----------------|-----|-----------------------|-----|----------------------|
| AS64380VH<br>4 | 244 | GNTYSSN<br>YMG | 254 | VIYTRGGHTYYVD<br>SVRG | 264 | SSRHLGLNPNRD<br>YDY  |
| AS64380VH<br>5 | 245 | GNTYSSN<br>YMG | 255 | VIYTRGGHTYYVD<br>SVRG | 265 | SSRHLGLNPNRD<br>YDY  |
| AS64380VH<br>6 | 246 | GNTYSSN<br>YMG | 256 | VIYTRGGHTYYVD<br>SVRG | 266 | SSRHLGLNPNRD<br>YDY  |
| AS64380VH<br>7 | 247 | GNTYSSN<br>YMG | 257 | VIYTRGGHTYYVD<br>SVRG | 267 | SSRHLGLNPNRD<br>YDY  |
| AS64511VH<br>4 | 248 | RATYSTN<br>YIS | 258 | TITGDTGETAYADS<br>VKG | 268 | NLRIGGDWFDGR<br>DFRA |
| AS64511VH<br>5 | 249 | RATYSTN<br>YIS | 259 | TITGDTGETAYADS<br>VKG | 269 | NLRIGGDWFDGR<br>DFRA |
| AS64511VH<br>6 | 250 | RATYSTN<br>YIS | 260 | TITGDTGETAYADS<br>VKG | 270 | NLRIGGDWFDGR<br>DFRA |
| AS63997VH<br>4 | 251 | FSGYGVS<br>TMA | 261 | AITVGSGNTYYADS<br>VKG | 271 | GYLSSGSDWVPG<br>RYNY |
| AS63997VH<br>5 | 252 | FSGYGVS<br>TMA | 262 | AITVGSGNTYYADS<br>VKG | 272 | GYLSSGSDWVPG<br>RYNY |
| AS63997VH<br>6 | 253 | FSGYGVS<br>TMA | 263 | AITVGSGNTYYADS<br>VKG | 273 | GYLSSGSDWVPG<br>RYNY |

[0270] 表6.抗DLL3人源化sdAb氨基酸序列

| SEQ ID | 人源化 sdAb | 氨基酸序列 |
|--------|----------|-------|
| [0271] |          |       |

|        |     |            |  |
|--------|-----|------------|--|
|        | 355 | AS64380VH4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPG<br>KGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNS<br>LRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLTVTVSS |
|        | 356 | AS64380VH5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPG<br>KGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNS<br>LRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLTVTVSS |
|        | 357 | AS64380VH6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPG<br>KGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNS<br>LRAEDTAMYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLTVTVSS |
|        | 358 | AS64380VH7 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPG<br>KGREEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNS<br>LRAEDTAMYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLTVTVSS |
|        | 359 | AS64511VH4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGK<br>GLEAVATITTDGETAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGLTVTVSS  |
|        | 360 | AS64511VH5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGK<br>GLEAVATITTDGETAYADSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLR<br>AEDTAMYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGLTVTVSS  |
| [0272] | 361 | AS64511VH6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGK<br>GREAVATITTDGETAYADSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLR<br>AEDTAMYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGLTVTVSS  |
|        | 362 | AS63931VH4 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAGSFSGYGVSTMAWFRQAPG<br>KGLEGVAAITVGSNTYYADSVTGRFTISRDNKNTLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCAAGWLSGGSWHVPGRYNYWGQGLTVTVSS  |
|        | 363 | AS63931VH5 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAGSFSGYGVSTMAWFRQAPG<br>KGLEGVAAITVGSNTYYADSVTGRFTISRDNKNTVYLQMNS<br>LRAEDTAMYYCAAGWLSGGSWHVPGRYNYWGQGLTVTVSS  |
|        | 364 | AS63931VH6 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAGSFSGYGVSTMAWFRQAPG<br>KREGVAAITVGSNTYYADSVTGRFTISRDNKNTVYLQMNS<br>LRAEDTAMYYCAAGWLSGGSWHVPGRYNYWGQGLTVTVSS   |
|        | 365 | AS63997VH4 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPG<br>KGLEGVAAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS<br>LRAEDTAVYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLTVTVSS  |
|        | 366 | AS63997VH5 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPG<br>KGLEGVAAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNS<br>LRAEDTAMYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLTVTVSS  |
|        | 367 | AS63997VH6 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPG<br>KREGVAAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNS<br>LRAEDTAMYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLTVTVSS   |

[0273] 将骆驼及人源化sdAb序列与人类IgG1铰链及Fc融合,产生嵌合及人源化HCAb序列。合成编码这些HCAb的DNA且插入pTT5载体中。使用HCAb表达质粒转染HEK293细胞。分泌至培养基中的粗HCAb蛋白如下进行SPR亲和力量测:简言之,使用EDC活化的胺偶合化学过程,将捕捉抗体抗人类Fc pAb (GE healthcare) 固定在Biacore™CM5芯片上,至大约6,000RU。所关注HCAb经300秒捕捉至传感器芯片表面上。人类DLL3 (AdipoGen, AG-40B-0151) 以一系列递增浓度流过传感器芯片表面。监测缔合及解离阶段。使用10mM甘氨酸-HCl的pH 2.0缓冲液在各循环之间移除所捕捉的抗体及抗原,以确保抗原的结合表面新鲜。使用1:1结合模型,总体上拟合所得传感图,以计算缔合及解离速率(分别ka及kd)以及亲和力( $K_D$ )。

[0274] 量测一些人源化sdAb的结合亲和力且比较原始骆驼sdAb的结合亲和力(表7)。大部分人源化抗体保持骆驼sdAb的结合亲和力。本实例证明使用标准方案的sdAb人源化是成功的。大部分sdAb在人源化后保持其结合亲和力。

[0275] 当用与上述相同的程序测定时scFv具有相当的 $K_D$ 值(表7中的AS56788及

AS56704)。

[0276] 表7. 骆驼及人源化抗体以及scFv的单价结合亲和力。

[0277]

| 配体         | ka (1/Ms) | kd (1/s) | $K_D$ (M) |
|------------|-----------|----------|-----------|
| AS64380    | 6.7E+05   | 5.6E-03  | 8.4E-09   |
| AS64380VH4 | 3.1E+05   | 4.4E-03  | 1.4E-08   |
| AS64380VH5 | 5.9E+04   | 1.5E-03  | 2.6E-08   |
| AS64380VH6 | 8.8E+04   | 1.5E-03  | 1.7E-08   |
| AS64380VH7 | 3.2E+04   | 1.5E-03  | 4.5E-08   |
| AS64511    | 1.3E+05   | 4.0E-04  | 3.0E-09   |
| AS64511VH4 | 1.6E+05   | 9.4E-04  | 6.0E-09   |
| AS64511VH5 | 1.6E+05   | 4.7E-04  | 2.9E-09   |
| AS64511VH6 | 1.4E+05   | 4.8E-04  | 3.4E-09   |
| AS63997    | 3.9E+05   | 6.4E-03  | 1.6E-08   |
| AS63997VH4 | 8.4E+05   | 1.8E-02  | 2.1E-08   |
| AS63997VH5 | 5.8E+05   | 2.1E-02  | 3.7E-08   |
| AS63997VH6 | 1.8E+06   | 6.0E-02  | 3.3E-08   |
| AS64617    | 1.9E+05   | 3.8E-03  | 2.0E-08   |
| AS69443    | 9.4E+04   | 9.0E-05  | 9.6E-10   |
| AS63931    | 3.6E+06   | 1.7E-01  | 4.7E-08   |
| AS64047    | 1.4E+05   | 9.6E-04  | 6.7E-09   |
| AS64052    | 1.0E+05   | 4.1E-04  | 4.0E-09   |
| AS64062    | 1.0E+05   | 7.1E-04  | 6.9E-09   |
| AS56788    | 1.3E+05   | 3.0E-03  | 2.3E-08   |
| AS56704    | 6.60E+04  | 5.59E-04 | 5.59E-09  |

[0278] 实例8. 单特异性人源化CAR的产生

[0279] 上述表6中列出抗DLL3人源化sdAb的氨基酸序列,且在SEQ ID NO:449-461中列出抗DLL3人源化sdAb的核酸序列。表6中的人源化sdAb及另外的序列用于产生完全CAR构建体 (SEQ ID NO:485-494)。全长CAR自N末端至C末端含有:CD8 $\alpha$ 信号肽 (SEQ ID NO:465)、表6中提供的DLL3结合域(人源化sdAb)、CD8 $\alpha$ 铰链域 (SEQ ID NO:466)、CD8 $\alpha$ 跨膜域 (SEQ ID NO:467)、CD137胞内结构域 (SEQ ID NO:468)或CD28胞内结构域 (SEQ ID NO:469)及CD3 $\zeta$ 胞内结构域 (SEQ ID NO:470)。图1中显示CAR构建体的示意图。接着将编码CAR片段的核酸克隆至慢病毒载体中以在单个编码框中建立全长CAR构建体,使用人EF1 $\alpha$ 启动子进行表达。所得CAR主链载体命名为“PLLV-hEF1 $\alpha$ -DLL3”。

[0280] 实例9. 人源化抗DLL3 CAR-T细胞的活体外活性的评估

[0281] 类似于实例4中所述的程序,经由CAR-T细胞介导的肿瘤细胞杀死、细胞因子释放及长期刺激测定评估人源化CAR的效力。

[0282] 活体外细胞毒性测定

[0283] 结果显示于图6A-6D中。人源化CAR-T展示优良的活体外抗肿瘤功效。

[0284] IFN- $\gamma$ 释放测定

[0285] 另外,自活体外细胞毒性测定收集上清液,以评定CAR诱发的细胞因子释放,例如干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 及肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 释放。如图7A及图7B所示,CAR3CAR-T及一些抗DLL3 CAR-T经SHP-77刺激,产生IFN- $\gamma$  及TNF- $\alpha$ ,而UnT几乎不产生IFN- $\gamma$  或TNF- $\alpha$ 。

[0286] 通过长期刺激测定确定CART扩增

[0287] 在第0天,将 $1 \times 10^5$ 个SHP-77细胞接种在24孔盘中以建立单层。在第1天,计数CAR-T细胞且在新鲜培养基中在缺乏细胞因子下将 $2 \times 10^5$ 个活CAR<sup>+</sup>T细胞接种在SHP-77细胞上面。在第3天,将新的 $1 \times 10^5$ 个NCI-H82细胞单层接种在CAR-T细胞上面。在第4天,计数每个孔的活CAR-T细胞。在同一天,将来自经扩增的孔的 $2 \times 10^5$ 个CAR<sup>+</sup>T细胞(具有至少这个量的细胞)再接种以建立新的单层,如在第1天。重复该过程以提供3-4轮刺激。每次刺激后的扩增倍数计算为[第4天的活CAR<sup>+</sup>T细胞]/ $2 \times 10^5$ ,每次刺激第1天接种的CAR T细胞的量。为对每次新刺激下丢弃的细胞归一化,通过[(扩增倍数)  $\times$  (扩增倍数+1)  $\cdots$ ]确定累积扩增倍数。

[0288] 在3轮刺激后,计算不同CAR-T构建体的扩增倍数。如图8所示,在SHP-77肿瘤细胞的3轮刺激下,大部分CAR-T构建体扩增超过CAR3 CAR-T。

[0289] 实例10.通过CAR-T细胞介导的肿瘤生长抑制对人源化CAR进行活体内功效评估

[0290] 在SHP-77肿瘤模型中评估人源化CAR的抗肿瘤活性。SHP-77细胞皮下植入NOD/SCID小鼠中且随机化成9组(每组4只小鼠,第0天):媒剂(仅仅PBS)、UnT(阴性对照)、CAR3、CAS64380、CAS64380VH5、CAS64511、CAS64511VH5、CAS63997及CAS63997VH5。当肿瘤可触知( $100\text{mm}^3$ )时开始用CAR-T细胞、UnT细胞或媒剂(仅仅PBS)治疗,且当肿瘤体积达约 $3000\text{mm}^3$ 时对小鼠施以安乐死。每周量测肿瘤体积2次。静脉内施用CAR-T细胞,各小鼠 $0.2 \times 10^6$ 个CAR阳性T细胞。在肿瘤细胞植入后监测小鼠及肿瘤约21天。

[0291] 如图9A-9J所示,在这个动物模型中,与基准CAR3相比,CAS64380VH5及CAS63997VH5展示优良抗肿瘤活性。

[0292] 未观察到这些人源化CAR的抗肿瘤活性与其在活体外的细胞杀死效力相关。

[0293] 以下列出本文中中提到的一些氨基酸序列及核酸序列。

[0294] 骆驼sdAb核酸序列

[0295] SEQ ID NO:368(骆驼sdAb AS63930核酸序列)

[0296] GAGGTGCAACTGGCGGAGTCTGGGGAGGATCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATACACCTACAGTGGCAACTATATGGCCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAACGAGCGCGAGGGGGTCGC AGTTGTTTATAATATTGACGGTGGCGGTCTTTCACTACCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCC GAGGCAACGACAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATAGTGGCATGTACTACTGTGCG GCAGAGGTAGCTGATCCGACCTGGGGTTCGCGTGACCAAAGACGATATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCAC CGTCTCCTCA

[0297] SEQ ID NO:369(骆驼sdAb AS63932核酸序列)

[0298] CAGGTGCAATTGGAGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA GCCTCTGGATACACCTACGGTAGCACCTTCATGGGCTGGTTCGCCAGAATCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCGC AGTTATTTATACTGGTGGTGGTAGTACATGGTATGCCAGCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCCAGGACAACG CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGGTTAC GGGTCCGGAAACGTTAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0299] SEQ ID NO:370 (骆驼sdAb AS63951核酸序列)

[0300] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCGCCTGTGAA  
ACCTCTAGAGACATCTACGGTAACAACATGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGAGTCGC  
GTCTATTTATCCTGCTGGTGGTCGCCCCTACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTACTACTGCGCGGCACGCTCT  
TTTTCGATAGCAGTTTGC GCGACGCGCTCTGGTATTACCAGGTCTAATTTTGCTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGT  
CACCGTCTCCTCA

[0301] SEQ ID NO:371 (骆驼sdAb AS63984核酸序列)

[0302] CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACAGTAGCAACTTCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AACTATTGTTTTCTGGTGGTGGTACCACATACTATGCCGACTCCGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGGGGC  
CCCCTTACGAACGCACCTAGATGGTACCCCTCCGACCTCCTGGTTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTAC  
CGTCTCCTCA

[0303] SEQ ID NO:372 (骆驼sdAb AS63987核酸序列)

[0304] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAA  
GCCACTGGATATAGAACTGCATGGCCTGGTTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGAACGCGAGGGGGTTCGAGTTATTTA  
TACTCCTAGTGGTATCACGGACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAACAACGCCAGGAACA  
CGCAGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGATCGACCCTTTGTT  
TGTAATATAGCGAATATGAGAAGGTCTCCAACCTGGGGCCGGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA

[0305] SEQ ID NO:373 (骆驼sdAb AS63997核酸序列)

[0306] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GGCTCTTTCTCTGGATACGGCGTCAGTACCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AGCTATTACAGTTGGTAGTGGAAACACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAACG  
CCAAGAGGACGGTGTTTTTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGTCGGATAC  
TTGTGCGGTGGTAGTTGGGACGTTCCCGGAAGGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA

[0307] SEQ ID NO:374 (骆驼sdAb AS64047核酸序列)

[0308] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTCAGTACGTTTACAGGTGGGACCTCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGCGGTTCGC  
TGCTGTTTATACTGGTGATGGTATTACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACGATTTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGGCATGTACTTCTGTGCGGCAGGCTTC  
GTCTCTGGTGGTAGATGGAACCAGTCATATCGTTATAAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA

[0309] SEQ ID NO:375 (骆驼sdAb AS64052核酸序列)

[0310] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACCGCAGCAACTTCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGATTCGC  
AACTATTCACTTCTGGTGTGGTACCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGGGGC  
CCCCCTGCGAACGCTGATAGATGGTACCCCTCCGACCTCCTGGTTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTAC  
CGTCTCCTCA

[0311] SEQ ID NO:376 (骆驼sdAb AS64062核酸序列)

[0312] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGTTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTAGATCTCCCTACAGTAGCAGTAGGTGCATGGGGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGT  
CGCAGCTCTTTATACTGGTGGTGGTAGCACATCCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACA  
ACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGTT  
GTCCCTAGGGGTGGTAGCTGCCGTCTTGATGAAAGAGGGTATTACCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTC  
CTCA

[0313] SEQ ID NO:377 (骆驼sdAb AS64072核酸序列)

[0314] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCCGAGGGTTTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
CTCTCTGGATACAGCTACTATATTAACCTTGATGGCGTGGTTCGTCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGCAGTCGC  
AGCTCATGGTCTGTGAGTGGGACAGCATACTATAACCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACCCCG  
GCAAGAACACGATGTATCTTCAAATGTTTAGCCTGCAACCGGAGGACACTGCCCTCTACTACTGTGCGGCGGAAACG  
ACTATGGGTTGGGCCACGAACGCGGTATAGGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0315] SEQ ID NO:378 (骆驼sdAb AS64097核酸序列)

[0316] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAA  
GCCTCTGGATACACCTACAGTCGCAACTGCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AGCTATTAACACTGGTGGTGGTAGCACATATTATGCCGACTCCCTGAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAATACTATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGTCCC  
GATCTCGGTGGTAGCTGGTGTGCGCCCGTTGAGCGGGCTTTTACGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTC  
CTCA

[0317] SEQ ID NO:379 (骆驼sdAb AS64114核酸序列)

[0318] CAGGTGCAACTGCAGGAGTCTGGGGGGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGACACTCTCCTGTGAA  
GCCTCTGGAAACACCTACAGTACTAATTACATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAAGAGGTTCGC  
GGTTATTTACACTCGTGGTGGTCACACATACTATGTCGACTCCGTGAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGCTTCA  
CGACATAGACTCCGTTTAAATAACCCACGGGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0319] SEQ ID NO:380 (骆驼sdAb AS64123核酸序列)

[0320] CAGGTGCAACTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACTTATACGAGCAACTGGCTGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGAGGTTCGC  
AATTATTTATACTGGTAGTGGTAGTACACACTATCGCAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGTTTC  
TCAGAGTATAATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0321] SEQ ID NO:381 (骆驼sdAb AS64130核酸序列)

[0322] GAGGTGCAACTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACCGTAGCAACTTCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCGGCGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AACTATTGATTCTCGTGGTACTATCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
AGAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGGGGC  
CCCCGCACGAACGATGATAGATGGTACCCCTCCGACCTCCTGGTTATACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCAC  
CGTCTCCTCA

[0323] SEQ ID NO:382 (骆驼sdAb AS64137核酸序列)

[0324] CAGGTGAGGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCT  
GCCTCTGGATCCACCTACAGTACAACTTCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AACGCTGGTTACTTGGGTTGAACGCACAGCCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACCGCG  
CCAAGAACACGGTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGCCGCC  
GCTTCCACTGATGTACGTCTCCTCGACCCGGGGACTTTGCTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
A

[0325] SEQ ID NO:383 (骆驼sdAb AS64142核酸序列)

[0326] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGACAGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GCCTCTGGATTCACTTTTGATCGTAATGCCATGCGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCTC  
ATGTATTGATTGGACGGGTGCAAATATTGCCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACG  
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGGCATGTATTACTGTGCGGCAGATACG  
ACGTCGGGTATTGTTTCAGGCTTTTGGTCTACGAGCCGGTACTCATGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
A

[0327] SEQ ID NO:384 (骆驼sdAb AS64154核酸序列)

[0328] CAGGTGCAATTGAAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GCCTCTGGATACACCTACAGATACCTCTACATGGGCTGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
ATGTATTTATACTGGTAGTGGTAGCACAGGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAAGTTCC  
CCCCGGTGGGGCGGTACCTGTCGACGCTGGTCTCAGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
A

[0329] SEQ ID NO:385 (骆驼sdAb AS64160核酸序列)

[0330] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCG  
GCCTCTGTATACACCAGCAGTAGCTACTGCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AGCTATGTGTTTTGGTGGTCTTGTACACACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAATG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGATTTCC  
GGCAGGGATAAAAACTATTTACGACCGTACTGCCCCATGCATATAACTACTGGGGCCAAGGGACCCAGGTCACCGT  
CTCCTCA

[0331] SEQ ID NO:386 (骆驼sdAb AS64228核酸序列)

[0332] CAGGTGCAATTGAAGGAGTCTGGGGGAGGTTGATCCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGAGTCTCCTACAATAGGTGCAGTATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCGCGAGTTGGTCTC  
ACGTATTCAGCCGGGTGTAATACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCCAAGACAACGCCA  
AGAACACAGTATCTCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTAACGCACTGTGCTGG  
CGGGAGAATGTTAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0333] SEQ ID NO:387 (骆驼sdAb AS64300核酸序列)

CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGACTGGAGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAGACATCTATAACCTCATGTGATGGCCT  
GGTTCGCCGGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGCATATATTAATACTATTATTGGTAACACATACTATACT  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGGATAACTCCAAGAACACTTTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAA  
ACCTGAGGACACAGCCATGTACTACTGTGCGGCTTCAATTACGAGGTGCCTGGTACGAGGAACGCAGCTATAAAT

ACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0334] SEQ ID NO:388 (骆驼sdAb AS64380核酸序列)

[0335] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGACTCTCCTGTGAA  
GCCTCTGGAAACACCTACAGTAGTAATTACATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGAGGTTCG  
GGTTATTTACACTCGTGGTGGTCACACATACTATGTCGACTCCGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGTCTTCA  
CGACATAGACTCGGTTTTAAATAACCCACGGGACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0336] SEQ ID NO:389 (骆驼sdAb AS64395核酸序列)

[0337] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCT  
GCCTCTGGATCCACCTACAGTACAACTTCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AACGCTTGTTACTTGGGCTGAACGCACAGCCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACCGCG  
CCAAGAACACGGTGTATCTACAAATGAACGGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGCCGCT  
TCCACTGCTGTACGTCTCCTCGACCCGGGGGACTTTGCTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0338] SEQ ID NO:390 (骆驼sdAb AS64443核酸序列)

[0339] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATATAACCGACAGTAGCGTCTACATAGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGAGGTTCG  
GATTATTTATACTGGTGGTGAAGCACACACTATCGCAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAGCACGATTC  
CCAGCTGTTACCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0340] SEQ ID NO:391 (骆驼sdAb AS64511核酸序列)

[0341] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTAGAGCCACCTACAGTACCAACTACATAAGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGCGGTTCG  
ACAATTACTACTGGTGTGGTGGAGACAGCGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAACG  
CCAAGAACACGGTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGAACTTG  
CGAATCGGTGGCGACTGGTTCGACGACGCGATTTTCGTGCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0342] SEQ ID NO:392 (骆驼sdAb AS64536核酸序列)

[0343] CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTAGATACACCGACAATTTCTGTACATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
ACTGATTTATCCTGGTGGTGGTAGCACCTACTATGCCTCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGGGCACGGTGCATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAAAATGG  
GGGCTGGGCGGGGGGGGCTGAAATCAGATACGTATATGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0344] SEQ ID NO:393 (骆驼sdAb AS64597核酸序列)

[0345] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACCGTGTCAACTTCATGGGCTGGTTCGCCAGACTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AACTATTGATTCTGGTGTGGGTACCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCATAACAACG  
CCAAGAACACGATTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGGGG  
CCCCCTACGGACGGTGATAGATGGTACCCCTCCGACCTCCTGGTTATAACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCAC  
CGTCTCCTCA

[0346] SEQ ID NO:394 (骆驼sdAb AS64617核酸序列)



[0347] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACTGATAGATGCAGCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTGGTCTCGCG  
TATTAGCACGAGCGGTTTCACAACTACGCAGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCCAAGACAACGCCAAGA  
ACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAACCCCGGGGACACGGGCATGTATTACTGTGCCATAATCGTAGGACGT  
ACTTGTAGTTTTGAACTACTGGGGCAACGGCATCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0348] SEQ ID NO:395 (骆驼sdAb AS64634核酸序列)

[0349] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCCGGATACAGTTTTAGAGGCGACTTTATGTGTATGGGCTGGTTCGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCGCGAGGG  
GGTCGCAGTTTTTTATCCTGGTGGCGGCAGCACAACCTATGCCGACTCCGCGAAGGGCCGATTACCCATCTCCCAAG  
ACAACGCCAAGAACACGATGTATCTGCAAATGAACACCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCT  
CGACGGTGGGTCAGTGGTACCTGCTACTGGGATAGTACTTTCATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTC  
CTCA

[0350] SEQ ID NO:396 (骆驼sdAb AS69498核酸序列)

[0351] CAGATGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGAAACACCTACAGTACCAATTACATGGCGTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGAGGTTCG  
GGTTATTTACTACTCGTGGTGGTCACACCTACTATATCGACTCCGTGAGGGCCGATTACCCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATAAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGTCTTCA  
CGAATTAGACTCCATTGAATCGACCCACGGGACTATCACGACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0352] SEQ ID NO:397 (骆驼sdAb AS69500核酸序列)

[0353] CAGGTGAGGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCGACAGATACACCTACAGTAGCGCTGCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
CTCTATTTTTACTGGTACTGGTGGTAGCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCCAAGACA  
ACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATATACTACTGTGCGGCAAGG  
GCCTTCCAGGTCGGTACTGCTACCTGCGAACCGATGTGTATACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTC  
CTCA

[0354] SEQ ID NO:398 (骆驼sdAb AS69527核酸序列)

[0355] GAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTCCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTAGATACACCTTCAGTAGCACCTGCATGGCCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGAGGTTCG  
AGCTATTTATACTGATGATGGTAGCACATGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCTATGTACTACTGTGCGGCACGTAGG  
TGGGCGTGCCCCAGGGTTGGTAGCTGGCATGAGTTCGCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0356] SEQ ID NO:399 (骆驼sdAb AS68280核酸序列)

[0357] CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCACCCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATCCACCTACAGTTCCAACCTACCTCGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCGCGACTGGGTTGC  
GGCTATTAGCACTGGTGACGGTGCCACAGCCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACAGTCCATGTACTACTGTGCGGCGGCTTCG  
GGCAGATTTATCGATTGGACAAAGGCAACCCAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0358] SEQ ID NO:400 (骆驼sdAb AS68355核酸序列)

[0359] CAGATGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA

GCCTCTGGATACACCTACAGCGGCGTCTGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AGCTATTGATAGTGATGGTAGCACAAAGCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACAACGCCA  
AGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGCCATTGTC  
GGGGGTTTTAATGCATATTGTAGTGGTGGTTATGTTCTGGACTTTGGTGCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGT  
CTCCTCA

[0360] SEQ ID NO:401 (骆驼sdAb AS69443核酸序列)

[0361] GAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTTCA  
GCCTCTGGTTTTCACTTTTGATGATTCTGACATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGGATGGGTGCGACTTGGTCTC  
AACTATTAGTAGTGATGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACGCCA  
AGAACACGGTGTATCTGCAAATGCACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCAGATTTCTC  
ACCGGCTTTTACTATAGCGACTCCCCCATCCGGCCCTTGTCTGCATCCGACTTTGGTTACTGGGGCCAGGGGAC  
CCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0362] SEQ ID NO:402 (骆驼sdAb AS75376核酸序列)

[0363] CAGGTGCAATTGAAGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACAGTAGCCACTCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AGTTATTTATACTGGTGATGGTAGCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGATCCG  
AACCCCGATTATATGCTTCCGTTTCGGCCGTCCCGTAGGTCGTGGTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
A

[0364] SEQ ID NO:403 (骆驼sdAb AS75387核酸序列)

[0365] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACCCCTACAGTAGCCCTGCATGGCCTGGTTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTTT  
AGTTGCTTATACTGGTGGGGACATTCAATACCTTACCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGGATCTG  
CGATTACCTCGTGCCGGCGTTGTGCGTATAGCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0366] SEQ ID NO:404 (骆驼sdAb AS75695核酸序列)

[0367] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTGGATACACCGTCAGTGCCTACTGTATGGGCTGGTTCCGCCAGGTTCTAGGGAAGGGGCGCGAGAGGATCGC  
ATTTATCGATGCCGGGGGTGCTACGATTTACGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACAACGCCA  
AGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGTTGCAGATCGCCGG  
GGGCGGGTACGTCGGTGCAGTATAACGCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0368] SEQ ID NO:405 (骆驼sdAb AS76169核酸序列)

[0369] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACATTTACAGTAGCTTCTGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGTGGTTCG  
GTATATTCGCGATAATATTATGACAAGTTACACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACAACGCCA  
AGAGAACTCTGTATCTACAAATGAACGGCCTGAAACCTGAAGATACTGGCATGTACTACTGTGCGGTAGACCGGGGG  
GGATACGCTAATAGTTGCGCGGTAGCGGCCCGGTATGATTACTGGGGCCGGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0370] SEQ ID NO:406 (骆驼sdAb AS63931核酸序列)

[0371] GAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA

GGCTCTTTCTCTGGATACGGCGTCAGTACCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AGCTATTACTGTTGGTAGTGGAAACACATACTATGCCGACTCCGTGACGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAACG  
CCAAGAGGACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCCGGATGG  
TTGTTCGGGTGGTAGTTGGCACGTTCCCGCAGGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0372] SEQ ID NO:407 (骆驼sdAb AS63937核酸序列)

[0373] CAGGTGAAGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATCCACCATCAGTAGTCGCCCAGTGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
GTGTATACATACTGGTCTTGGTAGAACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGACTCG  
CGGCGGCCGTGTATGGTAGCCGAGGGTATACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0374] SEQ ID NO:408 (骆驼sdAb AS63948核酸序列)

[0375] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GCCTCTGGATACACCTATAGATACCTCTACATGGGCTGGTTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
ATGTATTTATACTGGTAGTGGTAGCACAGGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCGAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGCTTCG  
CCCCGGTGGGGTGGTACCTGTGACGGTGGTCCGAGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC

A

[0376] SEQ ID NO:409 (骆驼sdAb AS63956核酸序列)

[0377] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCCGGATTCACCTACAGTAACTGCTGCATGAGGTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGCGCGAGTTGGTCTC  
ATTAATTAATAGTAGTGGTGGCACATACTATGCAGACTCTGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACAACGCCA  
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGGCTTACCAAGCC  
AAGTACTGTTACAGGCCCTTGCGCCCCCCAACTGACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0378] SEQ ID NO:410 (骆驼sdAb AS63965核酸序列)

[0379] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTGGATACAGCAGCGGTAGTTGTCGCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTGGTTTC  
AAAGGTTATTAGTGATGGTACTACAGTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCCTCTCCCAAGGAAACGCCA  
AGAACACGGTGTATCTGCAAATGAGTAGCCTGTTACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTAATGCATGGTGTAGG  
GAGTATCCCGGGGGATCCTGAATAACGGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0380] SEQ ID NO:411 (骆驼sdAb AS63993核酸序列)

[0381] CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGGGCTTGGTGCAGGCAGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GTTTCTGGATTCACTTTTCGATGACCTCGTCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCCAACCTTGTCTC  
GTTGGTTGCGACTGCTGGTAATAGCGTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACTCTCCAGAGACAACGCCC  
ACAGCACGGCGTATCTGCAAATGAACGGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGGCACGTACCGAT  
TCTGAGCATGCGTTTAAAGTTCTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0382] SEQ ID NO:412 (骆驼sdAb AS63999核酸序列)

[0383] GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACTTACAGTAGCAACTGGATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGAGGTTCG  
AATTATTTATACTGGTGGTATTAGTACACACTATCGCAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG

CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGCGTTAT  
ACAGACTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0384] SEQ ID NO:413 (骆驼sdAb AS64006核酸序列)

[0385] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAA  
GTCTCTGGATACACCGGCGATACGACTTACATAGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
ACTTATTTATACTAGTGGTACTAGCGAGTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCCGAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATTTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGGCGCACGGAGC  
CGCACGATGATGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0386] SEQ ID NO:414 (骆驼sdAb AS64057核酸序列)

[0387] CAGGTGCAATTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTGCAGACAGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GCCTCTGGATTCACTTTTGATCGTAATGCCATGCGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCTC  
ATGTATTAGTTGGACGGGTGCAAATATTGCCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACG  
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGGCATGTATTACTGTGCGGCAGATACG  
ACGTCGGGGTCTTGTTCAGGCTTTTGGTCTACGAGCCGGTACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
A

[0388] SEQ ID NO:415 (骆驼sdAb AS64060核酸序列)

[0389] CAGGTGAAGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATCCACCTACTGTACCTACCGTATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTCGTTCG  
AGTTATTGATAGTGGCGGTAGCACAAGCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCCGAGACAACGCCA  
AGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTAACACAGATCCAACC  
ATCGGCTGCCCCCAGACATATAGGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0390] SEQ ID NO:416 (骆驼sdAb AS64071核酸序列)

[0391] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTGGAAACACTTACAGGCTCAACTCTATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
ATTTATTGTTATGATTAGAGGTACCACATACTATGGCGCCTCCGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCCAAGACAACG  
CCCAGACCACGGTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAAACCGGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCATCCACT  
AAGGACCAGTTTTATGTATTTAATCCTATTGGGTATGACTCTTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0392] SEQ ID NO:417 (骆驼sdAb AS64093核酸序列)

[0393] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
ACCTCTAGATACATCTACGGTAACAACCTGCATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGAGTTCG  
GTCTATTTATCCTGCTGGTGGTGCACGTAATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATTGACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTACTACTGCGCGGCACGCTCT  
TTTTCGATAGGAGTTTGC GCGACG CAGTCTGGTATTACCTGGTCTAATTTTGCTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGT  
CACCGTCTCCTCA

[0394] SEQ ID NO:418 (骆驼sdAb AS64118核酸序列)

[0395] CAGGTGCAACTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACAGTGCCTGTAGAATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCCGGGAAGGAGCGCGAGTTGGTTTC  
ATTTATTAATAGTGTGTAGCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCGCCATCTCCCGAGACAACGCCA  
AGACAACGGTGTATCTACAAATGAACGCCCTGAAAGCTGAGGACACGGCCATATATTACTGTAACACATGGGATAGT

AGCTGCCGCTTTCAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0396] SEQ ID NO:419 (骆驼sdAb AS64120核酸序列)

[0397] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAA  
ACCTCTAGATACATCTACGGTAACAACCTGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGAGTCGC  
GTCTATTTATCCTGCTGGTGGTCGCCCTACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAAGACAAC  
GCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAAATGGACAGCCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCCATGTACTACTGCGCGGGCA  
CGCTTCTTTTTTTCGATAGCAAATTGCGCCAACGCAATCCTGGTATTAACCAGGGCCAAATTTTGGCTTACGGGGGCC  
AGGGGACCCAGGTCACCCCTTCTCCTCA

[0398] SEQ ID NO:420 (骆驼sdAb AS64124核酸序列) CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGG

CTCGGTGCAGACTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTACGTACACCCCCAGTAACAACCTACATGGGCT  
GGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGCGTCGCGGCTATCGCTACTATTGGTGGTACCACACGTTATGCC  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACGGCGCCAAGAACACGATATATCTGCAAAATGAACGGCCTGAA  
ACCGGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCCGGGCGGCCATACTCATTACCCTTACCCTTACCCTTGGAAAGCG  
GTGCGTATCGCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0399] SEQ ID NO:421 (骆驼sdAb AS64135核酸序列)

[0400] CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTACATCAACCTACTGTAGGTACTACATGCGCTGGTACCGGCAGGCTCCAGGGAAGAGCGCGAGTTTCGTCTC  
AGCGATGCAACCCGATGGTACGACAAGCTACTCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATGTCCCAAGACAGAGCCA  
ACAATATGTTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGGCCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTAAGAGATCCAATG  
GGGGTTCAAGGACCCCGTGCACCTCCGCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0401] SEQ ID NO:422 (骆驼sdAb AS64163核酸序列)

[0402] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GTCTCTGGATACAGATATAGATGGAACCTGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AGCTATTTCTACTGGAAGCGGAAGCACATACTATGCCGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACATGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGATCCTTCG  
GTTTGCCCCGGTGGTATGTGGTACTCCAAAGAGTATAGGTAAGTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0403] SEQ ID NO:423 (骆驼sdAb AS64182核酸序列)

[0404] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGCACA  
GCCTCTGGACAGACCTCCAGATACCTCTACATGGGCTGGTTTCGCCAGACTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
ATGTATTTATACTGGTAGTGGTAGCACAGGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAAACGAATAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAAGTTTCG  
CCCCATTGGGGCGGTACCTGTGACGCTGGTCCGAGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
A

[0405] SEQ ID NO:424 (骆驼sdAb AS64183核酸序列) CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG

CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACACACCTACAGTGCCAACCTGCATGGCCT  
GGTTCCGCCGGGCCCCAGGGAAGGAGCGCGAGTGGTTCGCGTCGGTTTATACTGATGATGATAGACAATGTATAACC  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTTCCAAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAA  
ACCTGAGGACACTGCCATGTACATCTGTGCGGCAGATTTAAGCGGAGGACCGCCGTTGTGGGTATACCCACTGGG  
GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0406] SEQ ID NO:425 (骆驼sdAb AS64207核酸序列)

[0407] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACAGTAGCAACTTCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AACTATTGTTTCTGGTGGTGGTACCACATACTATGCCGACTCCGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGGGGC  
CCCCCTACGAACGGTGCTAAGTGGTACCCCTCCGACCTCCTGGTTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTAC  
CGTCTCCTCA

[0408] SEQ ID NO:426 (骆驼sdAb AS64276核酸序列)

[0409] CAGGTGCACCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGCCTCTCCTGTGTA  
GTCTCTGGATACACCGGCAGTAGCCGCTGTATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGCGGTTCGC  
ACAAATTTTTACTGGTTCGTGGTACCACAGGCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACTATTTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCGAATGAACAGTCTGAGACCTGAGGACACTGCCATTTACTACTGTGCGGCAGTCTC  
GGCCCCGGACCGGAGCCTGTGGGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0410] SEQ ID NO:427 (骆驼sdAb AS64336核酸序列)

[0411] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTAAGACTCTCCTGTACA  
ACCTCTGGACGCACCTACAGTAGCTGCAGCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTGGTCTC  
ACATATTTTTAGTGATGGTAGCAGATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACGCCA  
AGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTAACCGCCGTACGGGT  
TGGGCACCAAGGTGCGCTGTTCCCGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0412] SEQ ID NO:428 (骆驼sdAb AS64346核酸序列)

CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG  
CTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATACACCTATTTTCATGGGCTGGTCCGCC  
AGGCTCCACAGAAGGAGCGCGAATGGGTCGCGACTATTGGTACTGGTGTATTTTCAATGGCGCTGCTTACTATGTC  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTCCGCATCTCCCAAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAA  
ACCTGAAGACACTGCCGTGTACGTCTGTGCGGCAGTTCAATCGAAATCCTCAAACACTACGTGTTGAGAGACGCATCTA  
CCTACAACACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0413] SEQ ID NO:429 (骆驼sdAb AS64420核酸序列)

[0414] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGAAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGAGACACCAGTAGAAGCGTCTGGATGGGCTGGGCCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGTGGTTCGC  
AACCATTAGTACTGCCGGTGGTAGTACATGGTATACCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTACCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATATACTATTGTGCGGCCAGAAGC  
AGATATGCTACCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0415] SEQ ID NO:430 (骆驼sdAb AS64473核酸序列)

[0416] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GCCTCTGGATACACCTACAGATACCTCTACATGGCCTGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
ATGTATTTATACTGGTAGTGGTACCACAGGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAAGTTCCG  
CCCCAGTGGGGCGGTACCTGTGACGCTGGTCCGAGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC

A

[0417] SEQ ID NO:431 (骆驼sdAb AS64475核酸序列)

[0418] CAGGTGCAACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTGGAGTCGCAACTGGATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGTTCGC  
AACTATTACAATTAGTGGTGGTAGCACATGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCTAGACAACG  
CCGGGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGCGGGAT  
ACCGCGCGGACCTACTGGGGCCAGGGTACCCAGGTCACCGTCTCTCTCA

[0419] SEQ ID NO:432 (骆驼sdAb AS64513核酸序列)

[0420] GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTGACTACCCCTACATAGACAACTGCATGGGCTGGTCCGCCAGGGTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AGCTGCGTGTACTGGTGGTGGTAGCACATATTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAACG  
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGACGTGTACTACTGTGCGACAGGCTAC  
TATAGCGGCTCTGGTCCGGGTATTTACTCCATGGAGGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTC  
CTCA

[0421] SEQ ID NO:433 (骆驼sdAb AS64562核酸序列)

[0422] GAGGTGCAACTGGTGGAAATCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCGCTAGGCGCGACTTCATGGCCTGGTCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AGTCATTACTACTGGTGGTGGTACACCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAACG  
CCCAGAACATAATGAATCTGCAAATGAACAGCCTTAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGTTTC  
CGTCCGCGTGGTGGAGGATACACGGGTGACGTCTTGCCAGGCTGCGGCATACTACTGGGGCCAGGGGACCCA  
GGTCACCGTCTCTCTCA

[0423] SEQ ID NO:434 (骆驼sdAb AS64583核酸序列)

[0424] GAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCAGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GCCTCTGGATTCACTATTGCTGTTTATACCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGAATCTC  
ATGTACTAGCTGGGCTGGTGGTGCACATACTGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACG  
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGCAAAGGCA  
CATCCCGACTGTTAGGGGATTGGTCCCATCTGGGTATGAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
A

[0425] SEQ ID NO:435 (骆驼sdAb AS64594核酸序列)

[0426] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACAATAGCAACTACATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
ACTTATTTATACTGGTGGTGGTAGCACATATTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAACG  
CCAAAAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTTGCGTAAGAACG  
CAGACGCGTAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCTCTCA

[0427] SEQ ID NO:436 (骆驼sdAb AS64605核酸序列)

[0428] CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GTTTCTAGATATCCCTACAGCAGCATCTGCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGAGCGAGGGTGTTCGC  
ACGTATTTATACTGGTACTGGTGGTGGTAGCACATGGTATACCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCGCCCCAGACAACG  
CCCAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGCGTAGC  
AATTCATATTCATATTCAAGTTGTGATTACGGCCCCCTCACAGGGGGGGGTATAACTTCTGGGGCCAGGGGACCCA  
GGTCACCGTCTCTCTCA

[0429] SEQ ID NO:437 (骆驼sdAb AS64606核酸序列)

[0430] GAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGGAGGATCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GTCTCTGGATACACCAGCCGTAGCAATTACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
GCTAATTTATACTCGTGGTGGTAGCACATACTATGCCCTCCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCAAGACAGTG  
CCAAGAAAACGTATCTGCAAATGAACAGTGTGAAACCGGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCTTTGCGCCTTGAT  
GAGAAGATGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0431] SEQ ID NO:438 (骆驼sdAb AS68121核酸序列)

[0432] GAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAT  
GCCTCTGGATACACCTACAGCCGCAACTGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AGCGTTCTATACTGATTATATTCGTTTTGGGCGCACATATTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTTCC  
AAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCG  
GCAGATCCTGGGAGTCGTACAGACGATAGTTGTGGTACCTCATAACAAGGAATTTGGTTACTGGGGCCAGGG  
GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0433] SEQ ID NO:439 (骆驼sdAb AS68170核酸序列)

[0434] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA  
GCCTCTGGATACACCTACAGAAGCAACTGTATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AACAACTATACTGGTGGTGGTTCGTAATCTATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACA  
ACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAACAGCCTGAAGCCTGAGGACTCTGCCAGGTACTACTGTGCGGCCGCG  
AGTGACGTGGCAGTTGGTGTAAATTCCTGCGGGGAAGGACTGCGGGGTTGACGCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGT  
CACCGTCTCCTCA

[0435] SEQ ID NO:440 (骆驼sdAb AS63964核酸序列)

[0436] CAGGTGAGGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGATCGGTACAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTCA  
GCCTCTGGATACACCTACAGTTACAACAATATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGAGCGCGAGGGGGTTCGC  
AGCTATTAGTGGTGGTTCGTTTCACCGCCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAACGCCG  
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACACTGGGATGTACTACTGTGCGGCAGAGGTAGTT  
GATCCGACCTGGGGGTTCGCGTGACCAAAGACGATATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0437] SEQ ID NO:441 (骆驼sdAb AS64116核酸序列)

[0438] CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCGTGTGCA  
GCCTCTGGATACATCTACAGTTGCGTGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGCAGGTAT  
TAGTACTGGTGGTGGTGGCACAGTCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCAATTCACCATCTCCCGAGACAACGCCAAGA  
ACACGGTGTACCTGCAAATGGACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGATCGATGGAAT  
TCATTCGCTAATTGCGGTGCCTGGGGAAGGTATACCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0439] SEQ ID NO:442 (骆驼sdAb AS68270核酸序列)

[0440] CAGGTGCAACTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTGGATACCCCTCTTCCACCTACTACATGCTCAGCATGGCGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGA  
GGGGGTTCGCGCTATTACTAGCGGTACTGGGAGACAAGCTACGCAGACTCCGTGAAGGACCGATTACCATCTCCA  
AAGACTACGCCAACAACACTCTGTATCTGCACATAAACAACCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCG  
GCAGCCTCAGGTTGGATCGTTCCTAGTAGGTCCTGACCGCAACCTATATAGGTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGT  
CACCGTCTCCTCA



[0441] SEQ ID NO:443 (骆驼sdAb AS68320核酸序列)

[0442] CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTACAATACCAACTACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AGCTATTTATAGACATAGTGGTAACACAGCCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACTACG  
CCAAGAACACCGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGGCGC  
GCTGGTCCCTGGGCCCTGATGCGCCGACTGAGTTTGGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0443] SEQ ID NO:444 (骆驼sdAb AS68351核酸序列)

[0444] CAGGTGCAATTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCG  
GCCTCTGGAGACACATTTTCGTGCCTATTACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGATTTCGAGTGGGTCTC  
AGGTATTAGCGCCAGTGGCGGCCGTACGTCATACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACG  
CCAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGCACTGAGGACACGGGCATGTATTATTGTGTAAGGGGAGCT  
GTCCGTCTCTCGACATCGTCAGTACGGGATTCGTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0445] SEQ ID NO:445 (骆驼sdAb AS75378核酸序列)

[0446] CAGGTGCAATTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GTCTCTGGAAACACCCGAGTACCACGTACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCG  
AATAGTTTATACTGGTGGTTCGTGACACATACTATGCCGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG  
CCAAGACAACGATCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCACGCTCA  
TATGAGTATACCTACTGGGGTCGGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0447] SEQ ID NO:446 (骆驼sdAb AS75383核酸序列)

[0448] GAGGTGCAACTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTGGATACACCTTCAGTAGCTACTGCTTGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCCAGGGGGTTCG  
AACGTTTAATAATAGAGGTGTCGCAAACCTACCACGATTCGGTGAAGGGCCGATTACCCGCCTCCGTAGACAACGCCA  
AGAACACTCTGCTTCTGCAAATGAACAGCCTGGAACCTGACGACACGGCCATGTACTACTGTGCGGCGGATCGCCGG  
TACGGTTCGTAGTGGTATCAGCCTTGCAGTGGAAACCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0449] SEQ ID NO:447 (骆驼sdAb AS75751核酸序列)

[0450] CAGGTGAGGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCCTCTGGATACTTCTACAATACCTACTACTTTATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGT  
CGCAGCTATTGATACTGATGGTAGAACAAGTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGACAACG  
CCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGTTTT  
GGCTATATGAATGTTATTCAGGCTCTTAATGGCATGAGACAGAATCCCCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCAC  
CGTCTCCTCA

[0451] SEQ ID NO:448 (骆驼sdAb AS76422核酸序列)

[0452] CAGGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATACACCTTCGCTGGCAACTGCTTGGGCTGGTTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCGCGAGGGGGTTCG  
AACGTACAATAACTTCGGTGTGCCAACTACGCCGATTCGGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCCAAGACAACGCCA  
AGAACACTCTGCTTCTGCAAATGAACAGCCTGGAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGGACCCCGG  
GACGGTTCGTGCTGGTCTCAGCCTTGCAGTGGAAATACCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0453] 人源化骆驼sdAb核酸序列

[0454] SEQ ID NO:449 (人源化sdAb AS64380VH4核酸序列)

[0455] GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GCATCTGGAAACACCTACAGCTCCAATTATATGGGATGGTTCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGGAGGTGGC  
CGTGATCTACACCAGGGGAGGACACACATACTATGTGGACTCCGTGCGGGGACGGTTCACCATCAGCAGGGATAACG  
CCAAGAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGTGCAGCATCTAGC  
AGGCACAGGCTGGGCCTGAACAATCCAAGGGACTACGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGCCTCT

[0456] SEQ ID NO:450 (人源化sdAb AS64380VH5核酸序列)

[0457] GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GCATCTGGAAACACCTACAGCTCCAATTATATGGGATGGTTCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGCCTGGAGGAGGTGGC  
CGTGATCTACACCAGAGGGCGCCACACATACTATGTGGACTCCGTGCGGGGACGGTTCACCATCAGCCAGGATAACG  
CCAAGAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGTGCAGCATCTAGC  
AGGCACAGGCTGGGCCTGAACAATCCAAGGGACTACGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGCCTCT

[0458] SEQ ID NO:451 (人源化sdAb AS64380VH6核酸序列)

[0459] GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GCATCTGGAAACACCTACAGCTCCAATTATATGGGATGGTTCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGCCTGGAGGAGGTGGC  
CGTGATCTACACCAGAGGGCGCCACACATACTATGTGGACTCCGTGCGGGGACGGTTCACCATCAGCCAGGATAACG  
CCAAGAACAGCGTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCAGCATCTAGC  
AGGCACAGGCTGGGCCTGAACAATCCAAGGGACTACGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGCCTCT

[0460] SEQ ID NO:452 (人源化sdAb AS64380VH7核酸序列)

[0461] GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GCATCTGGAAACACCTACAGCTCCAATTATATGGGATGGTTCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGAAGAGAGGAGGTGGC  
CGTGATCTACACCAGGGGAGGACACACATACTATGTGGACTCCGTGCGGGGACGGTTCACCATCAGCCAGGATAACG  
CCAAGAACAGCGTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCAGCATCTAGC  
AGGCACAGGCTGGGCCTGAACAATCCAAGGGACTACGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGCCTCT

[0462] SEQ ID NO:453 (人源化sdAb AS64511VH4核酸序列)

[0463] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGCGCA  
GCATCCAGAGCAACCTACTCTACAAACTATATCAGCTGGTTCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGGCAGTGGC  
AACCATCACCACAGGCGATGGCGAGACAGCCTACGCCACTCTGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCC GCGATAACG  
CCAAGAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGTGCAGCAAATCTG  
AGGATCGGAGGCGACTGGTTTCGATGGAAGGGACTTTAGAGCATGGGGACAGGGAACCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0464] SEQ ID NO:454 (人源化sdAb AS64511VH5核酸序列)

[0465] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGCGCA  
GCATCCAGAGCAACCTACTCTACAAACTATATCAGCTGGTTCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGGCAGTGGC  
AACCATCACCACAGGCGATGGCGAGACAGCCTACGCCACTCTGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCC GCGATAACG  
CCAAGAACAGCGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCAGCAAATCTG  
AGGATCGGAGGCGACTGGTTTCGATGGAAGGGACTTTAGAGCATGGGGACAGGGAACCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0466] SEQ ID NO:455 (人源化sdAb AS64511VH6核酸序列)

[0467] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGCGCA  
GCATCCAGAGCAACCTACTCTACAAACTATATCAGCTGGTTCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGAAGGGAGGCAGTGGC  
CACCATCACCACAGGCGATGGCGAGACAGCCTACGCCACTCTGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCC GCGATAACG

CCAAGAACAGCGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCAGCAAATCTG  
AGGATCGGAGGCGACTGGTTTCGATGGAAGGGACTTTAGAGCATGGGGACAGGGAACCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0468] SEQ ID NO:456 (人源化sdAb AS63931VH4核酸序列)

[0469] CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GGCTCTTTCAGCGGATACGGCGTGTCCACCATGGCATGGTTTAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGGGAGTGGC  
AGCAATCACCGTGGGATCCGGAAACACATACTATGCCGACTCTGTGACCGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACA  
GCAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGTGCAGCAGGATGG  
CTGTCCGGAGGATCTTGGCACGTGCCCCGCAGGTACAACCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0470] SEQ ID NO:457 (人源化sdAb AS63931VH5核酸序列)

[0471] CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GGCTCTTTCAGCGGATACGGCGTGTCCACCATGGCATGGTTTAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGGGAGTGGC  
AGCAATCACCGTGGGATCCGGAAACACATACTATGCCGACTCTGTGACCGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACA  
GCAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCAGCAGGATGG  
CTGTCCGGAGGATCTTGGCACGTGCCCCGCAGGTACAACCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0472] SEQ ID NO:458 (人源化sdAb AS63931VH6核酸序列)

[0473] CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GGCTCTTTCAGCGGATACGGCGTGTCCACCATGGCCTGGTTTAGGCAGGCACCTGGCAAGGGAAGGGAGGGAGTGGC  
AGCAATCACCGTGGGATCCGGAAACACATACTATGCCGACTCTGTGACCGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACA  
GCAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCAGCAGGATGG  
CTGTCCGGAGGATCTTGGCACGTGCCCCGCAGGTACAACCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0474] SEQ ID NO:459 (人源化sdAb AS63997VH4核酸序列)

[0475] CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GCCTCTTTCAGCGGATACGGCGTGTCCACCATGGCATGGTTTAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGGGAGTGGC  
AGCAATCACCGTGGGATCCGGAAACACATACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTAGAGATAACA  
GCAAGAATACACTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGTGCCGTGGGCTAT  
CTGTCCGGAGGATCTTGGGATGTGCCAGGAAGGTACAACCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0476] SEQ ID NO:460 (人源化sdAb AS63997VH5核酸序列)

[0477] CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GCCTCTTTCAGCGGATACGGCGTGTCCACCATGGCATGGTTTAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGGGAGTGGC  
AGCAATCACCGTGGGATCCGGAAACACATACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTAGAGATAACA  
GCAAGAATACAGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCCGTGGGCTAT  
CTGTCCGGAGGATCTTGGGATGTGCCAGGAAGGTACAACCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0478] SEQ ID NO:461 (人源化sdAb AS63997VH6核酸序列)

[0479] CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCA  
GCCTCTTTCAGCGGATACGGCGTGTCCACCATGGCCTGGTTTAGGCAGGCACCTGGCAAGGGAAGGGAGGGAGTGGC  
AGCAATCACCGTGGGATCCGGAAACACATACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTAGAGATAACA  
GCAAGAATACAGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCATGTACTATTGTGCCGTGGGCTAT  
CTGTCCGGAGGATCTTGGGATGTGCCAGGAAGGTACAACCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCC

[0480] SEQ ID NO:462 (接头氨基酸序列)

- [0481] GGGGSGGGGSGGGGS
- [0482] SEQ ID NO:463 (接头氨基酸序列)
- [0483] GGGGSGGGGS
- [0484] SEQ ID NO:464 (接头氨基酸序列)
- [0485] GGGGS
- [0486] SEQ ID NO:465 (CD8 $\alpha$ 信号肽氨基酸序列)
- [0487] MALPVTALLLPLALLLHAARP
- [0488] SEQ ID NO:466 (CD8 $\alpha$ 铰链氨基酸序列)
- [0489] TTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
- [0490] SEQ ID NO:467 (CD8 $\alpha$ 跨膜域氨基酸序列)
- [0491] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
- [0492] SEQ ID NO:468 (4-1BB细胞内结构域氨基酸序列)
- [0493] KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
- [0494] SEQ ID NO:469 (CD28细胞内结构域氨基酸序列)
- [0495] RSKRSLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
- [0496] SEQ ID NO:470 (CD3 $\zeta$ 细胞内结构域氨基酸序列)
- [0497] RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE  
AYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [0498] SEQ ID NO:471 (F2A元件氨基酸序列)
- [0499] GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
- [0500] SEQ ID NO:472 (P2A元件氨基酸序列)
- [0501] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
- [0502] SEQ ID NO:473 (CAR3抗DLL3 scFv氨基酸序列)
- [0503] MALPVTALLLPLALLLHAARPAIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRASENIYYNLAWYQQKPGKAPKLLI  
YTANSLEDVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCKQAYDVPPTFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSSQVQL  
VQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYWIHWIRQAPGGGLEWMGYINPTVYTEFNQNFKDRVTMTRDTSTSTVYME  
LSSLRSEDTAVYYCARGGSNFFDYWQGTTVTVSS
- [0504] SEQ ID NO:474 (CD28跨膜域氨基酸序列)
- [0505] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
- [0506] SEQ ID NO:475 (CD28铰链)
- [0507] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP
- [0508] 骆驼抗DLL3 CAR序列
- [0509] SEQ ID NO:476 (CAS63997)
- [0510] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVRLVESGGGSVQAGGSLRLSCAGSFSGYGVSTMAWFRQAPGKEREV  
AAITVGSNGNTYYADSVKGRFTISRDNKRTVFLQMNSLKPEDTAMYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGTQVTVSS  
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [0511] SEQ ID NO:477 (CAS64380)

[0512] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGSVQAGGSLTSCASGNTYSSNYMGWFRQAPGKEREV  
AVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDNAKNTVYLMNSLKPEDTAMYYCAASSRHLGLNPNRDYDYWGQGTQVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0513] SEQ ID NO: 478 (CAS64511)

[0514] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGKEREAV  
ATITTDGGETAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAMYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGTQVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0515] SEQ ID NO: 479 (CAS64617)

[0516] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTDRCSMAWYRQAPGKERELVS  
RISTSGFTNYAASVKGRFTISQDNAKNTVYLMNSLNPEDTGMYYCAIIVGRTCSLNYWNGILVTVSSTTTAPRP  
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPF  
RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0517] SEQ ID NO: 480 (CAS69443)

[0518] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCSASGFTFDDSDMAWYRQAPGDGCDLV  
STISSDGSTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLMHSLKPEDTAVYYCAADFLTGYYSDSPHPAPCSASDFGYWGQ  
TQVTVSSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK  
RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVL  
DKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0519] SEQ ID NO: 481 (CAS63931)

[0520] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAGSFSGYGVSTMAWFRQAPGKEREGV  
AAITVGSNTYYADSVTGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAMYYCAAGWLSGGSWHVPGRYNYWGQGTQVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0521] SEQ ID NO: 482 (CAS64047)

[0522] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVHVESGGGSVQAGGSLRLSCAASQYVYRWDLMGWFRQAPGKEREAV  
AAVYTDGIGITYYADSVKGRFISQDNAKNTVYLMNSLKPEDTGMFYCAAGFVSGGRWNQSYRYKYWGQGTQVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0523] SEQ ID NO: 483 (CAS64052)

[0524] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVHLMESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYRSNFMGWFRQAPGKEREGI  
ATIHSVATTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAMYYCAAGPPANADRWYPLRPPGYNYWGQGTQV  
TVSSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR

KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRR  
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0525] SEQ ID NO: 484 (CAS64062)

[0526] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVRLVESGGGSVQVGGSLRLSCAASRSPYSSSRMGWFRQAPGKERE  
VAALYTGGSSTSYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAAVVPRGGSCRLDERGYHHWQGTQVTV  
SSTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK  
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRR  
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0527] 人源化抗DLL3 CAR序列

[0528] SEQ ID NO: 485 (CAS64380VH4)

[0529] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEV  
AVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGTLVTVSS  
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0530] SEQ ID NO: 486 (CAS64380VH5)

[0531] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEV  
AVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGTLVTVSS  
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0532] SEQ ID NO: 487 (CAS64380VH6)

[0533] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEV  
AVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAMYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGTLVTVSS  
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0534] SEQ ID NO: 488 (CAS64380VH7)

[0535] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGREEV  
AVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAMYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGTLVTVSS  
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0536] SEQ ID NO: 489 (CAS64511VH4)

[0537] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGKGLEAV  
ATITTDGGETAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGTLVTVSS  
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0538] SEQ ID NO:490 (CAS64511VH5)

[0539] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGKGLEAV  
ATITTDGGETAYADSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAMYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGLVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0540] SEQ ID NO:491 (CAS64511VH6)

[0541] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRATYSTNYISWFRQAPGKGREAV  
ATITTDGGETAYADSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAMYYCAANLRIGGDWFDGRDFRAWGQGLVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0542] SEQ ID NO:492 (CAS63997VH4)

[0543] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKLEGV  
AAITVGSNGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0544] SEQ ID NO:493 (CAS63997VH5)

[0545] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKLEGV  
AAITVGSNGTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAMYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0546] SEQ ID NO:494 (CAS63997VH6)

[0547] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKGREGV  
AAITVGSNGTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAMYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLVTVSS  
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0548] 抗DLL3人类scFv VL及VH结构域核酸序列

[0549] SEQ ID NO:511 (抗DLL3人类scFv AS56704之VL结构域的核酸序列)

[0550] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGTGACCGTGTACCATTACCTGC  
CGTGCGAGCCAGAGCGTTAGCAGCGCGGTGGCGTGGTACCAGCAAAGCCGGTAAAGCGCCGAAGCTGCTGATCTA  
TAGCGCGAGCAGCCTGTATAGCGCGTTCGAGCCGTTTCAGCGGTAGCCGTAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCA  
TTAGCAGCCTGCAGCCGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAGCAAGCTTCTTGGTCTCCGATCACGTTCCGACAG  
GGCACCAAAGTTGAGATTA

[0551] SEQ ID NO:512 (抗DLL3人类scFv AS56704之VH结构域的核酸序列)

[0552] GAGGTTCAACTGGTGGAGAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGTGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCA

GCTTCTGGCTTCAACATCTCTTCTTATATGCACTGGGTGCGTCAGGCGCCGGGTAAAGGCCTGGAATGGGTGC  
ATATATTTATCCTTCTTATGGCTATACTTCTTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTACCATCAGCGCGGATACCA  
GCAAAAACACCGCATACTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGGTGGT  
TACTACTACCATGGTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACCCTGGTTACCGTGAGCAGC

[0553] SEQ ID NO:513 (抗DLL3人类scFv AS56788之VL结构域的核酸序列)

[0554] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTTGGTGACCGTGTACCATTACCTGC  
CGTGCGAGCCAGAGCGTTAGCAGCGCGGTGGCGTGGTACCAGCAAAAGCCGGGTAAAGCGCCGAAGCTGCTGATCTA  
TAGCGCGAGCAGCCTGTATAGCGGCGTCCGAGCCGTTTACGCGGTAGCCGTAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCA  
TTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAGCAACATTACGCTCCGTCTCTGATCACGTTCCGA  
CAGGGCACCAAAGTTGAGATTA

[0555] SEQ ID NO:514 (抗DLL3人类scFv AS56788之VH结构域的核酸序列)

[0556] GAGGTTCAACTGGTGGAGAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCA  
GCTTCTGGCTTCAACATCTCTTCTTATTCTATGCACTGGGTGCGTCAGGCGCCGGGTAAAGGCCTGGAATGGGTGC  
ATATATTTCTTCTTATTATGGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTACCATCAGCGCGGATACCA  
GCAAAAACACCGCATACTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCCGTCTATTATTGTGCTCGCTACTCT  
TACTACTACGGTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACCCTGGTTACCGTGAGCAGC

[0557] 人类抗DLL3 scFv CAR序列

[0558] SEQ ID NO:515 (CAS56704)

[0559] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLI  
YSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQASWSPITFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQ  
LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSSYMHWRQAPGKGLEWVAYIYPSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARGGYYYHGMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR  
GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKF  
SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR  
RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0560] SEQ ID NO:516 (CAS56788)

[0561] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLI  
YSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQHYAPSLITFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEV  
QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSSYMHWRQAPGKGLEWVAYISSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTA  
YLQMNSLRAEDTAVYYCARYSYYYGMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR  
GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKF  
SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR  
RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0562] 抗DLL3基准CAR

[0563] SEQ ID NO:517 (1H2.1氨基酸序列)

[0564] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSSISSYYWTWIRQPPGKLEWI  
GYIYSGTTNYPNLSKSRVTISVDTSKSKQFSLKLVTAADTAVYYCASIAVRGFFFDYWGQGLVTVSSGGGSGG  
GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGS  
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPITFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL



VVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY  
QGGQNLVYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY  
QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0565] 实例11. 人源化抗DLL3串联CAR-T细胞的活体外活性的评估

[0566] 为提高CAR-T的抗肿瘤功效,构建三个串联CAR(T1、T2及T3)。串联CAR的氨基酸序列提供于SEQ ID:518-520中。抗DLL3人源化sdAb片段的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:356(AS64380VH5)及SEQ ID NO:366(AS63997VH5)中。1H2.1(SEQ ID NO:517,例如参见WO 2019200007)为一种抗DLL3 CAR,也用于产生作为参考的CAR构建体。全长CAR自N末端至C末端含有:CD8 $\alpha$ 信号肽(SEQ ID NO:465)、SEQ ID NO:356(AS64380VH5)及SEQ ID NO:366(AS63997VH5)中提供的DLL3结合域sdAb、CD8 $\alpha$ 铰链域(SEQ ID NO:466)、CD8 $\alpha$ 跨膜域(SEQ ID NO:467)、CD137细胞内结构域(SEQ ID NO:468)或CD28细胞内结构域(SEQ ID NO:469)及CD3 $\zeta$ 细胞内结构域(SEQ ID NO:470)。图10A中显示CAR构建体的示意图。对于T1,sdAb 1及sdAb 2均为AS64380VH5。对于T2,sdAb 1及sdAb 2均为AS63997VH5。对于T3,sdAb 1及sdAb 2分别为AS63997VH5及AS64380VH5。接着将编码CAR片段的核酸克隆至慢病毒载体中以便在单个编码框中建立全长CAR构建体,使用人EF1 $\alpha$ 启动子进行表达。

[0567] SEQ ID NO:518(T1氨基酸序列)

[0568] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEV  
AVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLVTVSS  
GGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEVAVIYTRGGHTYYVD  
SVRGRFTISQDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLVTVSSTTTTPAPRPPTPAPT  
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT  
QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKGGQNLVYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0569] SEQ ID NO:519(T2氨基酸序列)

[0570] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKLEGV  
AAITVSGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAMYYCAVGYSGGSDVPGRYNYWGQGLVTVSS  
GGGGSGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKLEGVAAITVSGNTYYAD  
SVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAMYYCAVGYSGGSDVPGRYNYWGQGLVTVSSTTTTPAPRPPTPAPT  
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT  
QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKGGQNLVYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0571] SEQ ID NO:520(T3氨基酸序列)

[0572] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKLEGV  
AAITVSGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAMYYCAVGYSGGSDVPGRYNYWGQGLVTVSS  
GGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEVAVIYTRGGHTYYVD  
SVRGRFTISQDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLVTVSSTTTTPAPRPPTPAPT  
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT  
QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKGGQNLVYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0573] 活体外细胞毒性测定

[0574] 在转导后第9天,收获转导T细胞,且与表达DLL3的肿瘤细胞系(具有DLL3高表达的SHP-77、具有DLL3中等表达的NCI-H82及具有DLL3低表达的NCI-H2171)及DLL3阴性表达细胞系(NCI-H460及HEK293)以0.5:1及2:1的效应细胞(CAR-T)与靶细胞比率共同培育22小时。在所有测定中CAR3 CAR-T细胞用作参考以比较测定变化,和/或充当对照。未转导的T细胞(UnT)用作阴性对照。

[0575] 通过乳酸去氢酶(LDH)测定来确定转导T细胞的细胞毒性。结果表明,CAR3CAR-T及一些抗DLL3串联CAR-T在活体外展现强烈的针对SHP-77细胞的抗肿瘤活性,而UnT无靶细胞杀死作用(图11A-11C)且DLL3阴性表达细胞(NCI-H460及HEK293)不诱发细胞毒性(图11D-11E)。除CAR3之外,还比较T3及1H2.1对SHP-77细胞的活体外细胞毒性。结果显示在短期刺激中T3具有相当的或不太有效的细胞杀死活性(图11V)。

[0576] IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 释放检测

[0577] 另外,自活体外细胞毒性测定收集上清液,以评定CAR诱发的细胞因子释放,例如干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )及TNF- $\alpha$ 释放。如图11F-11K所示,CAR3 CAR-T及一些抗DLL3串联CAR-T经表达DLL3的细胞系刺激,产生IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ ,而UnT几乎不产生IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 。DLL3阴性表达的细胞系不减少IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 的特异性释放(数据未显示)。检测IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 释放的方案可涉及CISBIO的人类TNF- $\alpha$ 试剂盒及IFN- $\gamma$ 试剂盒。

[0578] 与1H2.1相比,T3释放更多IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ (在共同培育22小时后)(图11W-11X)。通过长期刺激测定确定串联CAR-T细胞毒性及扩增

[0579] 通过反复抗原刺激测定评估DLL3 CAR-T细胞。在经SCLC细胞系及对照细胞系反复刺激后,串联CAR-T细胞T3显示对SCLC细胞、尤其对SHP-77及NCI-H82细胞更有效的细胞毒性(图11L-P)。除细胞毒性活性外,串联CAR-T细胞T3也显示比其他CART高的增殖能力,尤其在经SHP-77及NCI-H82细胞刺激时(图11Q-11U)。

[0580] 除CAR3之外,还比较T3及1H2.1对SHP-77细胞的活体外细胞毒性。结果表明,在长期刺激中T3具有优良细胞毒性及扩增(图11Y-11Z)。

[0581] 如下进行反复刺激。

[0582] 第1轮:将CAR-T细胞及 $3 \times 10^5$ 个靶细胞(例如SHP-77)以1:5的效应细胞与靶细胞比率添加至24孔板中,且在二氧化碳培育箱中在37°C、5% CO<sub>2</sub>中共同培育3天。移取200 $\mu$ L细胞培养上清液用于检测细胞因子,且收获共同培育的细胞以通过流式细胞术评定%CD3及CAR阳性率;

[0583] 第2轮:基于第1轮中收获的细胞的CAR-T阳性率,将收获的细胞继续与相同体积的新靶细胞(SHP-77)在1:2的效应细胞与靶细胞比率下又共同培育3天。移取200 $\mu$ L细胞培养上清液用于检测细胞因子,且收获共同培育的细胞以通过流式细胞术评定%CD3及CAR阳性率;

[0584] 基于先前每轮CAR-T阳性率,按与第2轮类似的方式进行第3轮及下一轮。实例12. 人源化抗DLL3 PD-1DNR或CSR装甲的CAR-T细胞的活体内活性的评估

[0585] 为提高CAR-T的持久性,构建PD-1显性负性受体(PD-1DNR)或PD-1嵌合转换受体(PD-1CSR)装甲的DLL3 CAR。两种CAR的氨基酸序列提供于SEQ ID:521-522中。PD-1DNR及PD-1CSR序列经由P2A连接至T3 C末端。PD-1DNR及PD-1CRS的氨基酸序列提供于SEQ ID:

523-524中。图10B中显示CAR构建体的示意图。

[0586] SEQ ID NO:521 (T3-PD-1DNR氨基酸序列)

[0587] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFR  
[0588] QAPGKLEGVAAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAMYYCA  
[0589] VGYLSGGSDVDPGRYNYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG  
[0590] GSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDN  
[0591] AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLVTVSSSTTTPAPRP  
[0592] PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR  
[0593] GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPSEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL  
[0594] YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG  
[0595] ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMQI  
[0596] PQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESF  
[0597] VLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT  
[0598] LCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAQAAAPTTTPAPRPPTPAPT  
[0599] ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRRIQ

[0600] SEQ ID NO:522 (T3-PD-1CSR氨基酸序列)

[0601] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFR  
[0602] QAPGKLEGVAAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAMYYCA  
[0603] VGYLSGGSDVDPGRYNYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG  
[0604] GSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDN  
[0605] AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLVTVSSSTTTPAPRP  
[0606] PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR  
[0607] GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPSEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL  
[0608] YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG  
[0609] ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMQI  
[0610] PQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESF  
[0611] VLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT  
[0612] LCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHCPSPLFPGPSKPFVWLVVGGVLACYS  
[0613] LLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0614] SEQ ID NO:523 (PD-1DNR氨基酸序列)

[0615] MQIPQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTS  
[0616] ESFVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSG  
[0617] TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAQAAAPTTTPAPRPPTPAP  
[0618] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRRIQSEQ ID

NO:524 (PD-1CSR氨基酸序列)

[0619] MQIPQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTS  
[0620] ESFVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSG  
[0621] TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHCPSPLFPGPSKPFVWLVVGGVLAC  
[0622] YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0623] 通过反复抗原刺激测定来评估PD-1DNR或PD-1CSR装甲的DLL3 CAR-T细胞。在经SHP-77细胞反复刺激后,与常规CART相比,装甲的CAR-T细胞未增加细胞毒性效力,且未提高扩增能力(图12A-12B)。在经SHP-77/PD-L1细胞(SHP-77细胞中过度表达人PD-L1)反复刺激后,PD-1CSR装甲的CAR-T细胞显示优良细胞毒性效力及扩增能力(图12C-12D)。

[0624] 实例13.TGF- $\beta$ -DNR增强DLL3 CAR-T细胞的抗肿瘤功效

[0625] TGF- $\beta$ -DNR装甲的DLL3 CAR-T细胞的构建

[0626] 为提高DLL3 CAR-T细胞在肿瘤微环境中的抗肿瘤性能,将TGF- $\beta$ -DNR序列合并至DLL3CAR中,如图13A所示。TGF- $\beta$ -DNR为TGFBR1I的截短型式,其由TGFBR1I的细胞外结构域及跨膜域组成。构建体T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR、T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR包含N末端的T3-BBZ序列、如所指示的P2A或T2A肽、C末端的TGF- $\beta$ -DNR;构建体TGF- $\beta$ -DNR-P2A-T3及TGF- $\beta$ -DNR-T2A-T3包含N末端的TGF- $\beta$ -DNR序列、如所指示的P2A或T2A肽及C末端的T3-BBZ序列。TGF- $\beta$ -DNR及装甲的DLL3 CAR的详细序列提供于SEQ ID:525-529中。

[0627] SEQ ID NO:525 (T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR氨基酸序列)

[0628] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFR

[0629] QAPGKLEGVAAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAMYYCA

[0630] VGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG

[0631] GSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDN

[0632] AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHRLGLNNPRDYDYWGQGLVTVSSSTTTPAPRP

[0633] PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR

[0634] GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQL

[0635] YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG

[0636] ERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQUALPPRGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMGR

[0637] GLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDN

[0638] QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMK

[0639] EKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFICY

[0640] RVNRQQLSS

[0641] SEQ ID NO:526 (TGF- $\beta$ -DNR-P2A-T3氨基酸序列)

[0642] MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVRFST

[0643] CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKC

[0644] IMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIF

[0645] YCYRVNRQQLSSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPQVQL

[0646] VESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKLEGVAAITVGSNTYYADS

[0647] VKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAMYYCAVGYLSGGSWDVPGRYNYWGQGLV

[0648] TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQ

[0649] APGKGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAS

[0650] SRHRLGLNNPRDYDYWGQGLVTVSSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV

[0651] HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG

[0652] CSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE

[0653] MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYD

- [0654] ALHMQALPPR
- [0655] SEQ ID NO: 527 (T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR氨基酸序列)
- [0656] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFR
- [0657] QAPGKGLEGVAAITVGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAMYYCA
- [0658] VGYLSGGSDVPGRYNYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG
- [0659] GSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAPGKGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDN
- [0660] AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRHLGLNPRDYDYWGQGLVTVSSSTTTPAPRP
- [0661] PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
- [0662] GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL
- [0663] YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
- [0664] ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSEGRGSLTTCGDVEENPGPMGRG
- [0665] LLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQ
- [0666] KSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE
- [0667] KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYR
- [0668] VNRQQKLSS
- [0669] SEQ ID NO: 528 (TGF- $\beta$ -DNR-T2A-T3氨基酸序列)
- [0670] MGRLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFST
- [0671] CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKC
- [0672] IMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIF
- [0673] YCYRVNRQQKLSSGSEGRGSLTTCGDVEENPGMALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLV
- [0674] ESGGGVVQPGGSLRLSCAASFSGYGVSTMAWFRQAPGKGLEGVAAITVGSNTYYADSV
- [0675] KGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAMYYCAVGYLSGGSDVPGRYNYWGQGLVTV
- [0676] VSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSSNYMGWFRQAP
- [0677] GKGLEEVAVIYTRGGHTYYVDSVRGRFTISQDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSR
- [0678] HRLGLNPRDYDYWGQGLVTVSSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT
- [0679] RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
- [0680] CRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
- [0681] GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL
- [0682] HMQALPPR
- [0683] SEQ ID NO: 529 (TGF- $\beta$ -DNR氨基酸序列)
- [0684] MGRLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMS  
NCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN  
IIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSS
- [0685] 所有构建体包装至基于第二代慢病毒系统的慢病毒中。然后将自健康供体的PBMC分离的初级T细胞用慢病毒转导。转导4天后,通过FACS检测sdAb及TGF- $\beta$ -DNR的阳性率(图13B)。结果显示,T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR、T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR、TGF- $\beta$ -DNR-P2A-T3及TGF- $\beta$ -DNR-T2A-T3 CAR-T细胞的sdAb阳性率相当。然而,构建体T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR及T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR中TGF- $\beta$ -DNR的阳性率高于TGF- $\beta$ -DNR-P2A-T3及TGF- $\beta$ -DNR-T2A-T3。这些结果表明TGF- $\beta$ -DNR在结合于CAR的C末端时表达较高。

[0686] 活体外细胞毒性测定

[0687] 接着通过LDH或IFN- $\gamma$ 释放测定评估这些CAR-T细胞的细胞毒性。转导5天后,将CAR-T细胞调至与未转导T细胞(UnT)相同的sdAb阳性率。接着将CAR-T细胞或UnT细胞与SHP77在5ng/mL TGF- $\beta$ 存在下共同培育48小时,且量测LDH及IFN- $\gamma$ 释放(图13C-13D)。结果显示,TGF- $\beta$ -DNR装甲的CAR-T细胞诱发比未装甲的CAR-T细胞更多的靶细胞特异性溶解。因此,TGF- $\beta$ -DNR装甲的CAR-T细胞展示在抗原活化后较高的IFN- $\gamma$ 释放能力。与不同CAR-T细胞的TGF- $\beta$ -DNR表达水平一致,T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR、T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR显示IFN- $\gamma$ 分泌水平高于TGF- $\beta$ -DNR-P2A-T3及TGF- $\beta$ -DNR-T2A-T3 CAR-T细胞。总言之,这些结果证明TGF- $\beta$ -DNR能够增强DLL3 CAR-T细胞针对DLL3阳性SCLC细胞的细胞毒性。

[0688] 长期刺激测定

[0689] 为确定TGF- $\beta$ -DNR是否能抵抗TGF- $\beta$ 对CAR-T细胞的抑制作用,进行长期刺激测定。简言之,在5ng/mL TGF- $\beta$ 存在或缺乏下将T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR及T3 CAR-T细胞用SHP77细胞每3天反复激发。在每轮刺激结束时,通过FACS分析全部活细胞中T细胞百分比,且计算CAR-T细胞的扩增。如图13E及图13F所示,TGF- $\beta$ 抑制T3 CAR-T细胞的持久性及扩增。相比之下,甚至在TGF- $\beta$ 存在下,T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR的持久性及扩增也维持得很好。在用SHP77细胞进行2轮刺激之后通过FACS分析T细胞耗尽标记物(exhaustion marker)。如图13G所示,用TGF- $\beta$ 处理上调T3细胞中耗尽标记物的表达,但在T3-P2A-TGF- $\beta$ -DNR CAR-T细胞中未上调。总之,这些结果证明TGF- $\beta$ -DNR保护DLL3 CAR-T细胞避免被TGF- $\beta$ 抑制。因为在实体肿瘤的微环境中TGF- $\beta$ 的表达水平通常升高,所以结果表明TGF- $\beta$ -DNR的添加提高DLL3 CAR-T细胞在实体肿瘤中的抗肿瘤功效。

[0690] 活体内抗肿瘤功效研究

[0691] 为进一步研究TGF- $\beta$ -DNR是否可增强DLL3 CAR-T细胞在活体内的抗肿瘤功效,在异种移植模型中评估T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR CAR-T细胞或亲本CAR-T细胞。简言之,将 $1 \times 10^7$ 个SHP77细胞皮下植入NCG小鼠中。在7-10天后,当肿瘤体积达到100-200mm<sup>3</sup>时,将 $2.5 \times 10^5$ 个CAR-T细胞静脉内注入小鼠中。接着每周量测肿瘤体积两次,且每周量测外周血中CAR-T的百分比一次。如图13H所示,在次最佳剂量下,T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR CAR-T细胞可有效抑制肿瘤生长,而亲本T3 CAR-T不能。如图13I所示,外周血白细胞中T3-T2A-TGF- $\beta$ -DNR CAR-T的百分比高于T3。总之,这些结果证明TGF- $\beta$ -DNR可增强DLL3 CAR-T细胞在活体内的抗肿瘤功效。

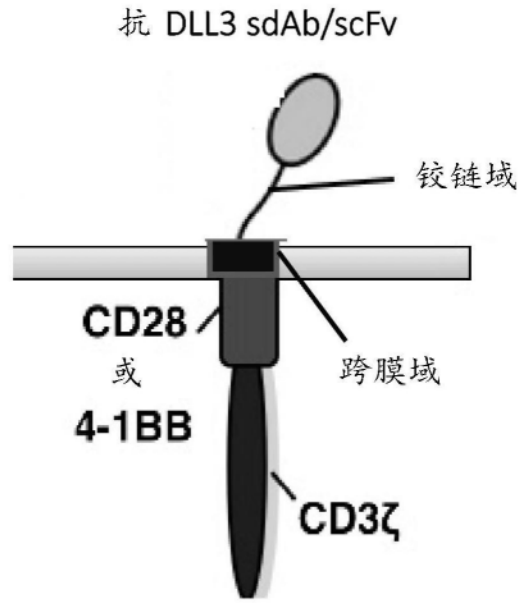


图1

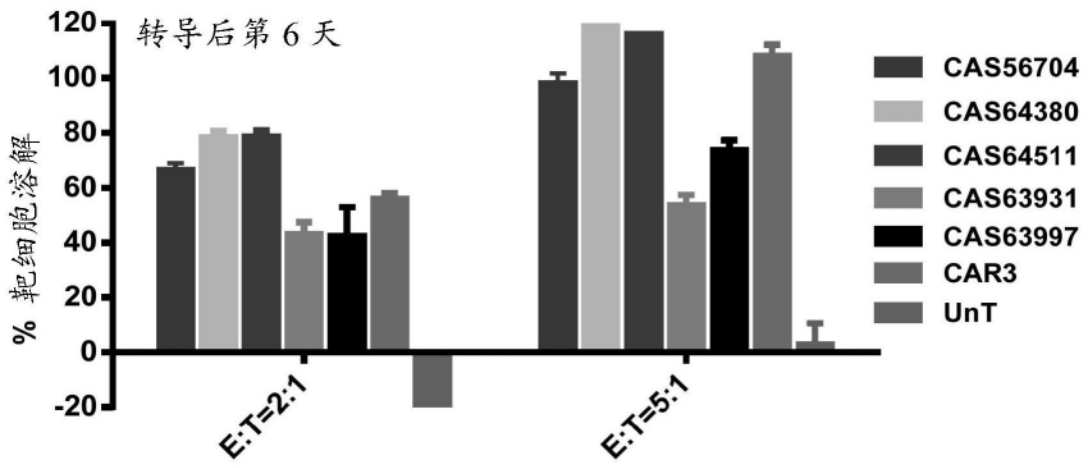


图2

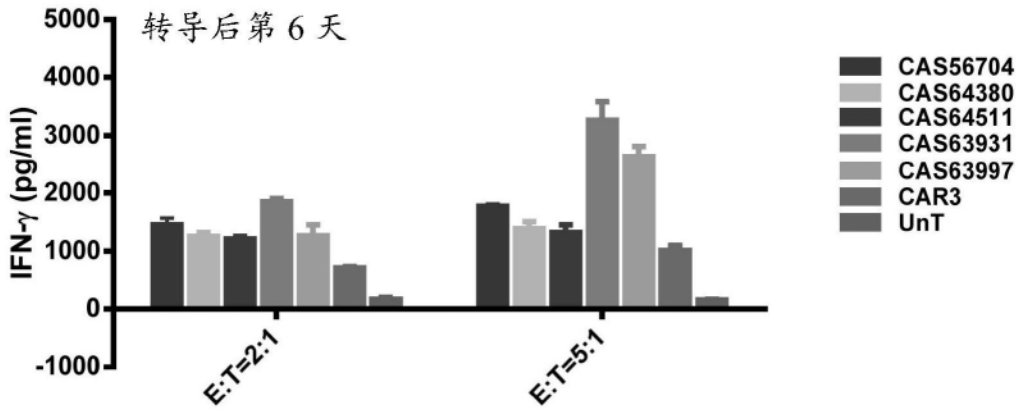


图3A

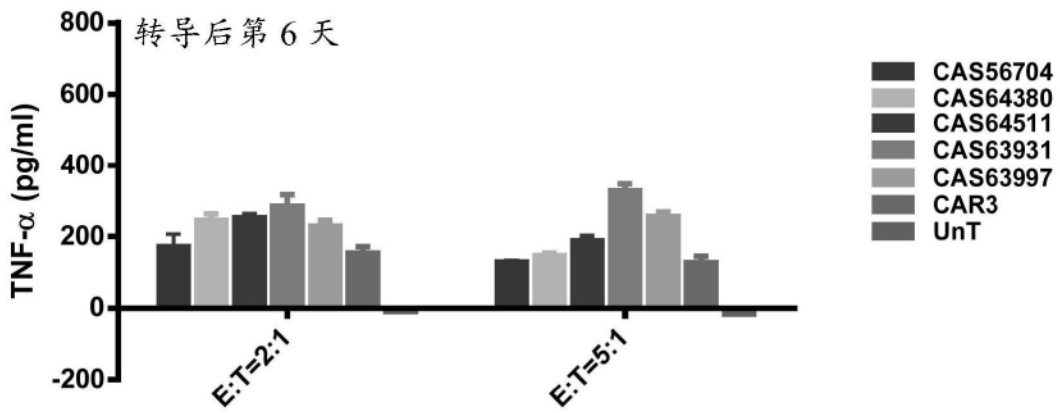


图3B

**DLL3 总 CAR-T+ 扩增的细胞**  
( 与 SHP-77 共培养 )

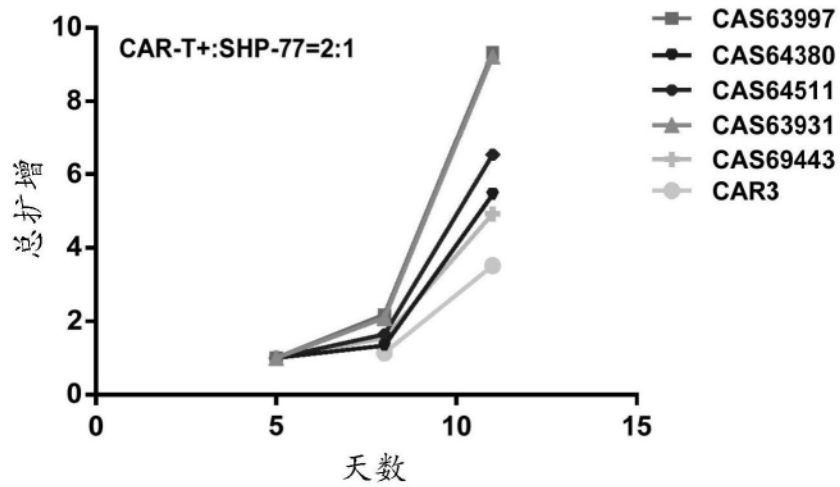


图4



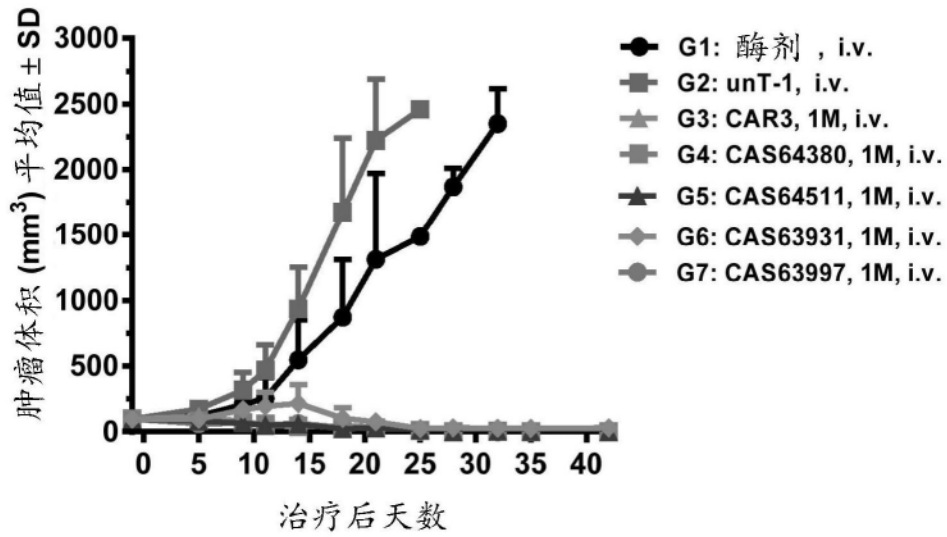


图5

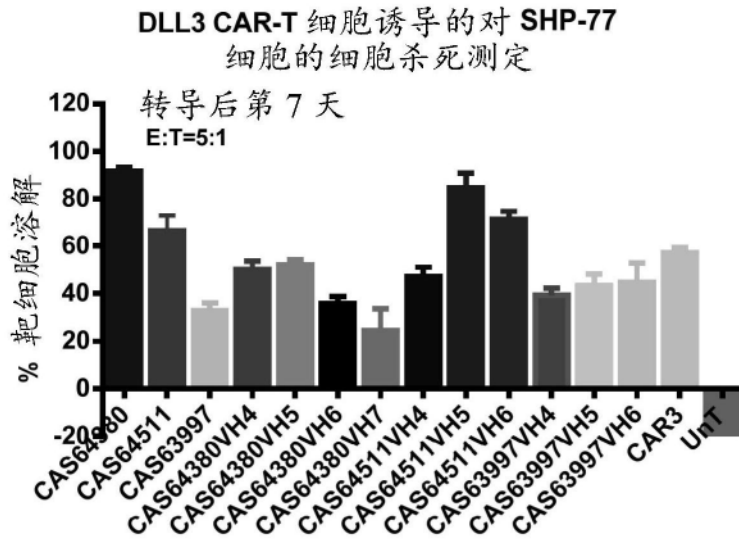


图6A

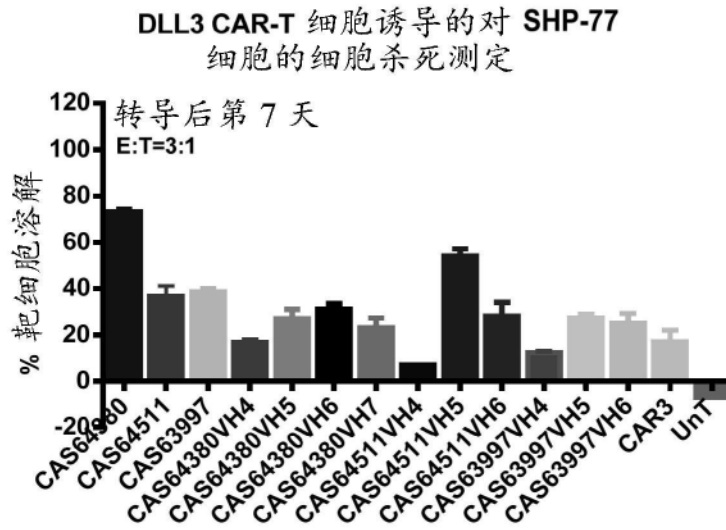


图6B

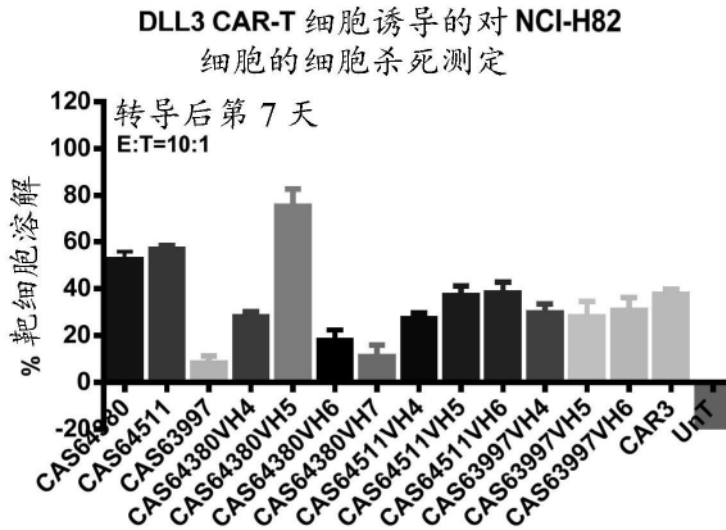


图6C

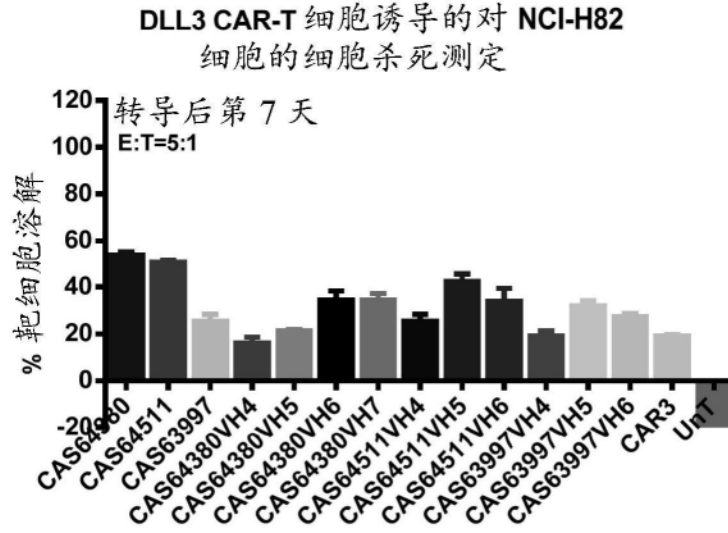


图6D

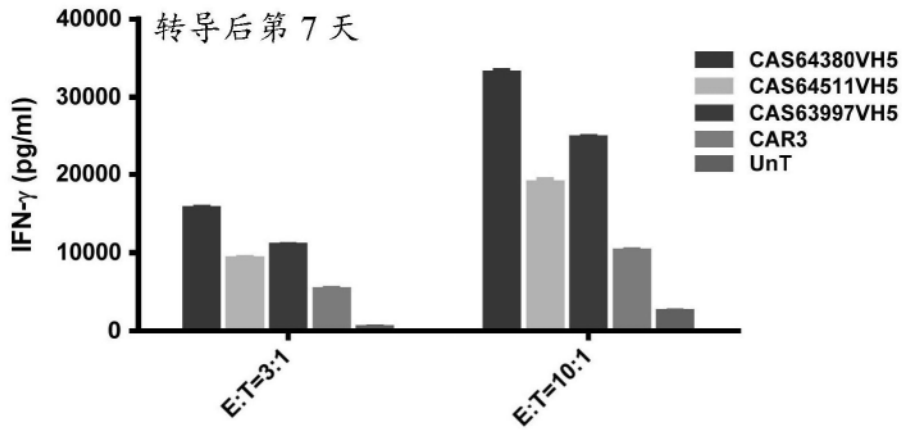


图7A

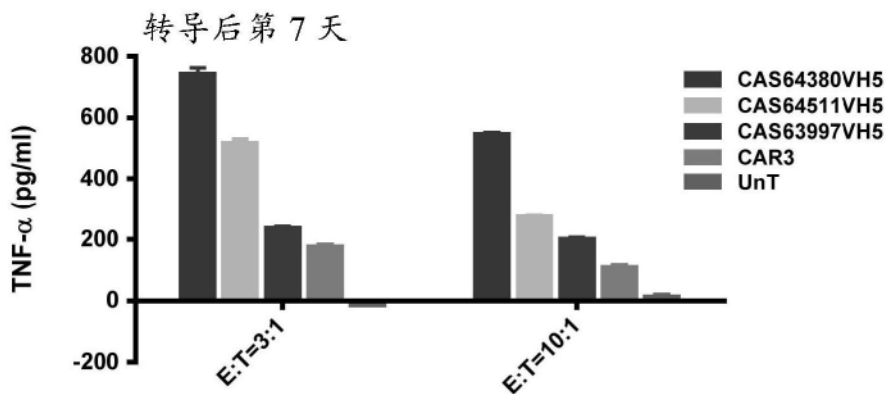


图7B

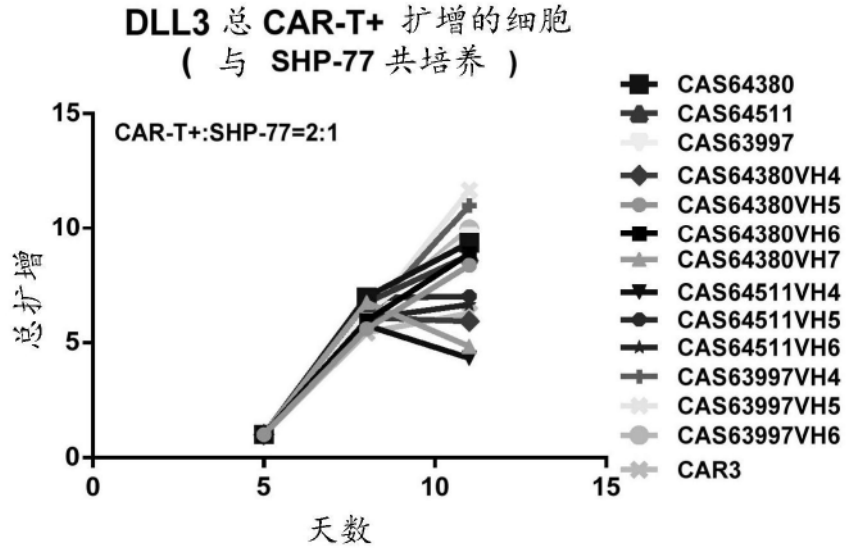


图8

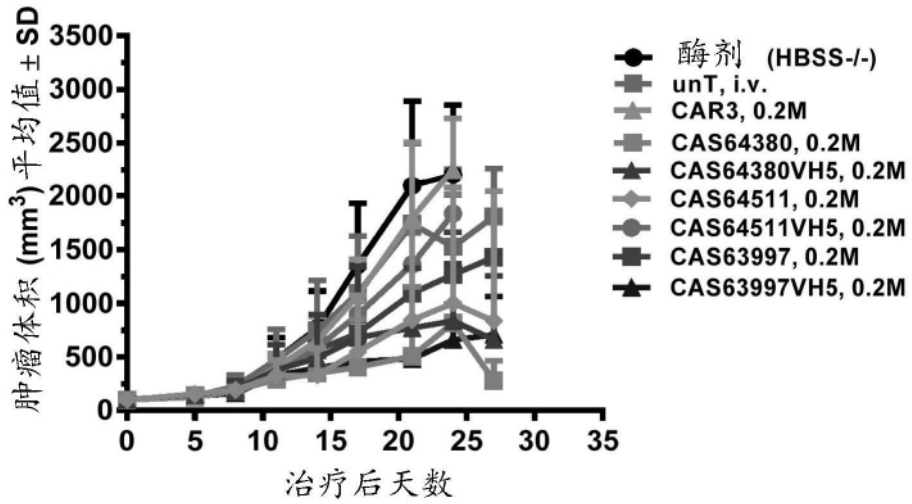


图9A

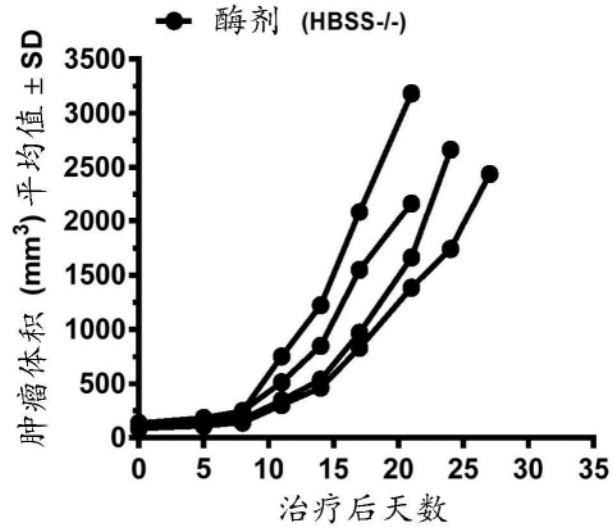


图9B

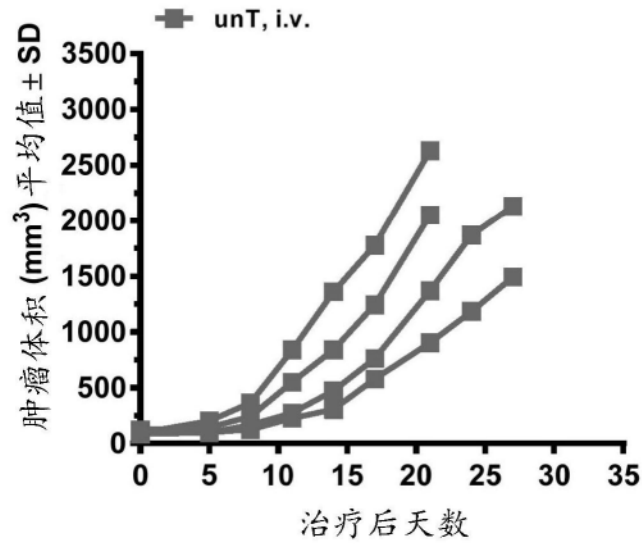


图9C

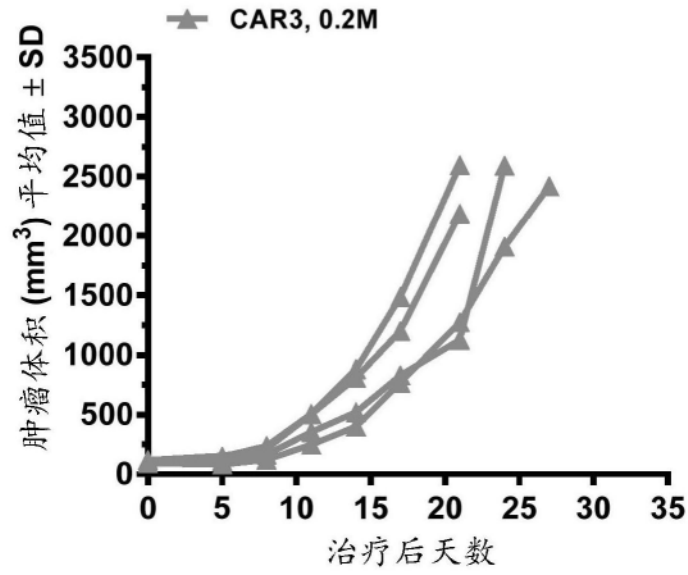


图9D

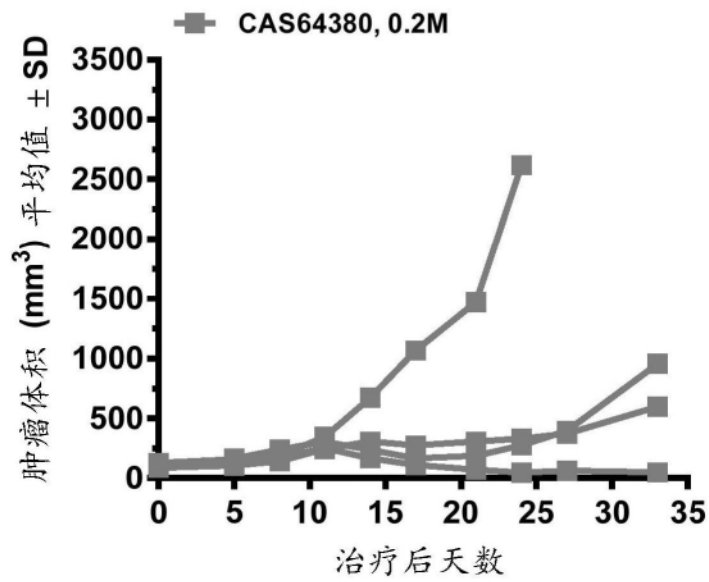


图9E

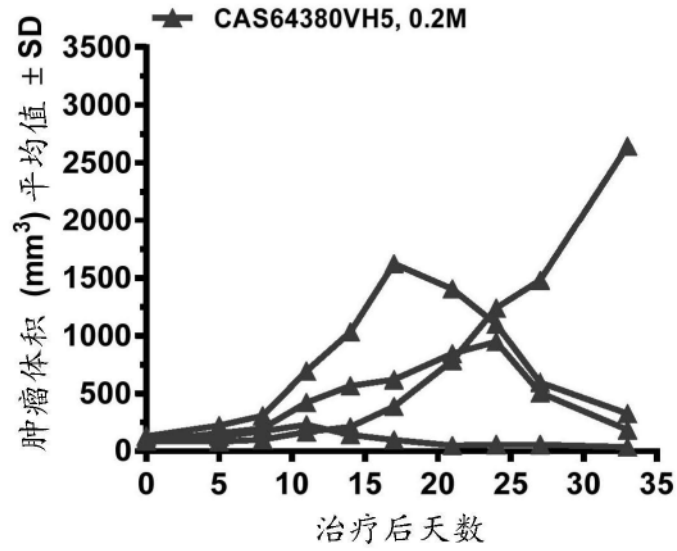


图9F

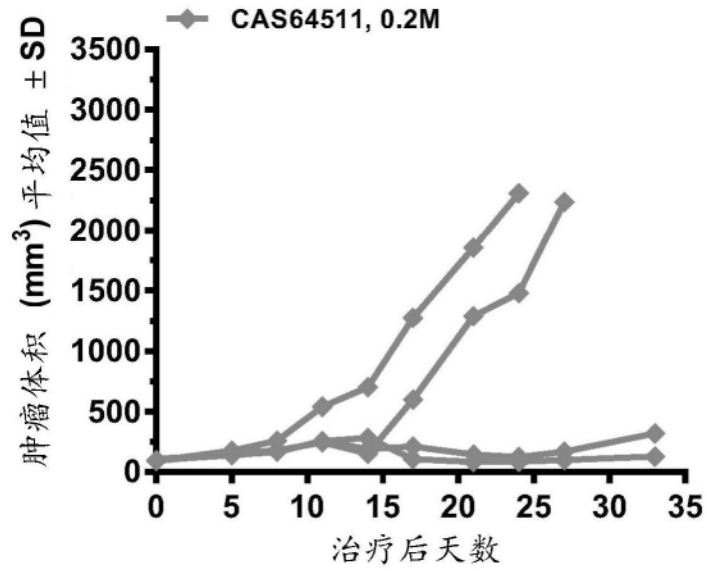


图9G

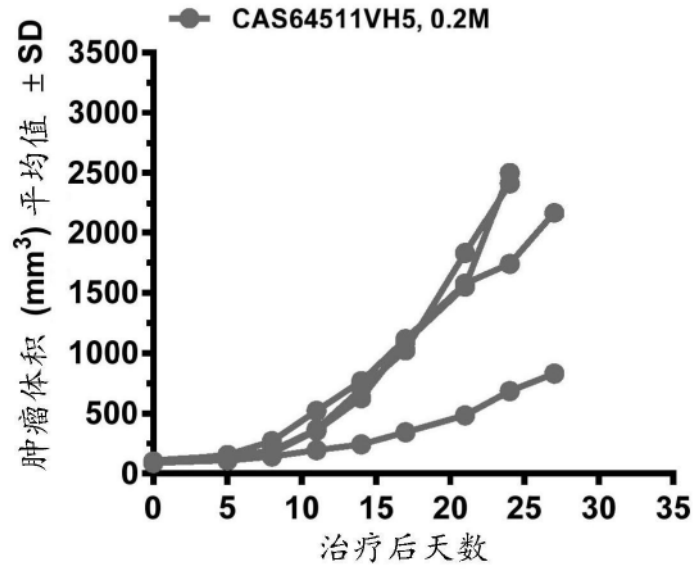


图9H

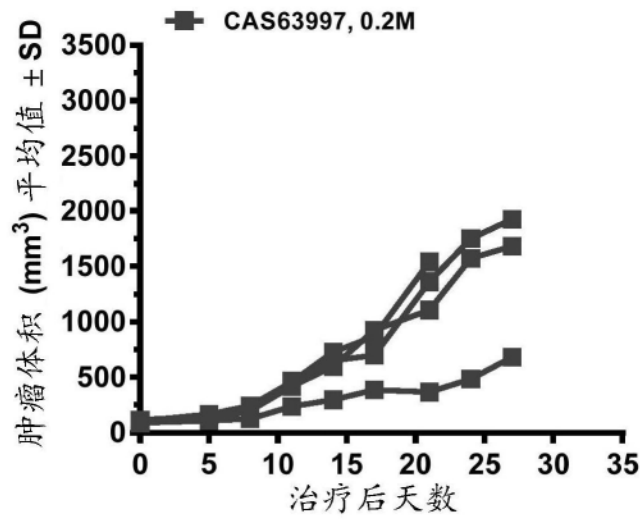


图9I



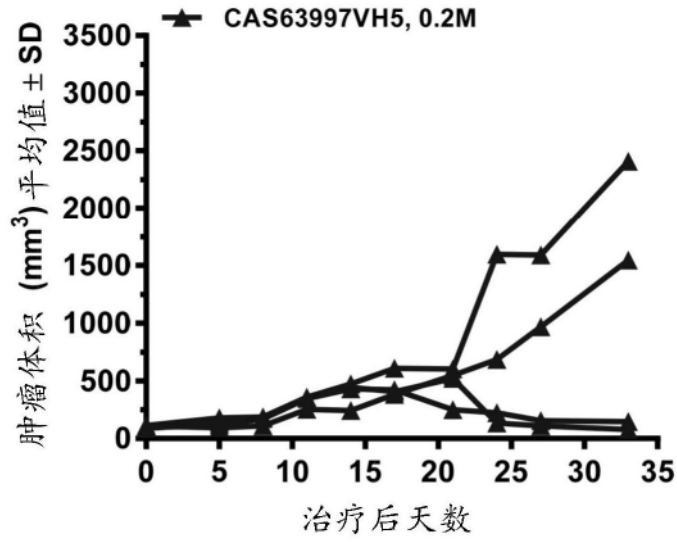


图9J

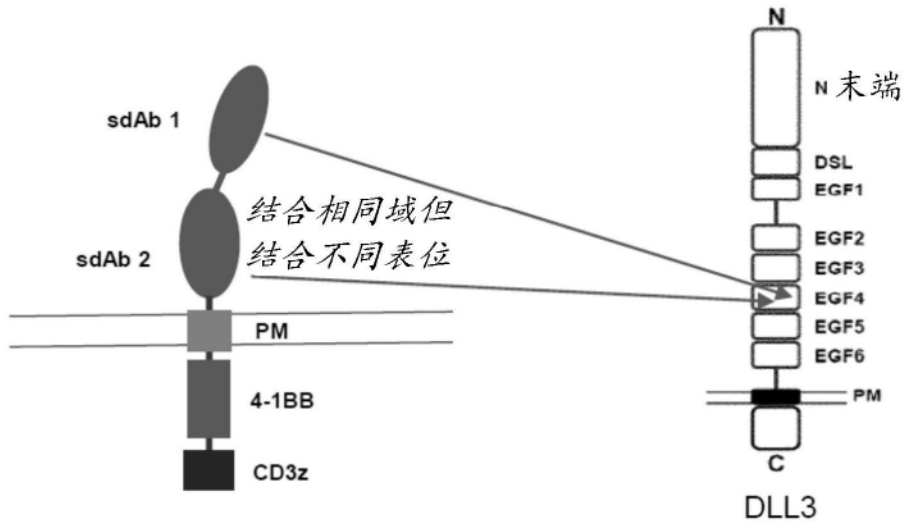


图10A

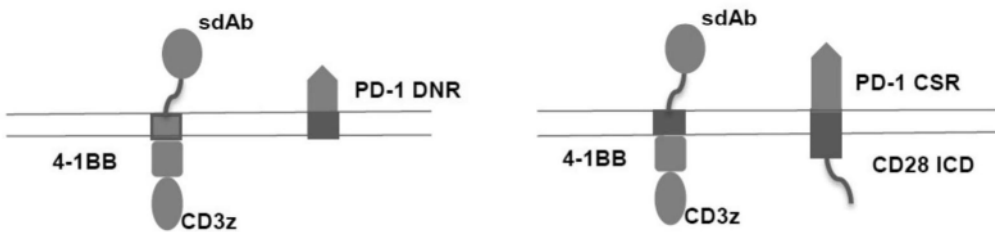


图10B

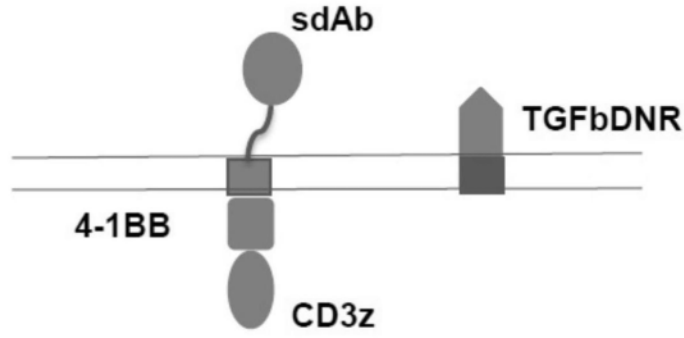


图10C

**DLL3 CAR-T 细胞诱导的对 SHP-77 细胞的细胞毒性 (22 h)**

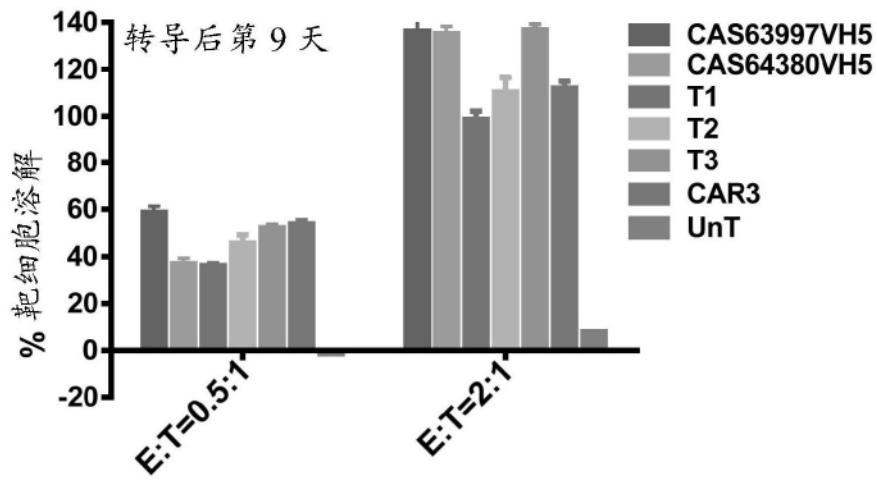


图11A

**DLL3 CAR-T 细胞诱导的对 NCI-H82 细胞的细胞毒性 (22 h)**

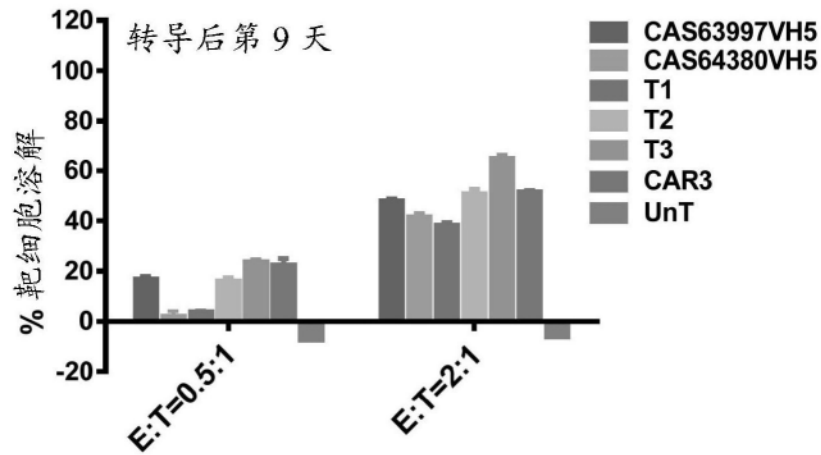


图11B

DLL3 CAR-T 细胞诱导的对 NCI-H2171 细胞的细胞毒性 (22 h)

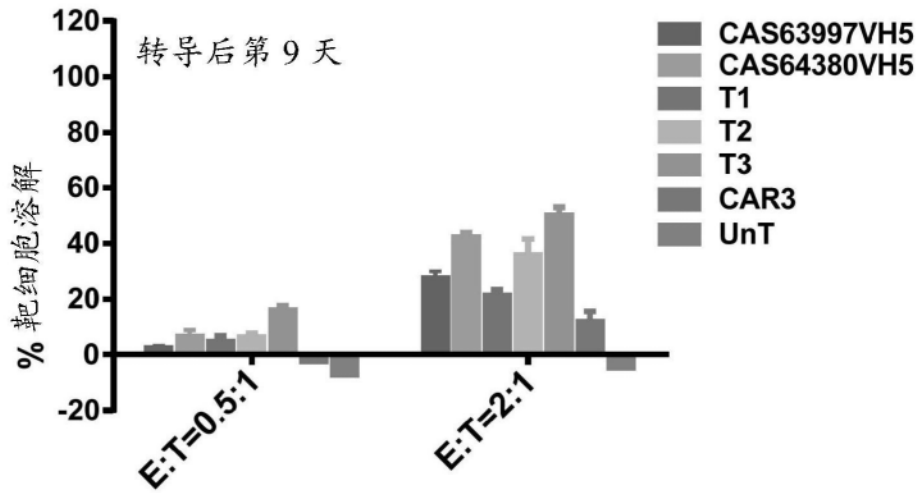


图11C

DLL3 CAR-T 细胞诱导的对 NCI-H460 细胞的细胞毒性 (22 h)

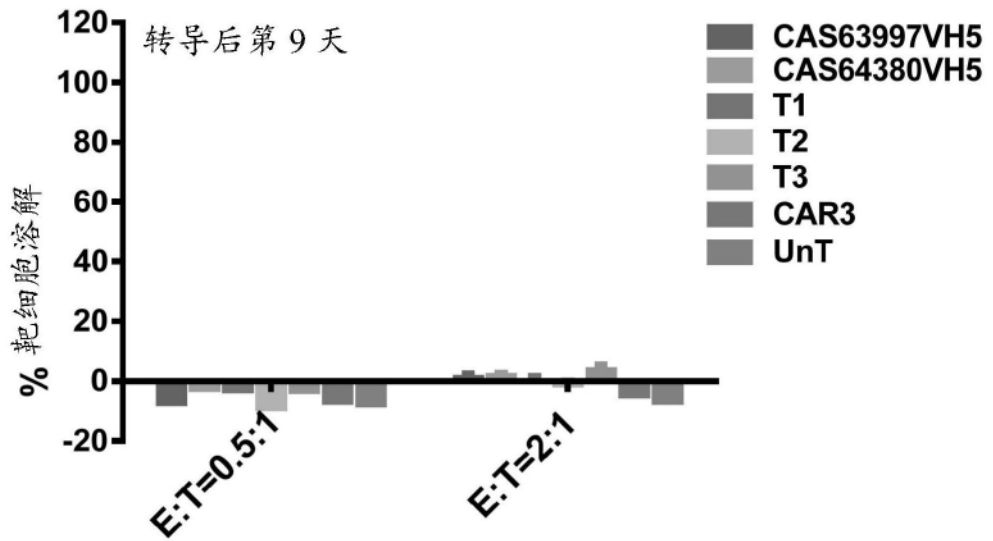


图11D

DLL3 CAR-T 细胞诱导的对 HEK-293 细胞的细胞毒性 (22 h)

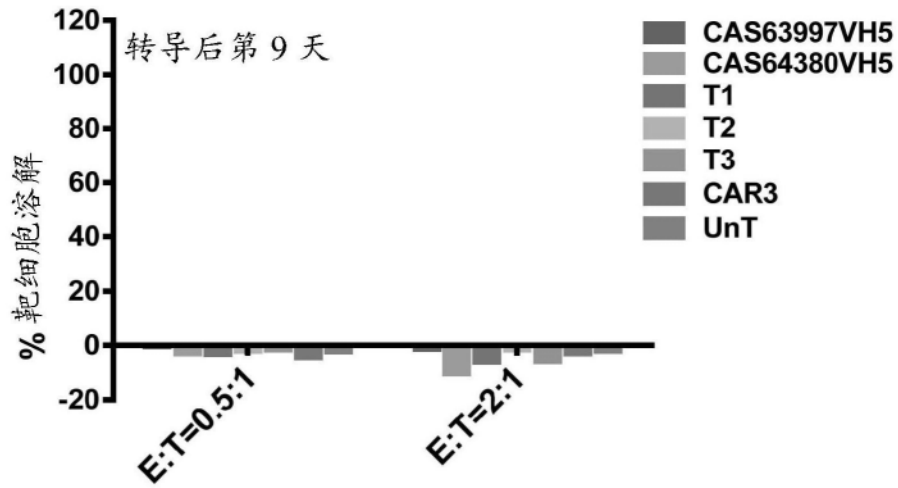


图11E

与 SHP-77 细胞共培养的 DLL3 CAR-T 细胞中的细胞因子释放 (22 h)

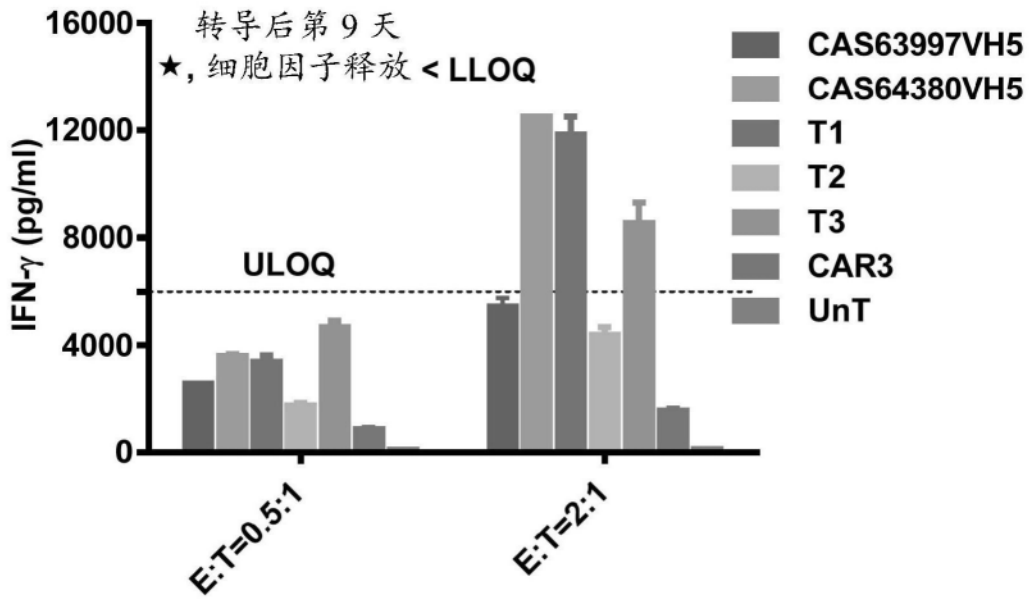


图11F

与 NCI-H82 细胞共培养的 DLL3 CAR-T  
细胞中的细胞因子释放 (22 h)

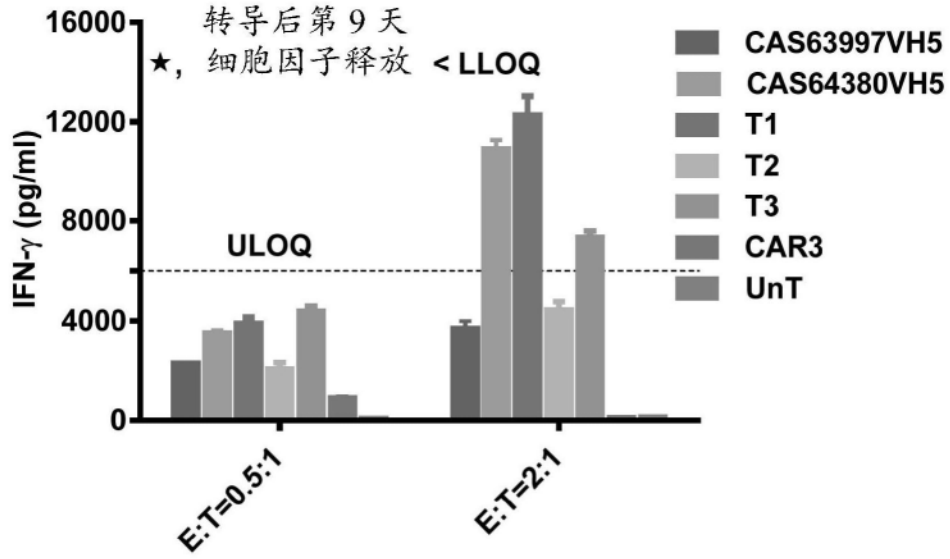


图11G

与 NCI-H2171 细胞共培养的 DLL3 CAR-T  
细胞中的细胞因子释放 (22 h)

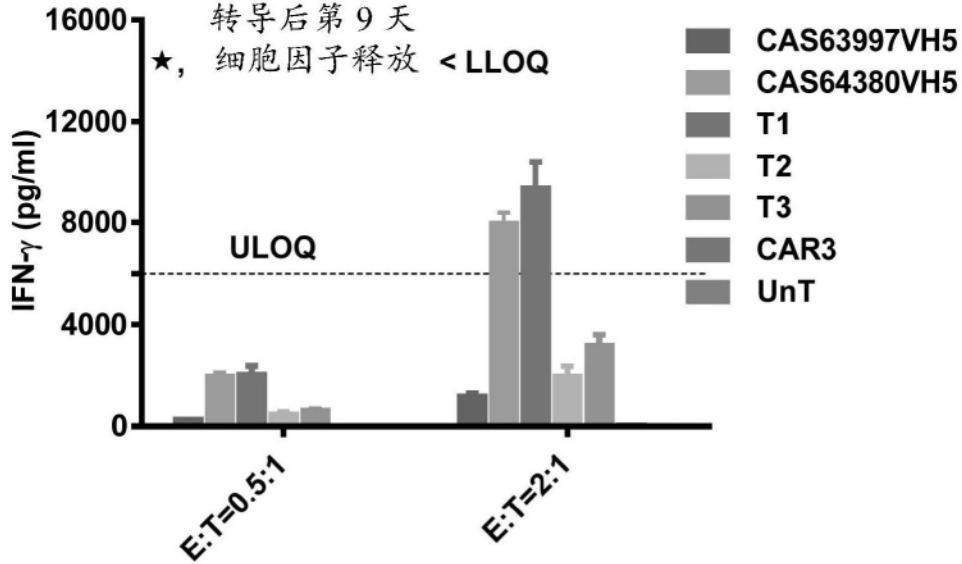


图11H

与 SHP-77 细胞共培养的 DLL3 CAR-T  
细胞中的细胞因子释放 (22 h)

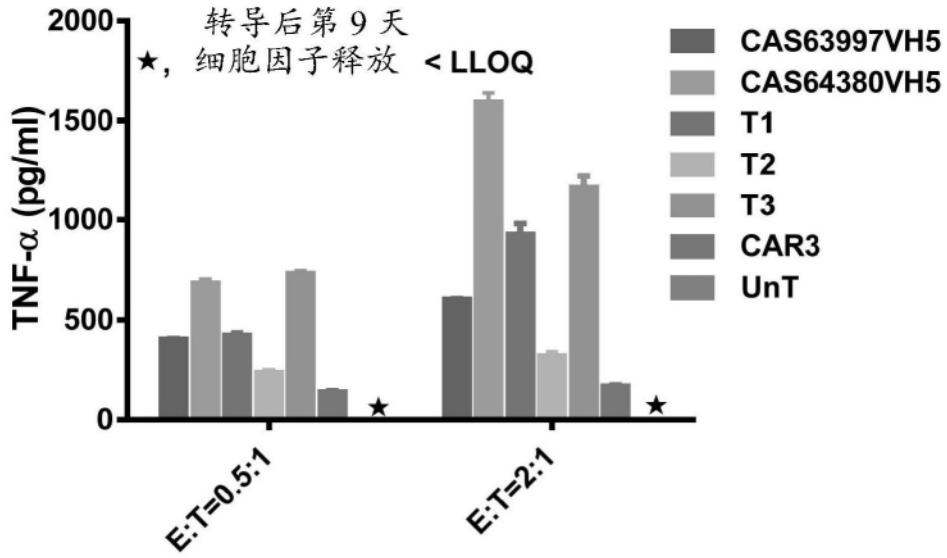


图11I

与 NCI-H82 细胞共培养的 DLL3 CAR-T  
细胞中的细胞因子释放 (22 h)

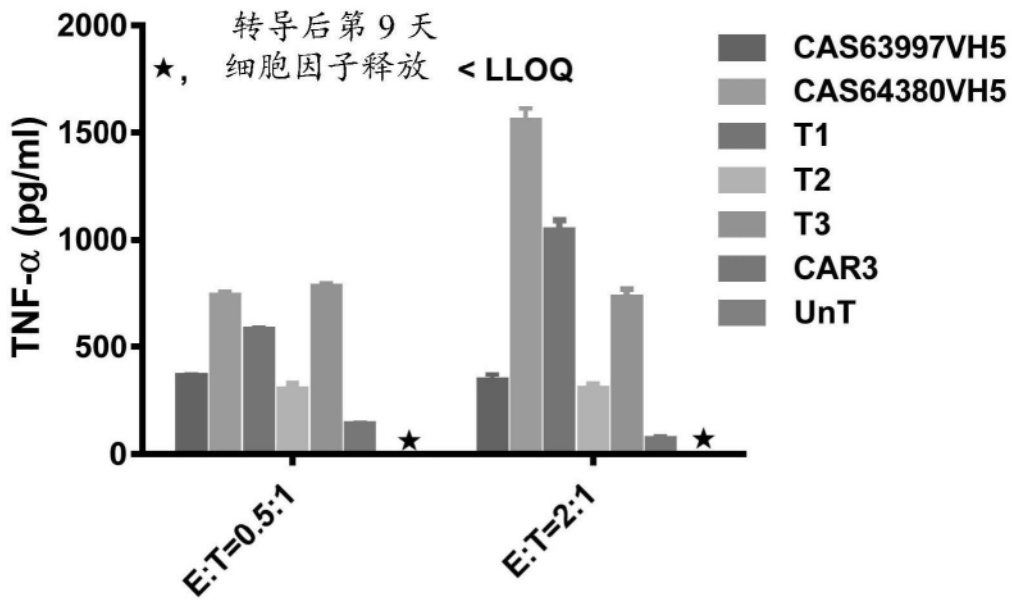


图11J

与 NCI-H2171 细胞共培养的 DLL3 CAR-T 细胞中的细胞因子释放 (22 h)

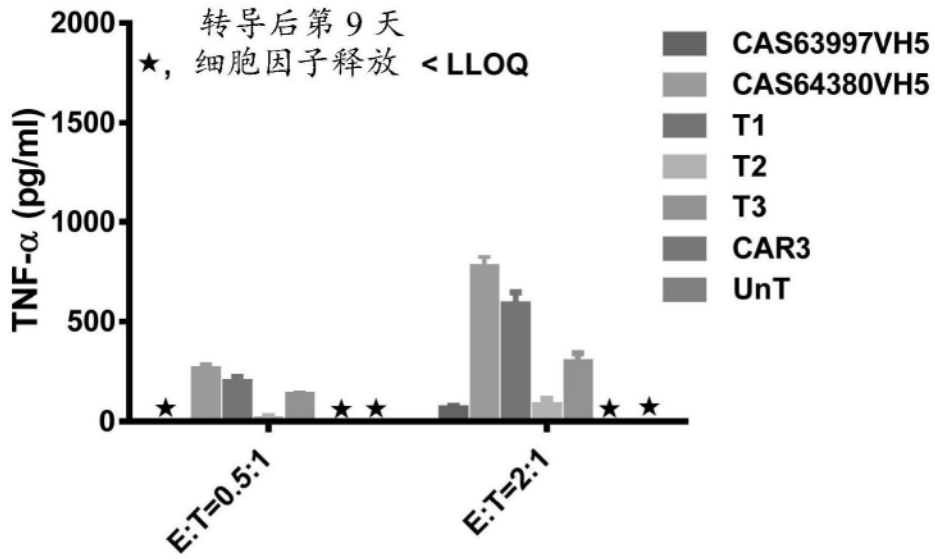


图11K

与 SHP-77 共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

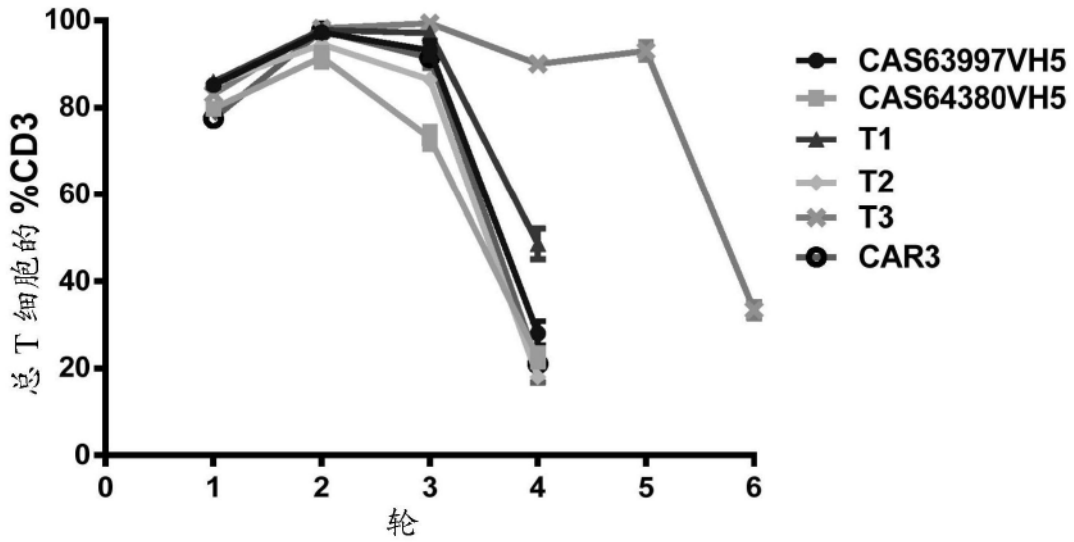


图11L

与 NCI-H82 共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

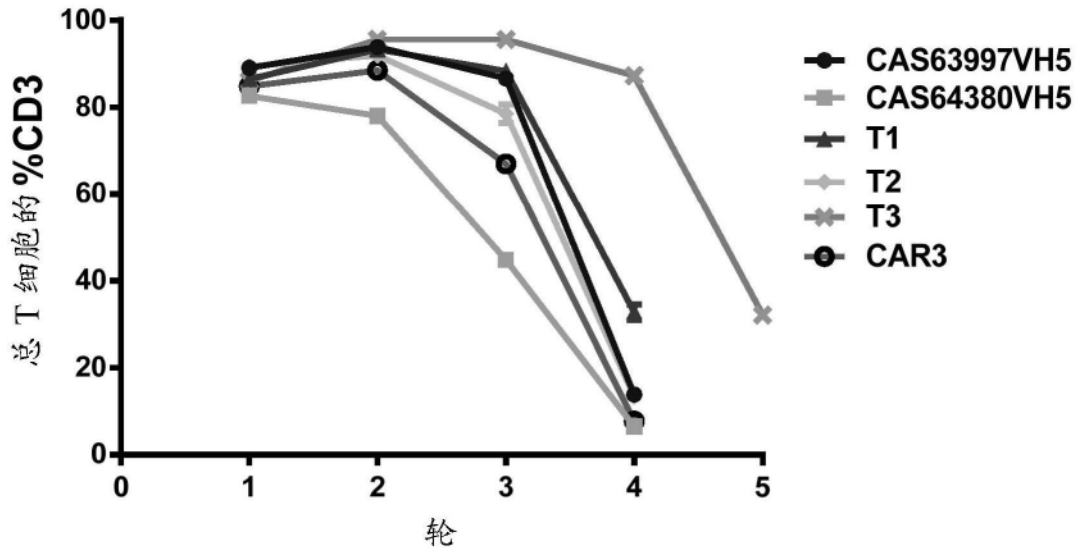


图11M

与 NCI-H2171 共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

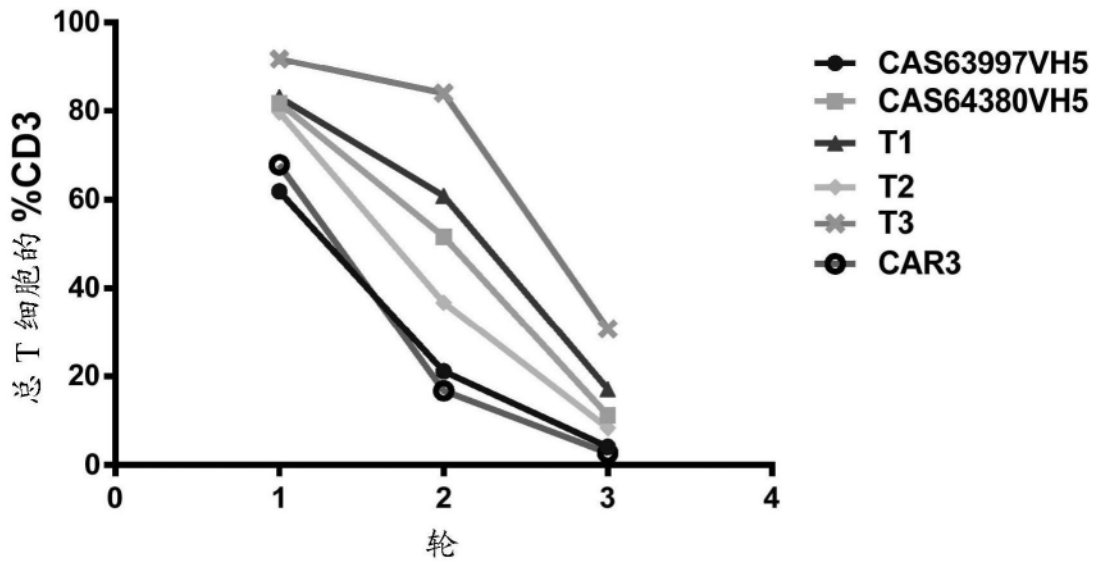


图11N



与 NCI-H460 共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

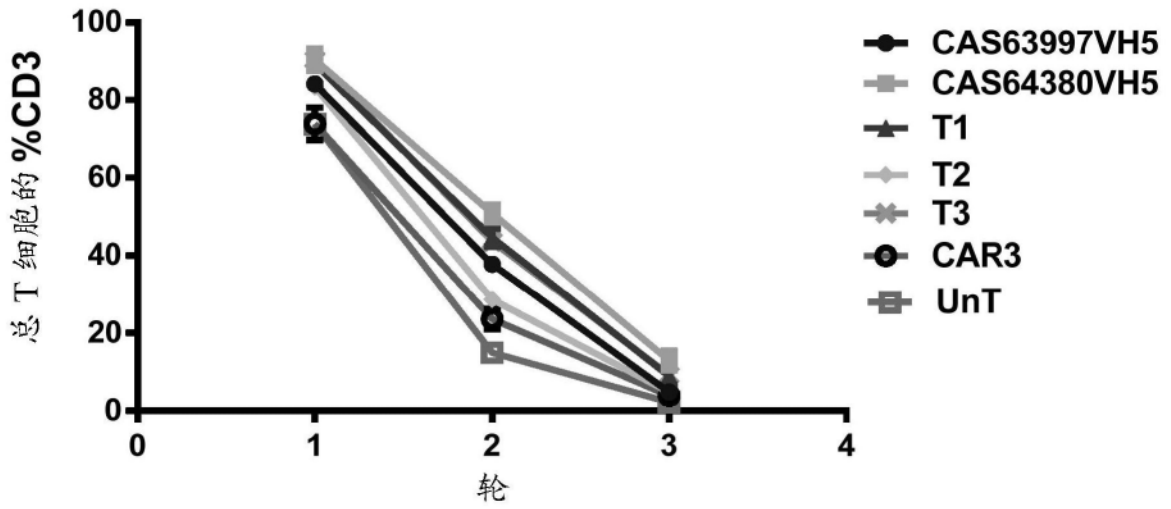


图110

与 HEK-293 共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

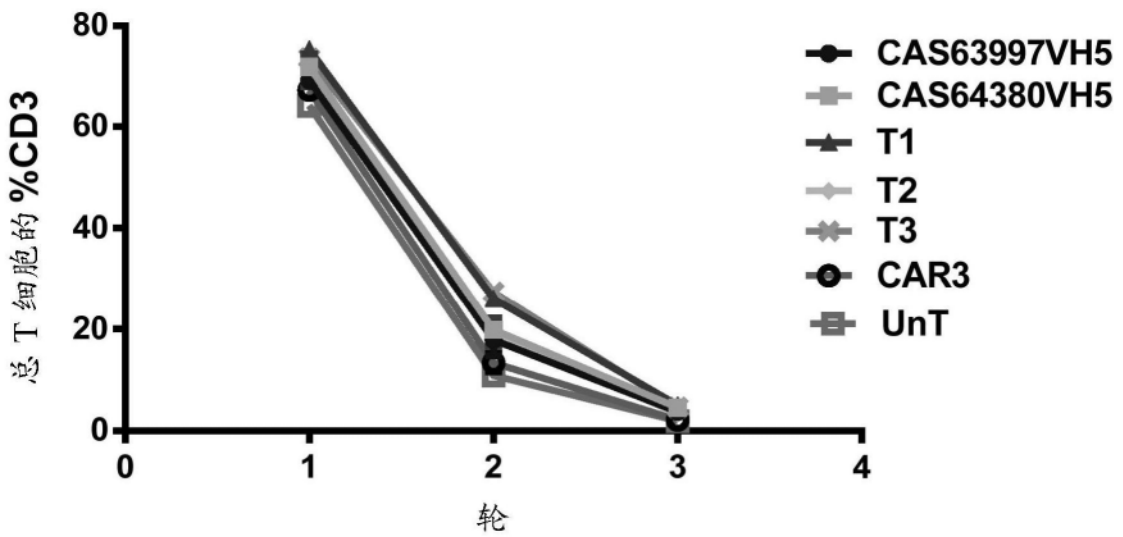


图11P

**DLL3 CAR-T 细胞扩增**  
(与 SHP-77 共培养)

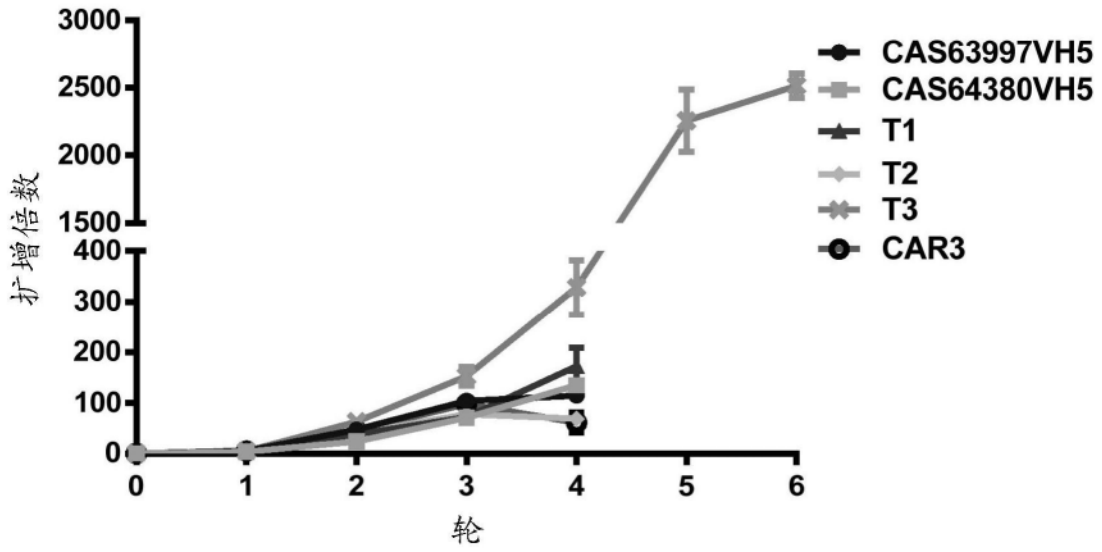


图11Q

**DLL3 CAR-T 细胞扩增**  
(与 NCI-H82 共培养)

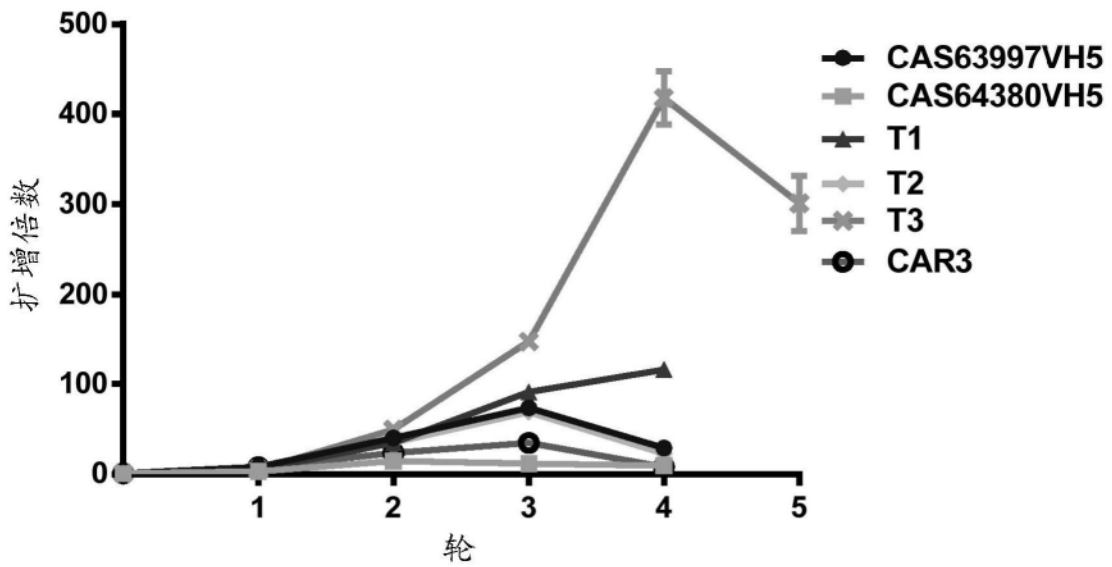


图11R

**DLL3 CAR-T 细胞扩增**  
(与 NCI-H2171 共培养)

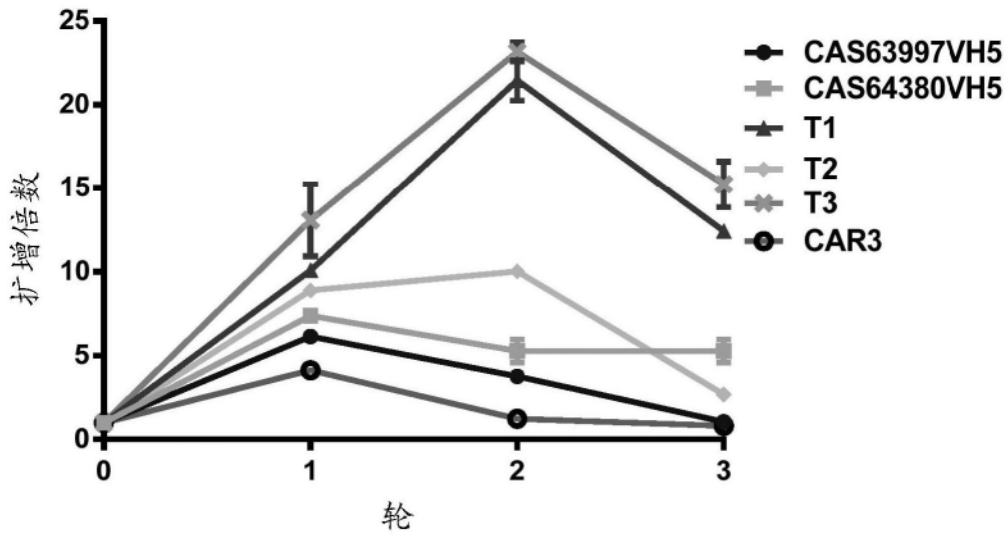


图11S

**DLL3 CAR-T 细胞扩增**  
(与 NCI-H460 共培养)

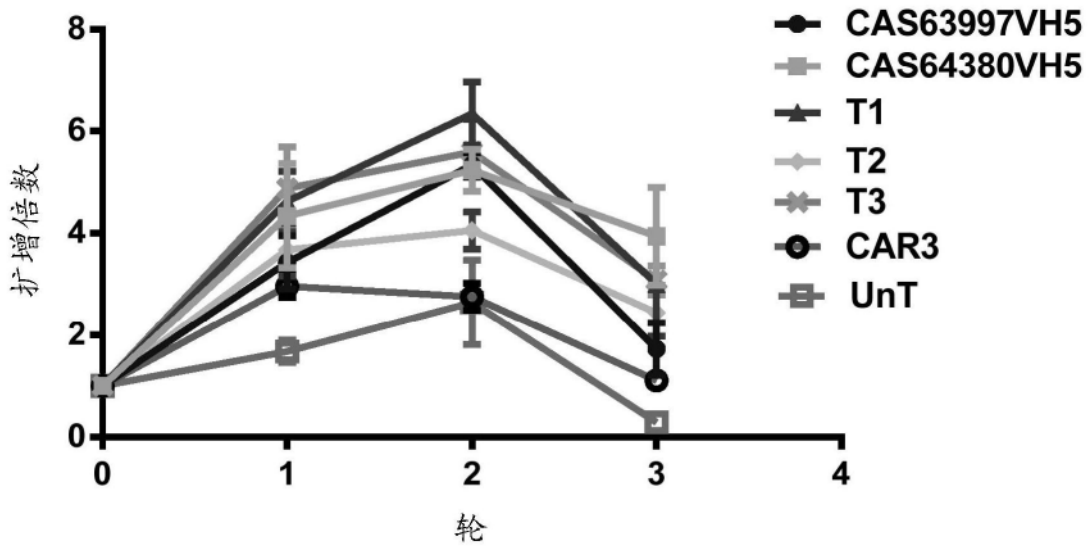


图11T

### DLL3 CAR-T 细胞扩增 (与 HEK-293 共培养)

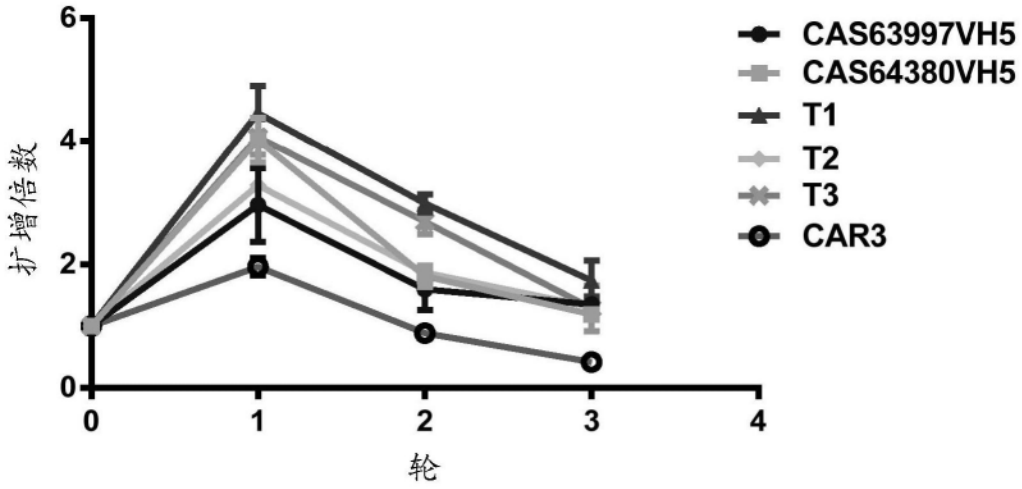


图11U

### DLL3 CAR-T 细胞诱导的对 SHP-77 细胞的细胞毒性 (22 h)

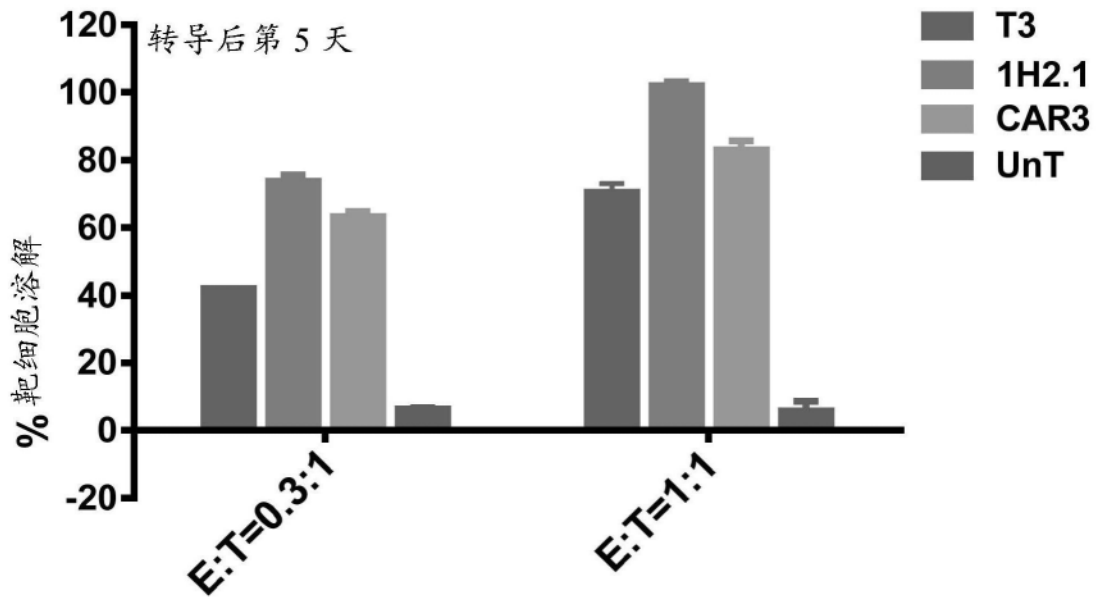


图11V

与 SHP-77 细胞共培养的 DLL3 CAR-T  
细胞中的细胞因子释放

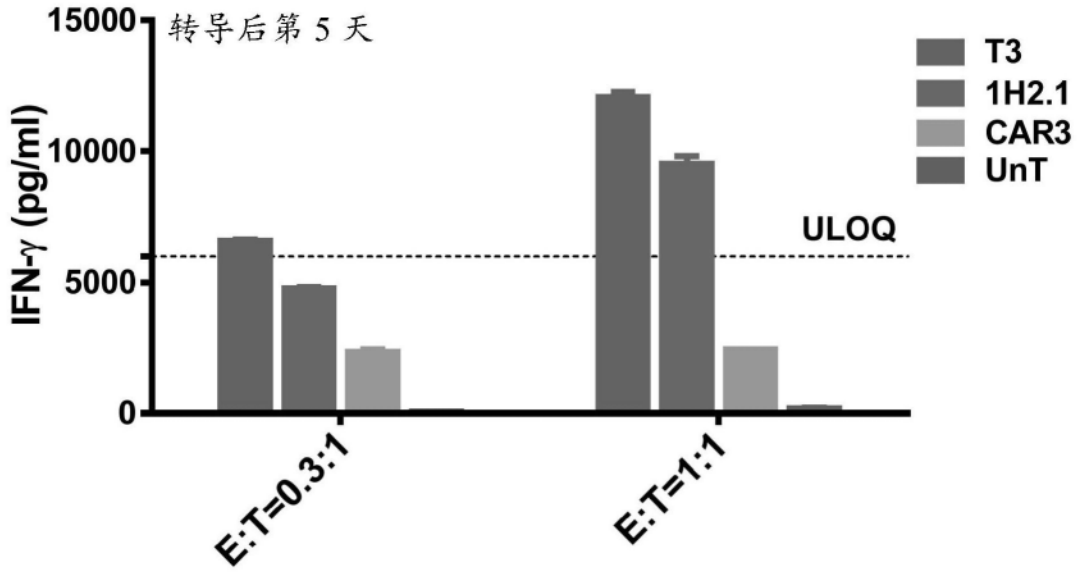


图11W

与 SHP-77 细胞共培养的 DLL3 CAR-T  
细胞中的细胞因子释放

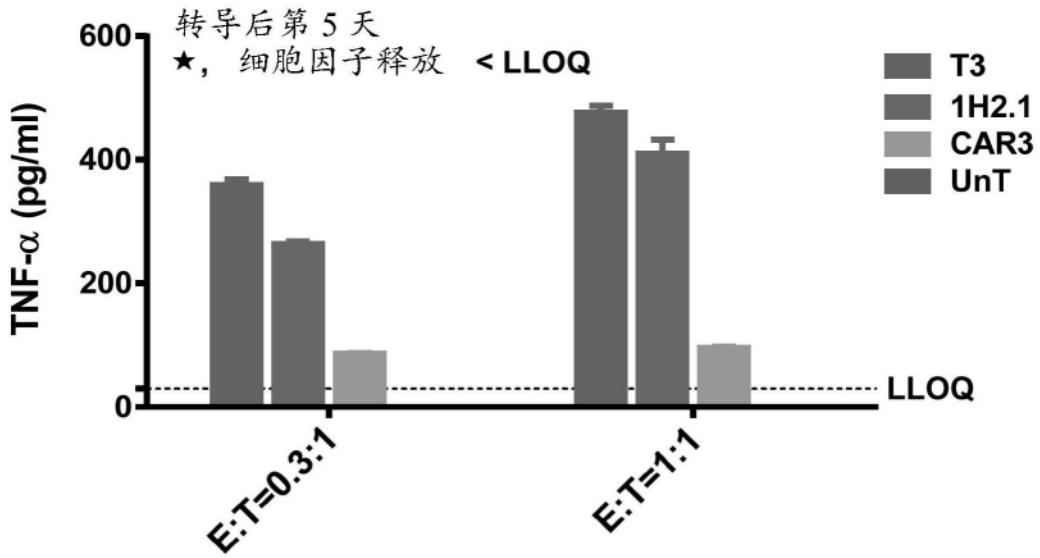


图11X

**DLL3 CAR-T 细胞扩增**  
(与 SHP-77 共培养)

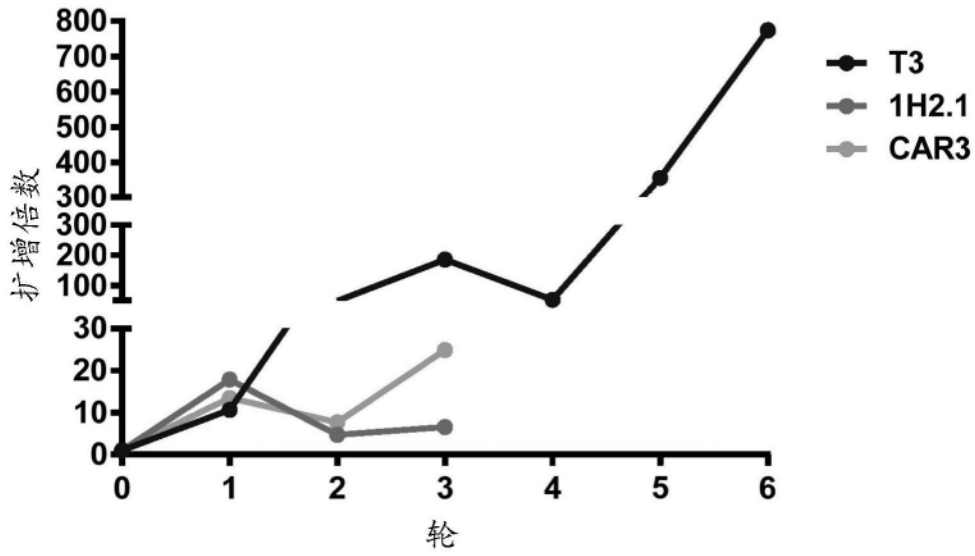


图11Y

与 SHP-77 细胞共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

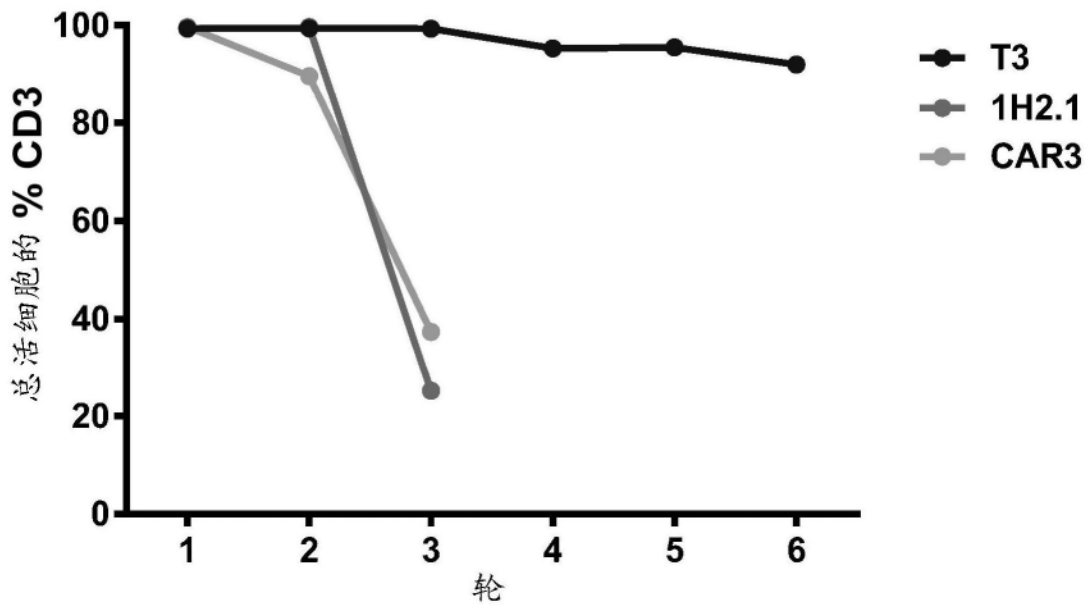


图11Z

与 SHP-77 细胞共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

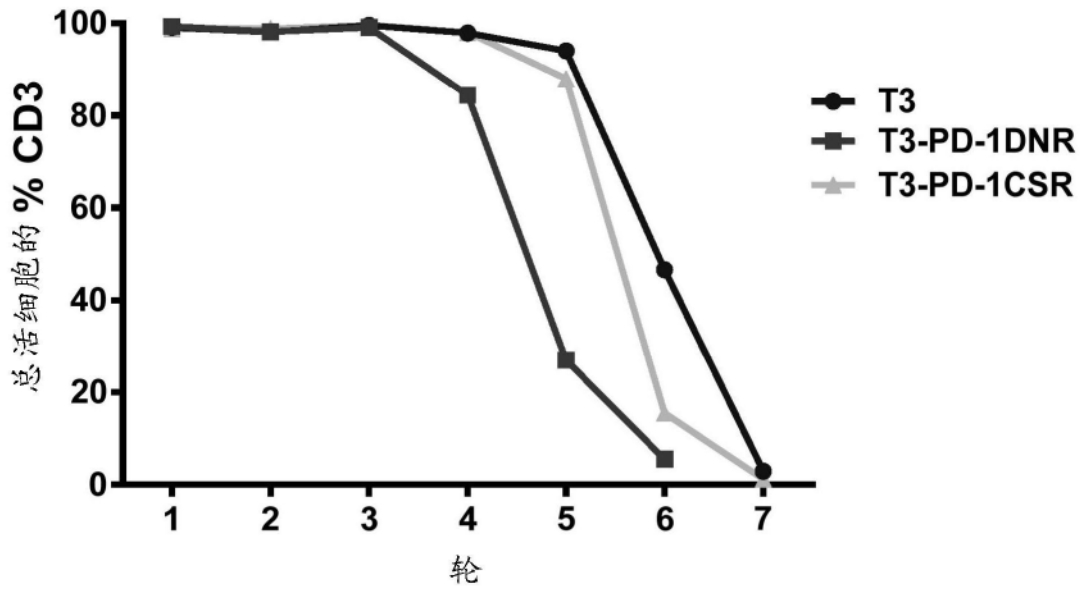


图12A

DLL3 CAR-T 细胞扩增  
(与 SHP-77 共培养)

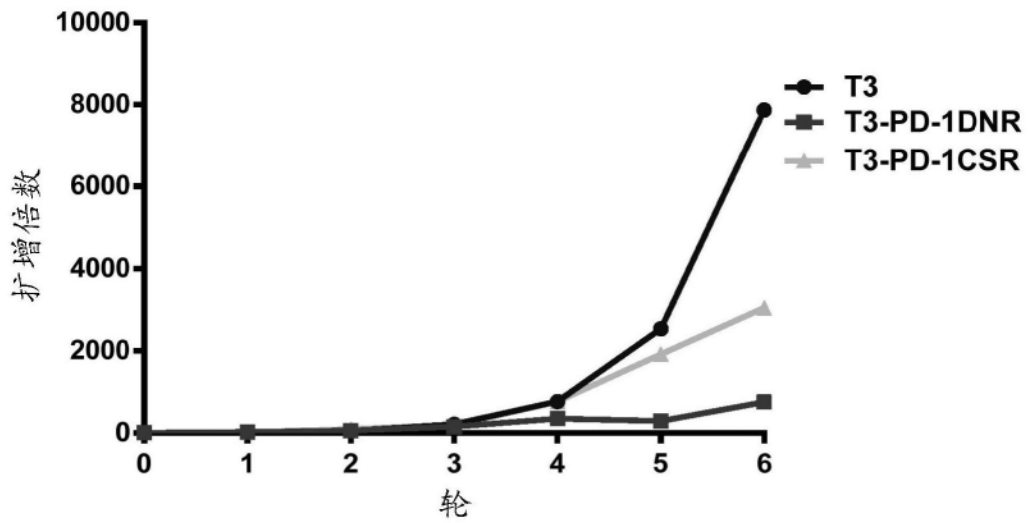


图12B

与 SHP-77/PD-L1 细胞共培养的 DLL3 CAR-T 细胞

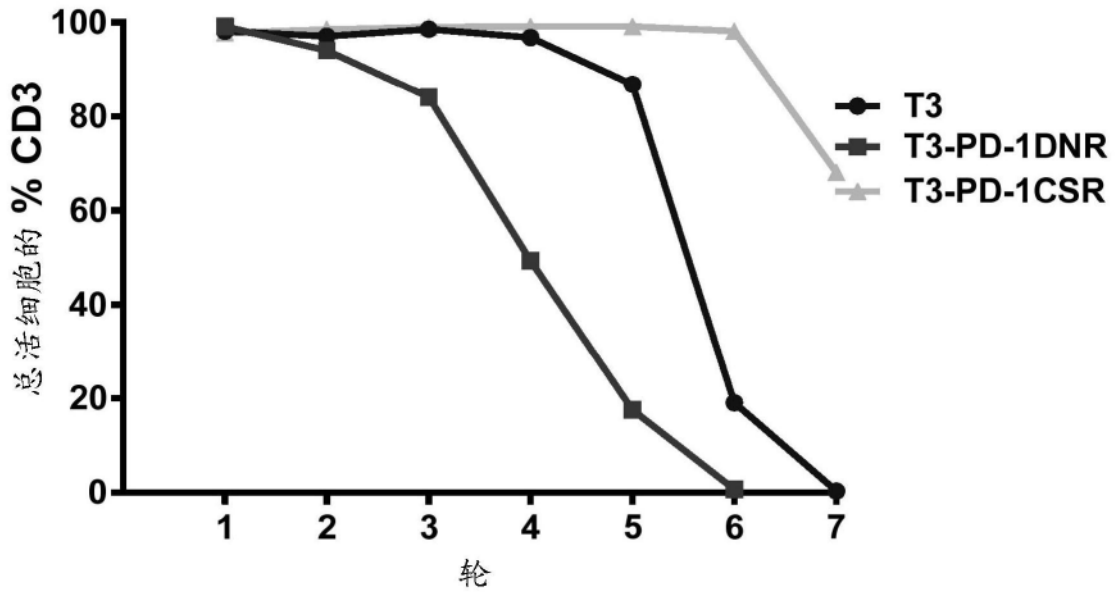


图12C

DLL3 CAR-T 细胞扩增  
(与 SHP-77/PD-L1 共培养)

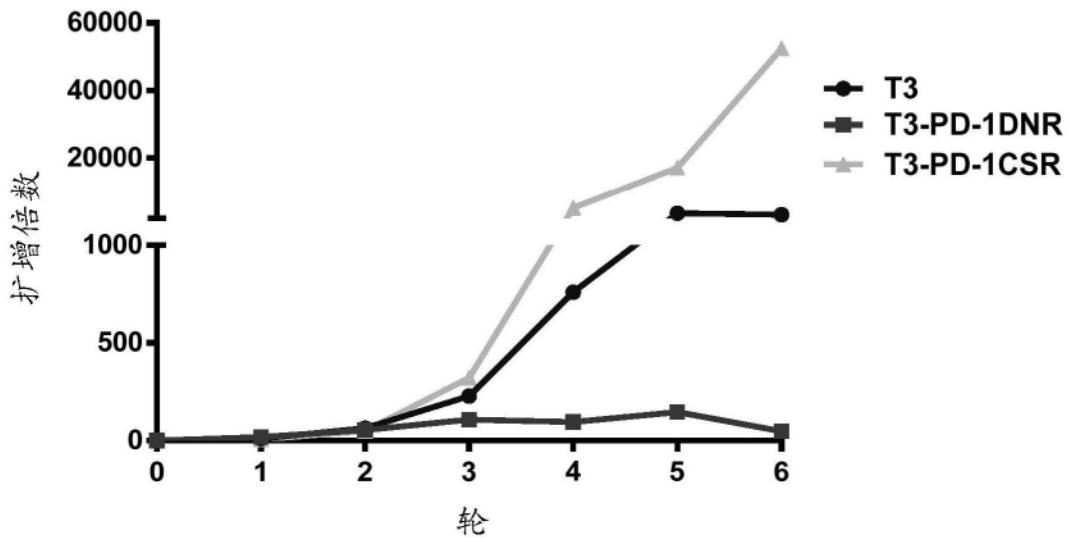


图12D



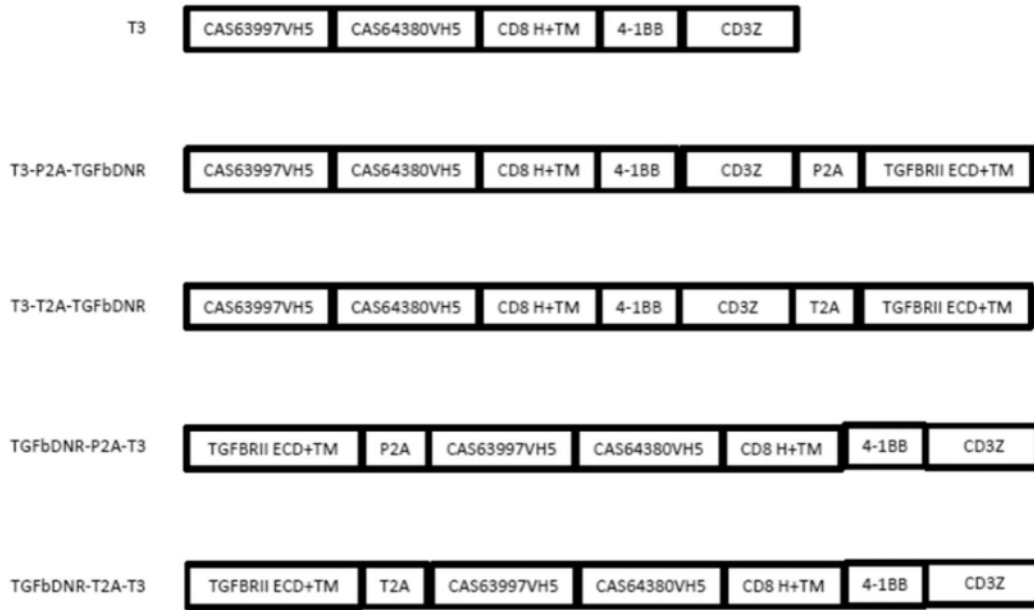


图13A

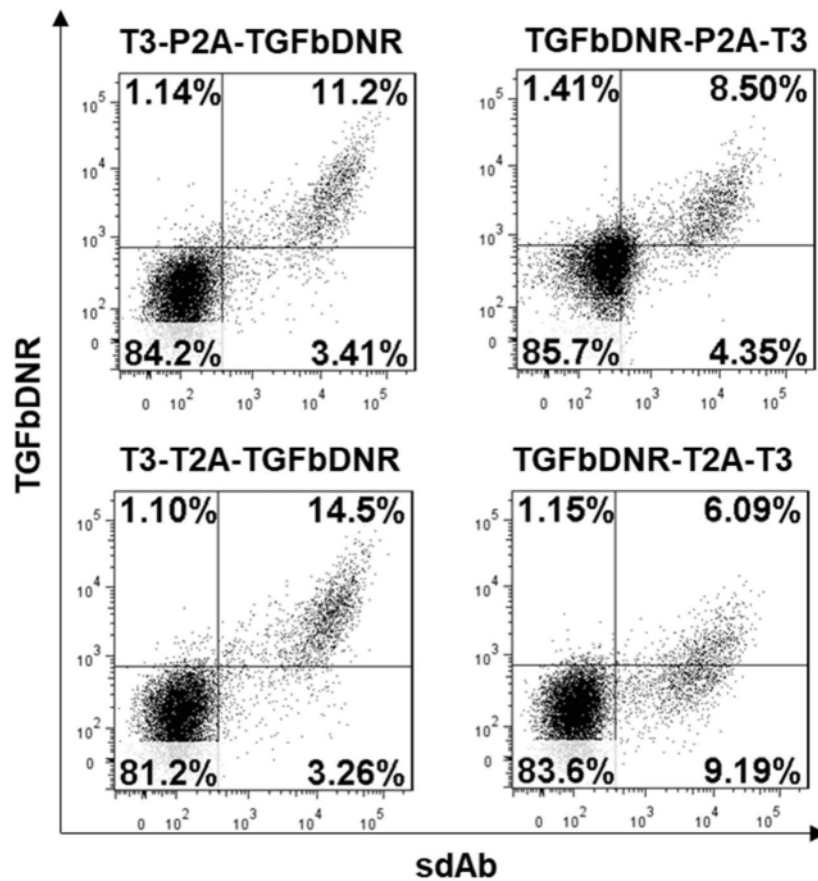


图13B

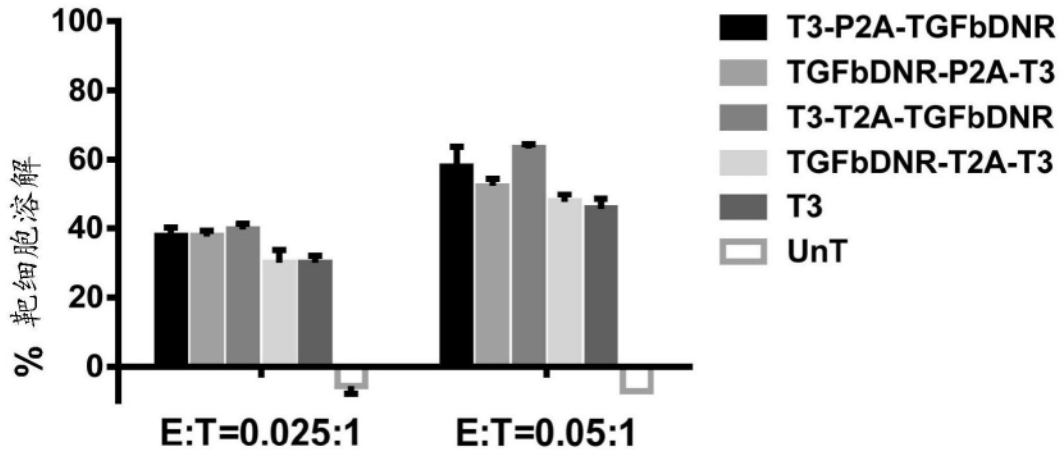


图13C

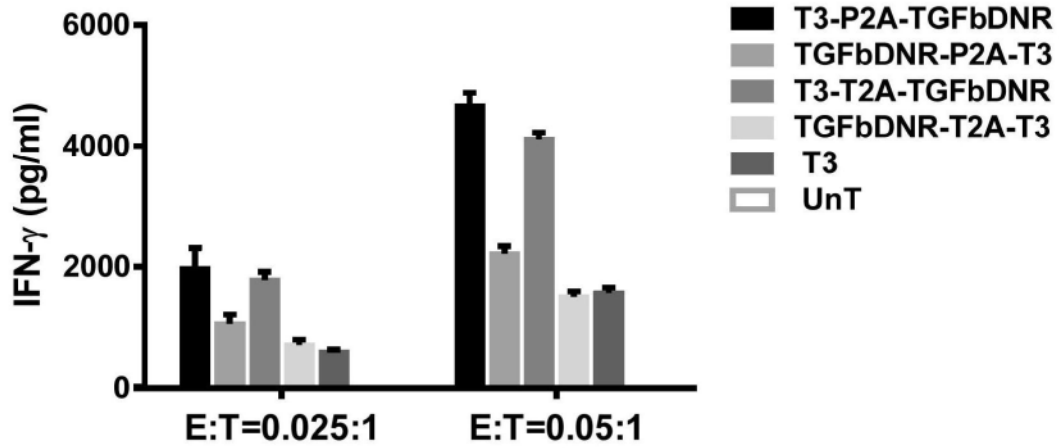


图13D

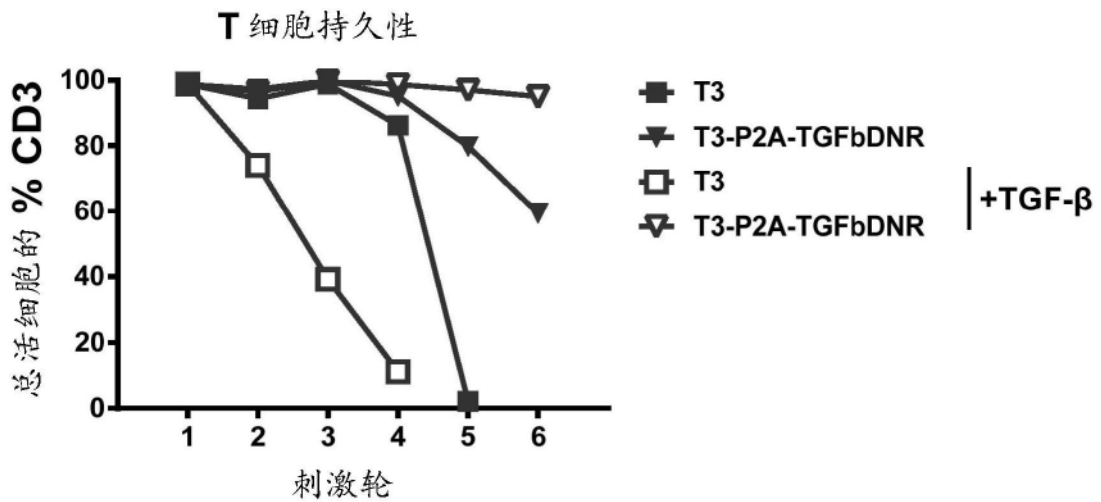


图13E

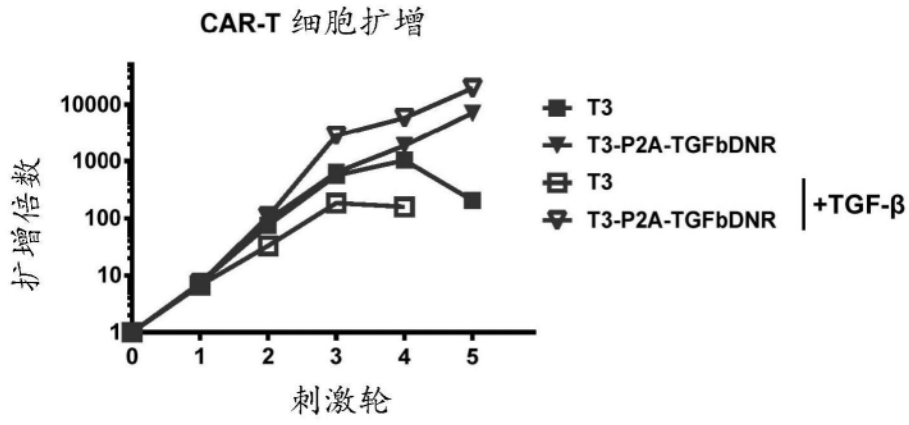


图13F

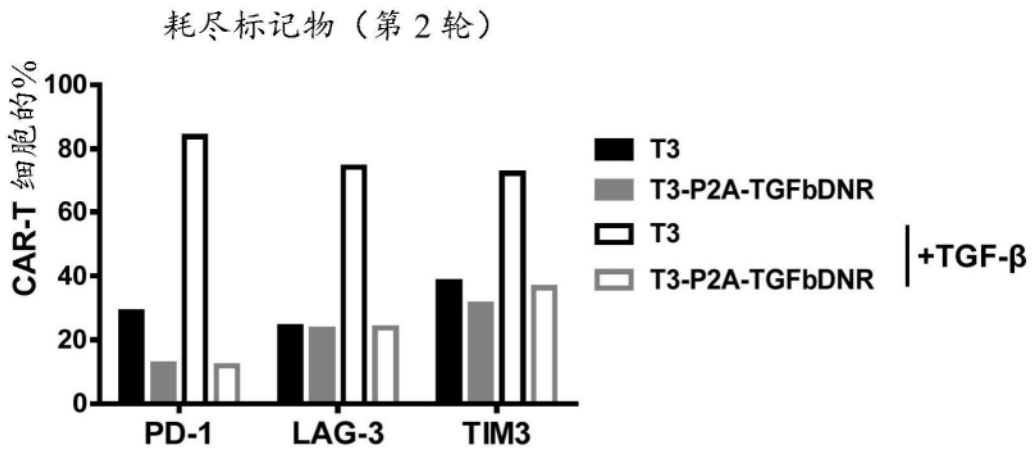


图13G

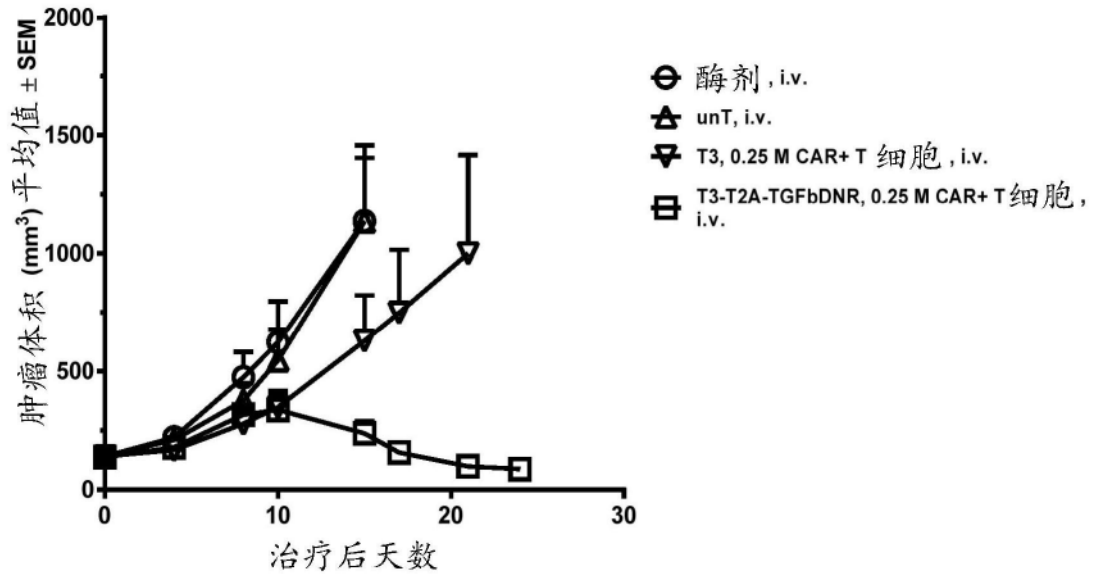


图13H

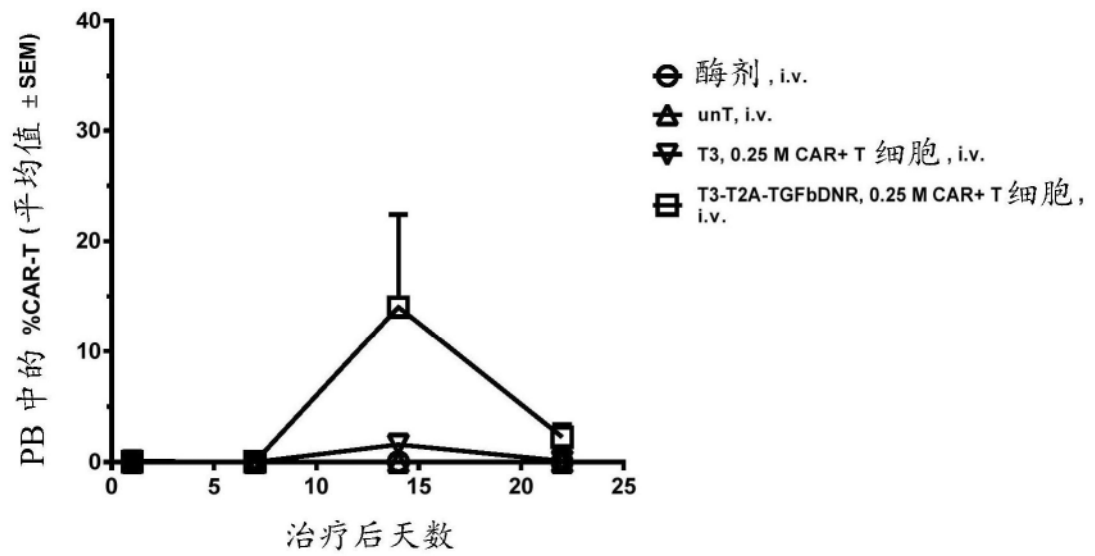


图13I