



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116410315 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 11

(21) 申请号 202111672073.1	G01N 33/574 (2006.01)
(22) 申请日 2021.12.31	G01N 33/573 (2006.01)
(71) 申请人 博生吉医药科技(苏州)有限公司	G01N 33/68 (2006.01)
地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区	A61K 39/00 (2006.01)
星湖街218号生物纳米园B1楼413单元	A61K 39/395 (2006.01)
(72) 发明人 杨林 游凤涛 李亚芬 陈丹	A61K 47/68 (2017.01)
(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司	A61P 35/02 (2006.01)
31266	
专利代理师 徐迅 崔佳佳	

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)  
 C07K 19/00 (2006.01)  
 C12N 5/10 (2006.01)  
 C12N 15/13 (2006.01)  
 C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书35页  
 序列表32页 附图11页

(54) 发明名称

一种新型靶向人FLT3的嵌合抗原受体修饰的T细胞的构建及应用

续控制肿瘤,对于易复发的AML是良好的应对策略。

(57) 摘要

本发明提供了一种针对FLT3的纳米抗体和由其构建的靶向FLT3高表达肿瘤细胞的工程化免疫细胞及其应用。具体地,本发明提供了一种抗针对FLT3的纳米抗体及其嵌合抗原受体CAR序列。本发明还提供了编码上述纳米抗体及CAR相应的表达载体和能够表达其的宿主细胞或工程化免疫细胞,以及本发明纳米抗体及嵌合抗原受体免疫细胞的生产方法。本发明纳米抗体和嵌合抗原受体免疫细胞能够特异性结合人FLT3,且具有高亲和力;本发明嵌合抗原受体免疫细胞对FLT3阳性AML肿瘤细胞株的特异性杀伤十分显著,还具有显著的体内抗肿瘤作用,治疗效果佳且安全性得到了提升;本发明的嵌合抗原受体免疫细胞受FLT3突变的影响小,即使FLT3发生突变,嵌合抗原受体免疫细胞依然保持其靶向性和结合活性,对疗效的限制小;此外,由于嵌合抗原受体免疫细胞能够在体内复制,因此能够长期持

1. 一种针对FLT3的纳米抗体,其特征在于,所述针对FLT3的纳米抗体的重链可变区VHH的互补决定区CDR为选自下组的一种或多种:

(1) SEQ ID NO:18所示的CDR1、SEQ ID NO:19所示的CDR2、和SEQ ID NO:20所示的CDR3;

(2) SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:23所示的CDR3;

(3) SEQ ID NO:24所示的CDR1、SEQ ID NO:19所示的CDR2、和SEQ ID NO:25所示的CDR3;

(4) SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:26所示的CDR2、和SEQ ID NO:27所示的CDR3;

(5) SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:28所示的CDR3;

(6) SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:29所示的CDR3;

(7) SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:30所示的CDR3;

(8) SEQ ID NO:31所示的CDR1、SEQ ID NO:26所示的CDR2、和SEQ ID NO:32所示的CDR3;

(9) SEQ ID NO:33所示的CDR1、SEQ ID NO:34所示的CDR2、和SEQ ID NO:35所示的CDR3;

(10) SEQ ID NO:31所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:36所示的CDR3;

(11) SEQ ID NO:31所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:37所示的CDR3。

2. 如权利要求1所述的针对FLT3的纳米抗体,其特征在于,所述针对FLT3的纳米抗体的VHH的氨基酸序列选自下组:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17,或其组合。

3. 一种针对FLT3的抗体,其特征在于,所述抗体包括一个或多个如权利要求2所述的针对FLT3的纳米抗体。

4. 一种嵌合抗原受体CAR,其特征在于,所述CAR含有一胞外结构域,所述胞外结构域包含如权利要求1所述的针对FLT3的纳米抗体或如权利要求3所述的针对FLT3的抗体。

5. 如权利要求4所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述CAR的氨基酸序列如SEQ ID NO:1、3、4、5、6所示。

6. 如权利要求4或5所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的CAR具有式Ia所示结构:

L1-Nb-H-TM-C-CD3 $\zeta$  (Ia)

式中,

L为无或信号肽序列;

Nb是特异性结合结构域;

H为无或铰链区；

TM为跨膜结构域；

C为共刺激信号结构域；

CD3 $\zeta$ 为源于CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列(包括野生型、或其突变体/修饰体)；

所述“-”连接肽或肽键。

7. 一种工程化免疫细胞,其特征在于,所述工程化免疫细胞含有如权利要求4所述的嵌合抗原受体。

8. 一种制备如权利要求7所述的工程化免疫细胞的方法,包括以下步骤:将如权利要求4所述的嵌合抗原受体转入免疫细胞内,从而获得所述工程化免疫细胞。

9. 一种活性成分的用途,所述活性成分选自下组:如权利要求1所述的针对FLT3的纳米抗体,或如权利要求3所述的针对FLT3的抗体,或如权利要求4所述的嵌合抗原受体,或如权利要求7所述的工程化免疫细胞,或其组合,其特征在于,所述活性成分被用于制备:

(a) 预防和/或治疗FLT3高表达疾病的药物;

(b) 检测FLT3高表达疾病的试剂。

10. 一种药物组合物,其特征在于,所述的药物组合物含有:

(i) 如权利要求1所述的针对FLT3的纳米抗体,或如权利要求3所述的针对FLT3的抗体,或如权利要求4所述的嵌合抗原受体,或如权利要求7所述的工程化免疫细胞,或其组合作为活性成分;和

(ii) 药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

## 一种新型靶向人FLT3的嵌合抗原受体修饰的T细胞的构建及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学及免疫细胞治疗领域,具体涉及一种特异性靶向FLT3的纳米抗体,和由其构建的靶向FLT3高表达肿瘤细胞的工程化免疫细胞,还涉及它们的用途。

### 背景技术

[0002] 急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia,AML)是一种临床预后很差的疾病。虽然大多数患者通过化疗可以达到缓解,但几乎都会复发,需要后期巩固化疗或进行造血干细胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation,HSCT),且大多数患者最终仍会死于疾病,5年生存率只有40-50%。因此,亟需一种治疗AML的新方法来满足现有治疗需求。

[0003] 近几年,嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor,CAR)免疫疗法在B细胞恶性肿瘤的临床研究中展现出非常好的临床疗效,但是,针对AML的CAR-T疗法仍然面临着很大的挑战,我们很难找到一个针对肿瘤的合适靶点,因为表达在AML上的大多数表面分子同时也在造血干/祖细胞(Hematopoietic stem and progenitor cell,HSPC)表面也表达,它会在对AML细胞杀伤的同时也会损伤造血干细胞,从而造成血液毒性。因此找到一个相对安全且疗效较佳的靶点至关重要。

[0004] FLT3(Fms样酪氨酸激酶3,CD135)是人类中由FLT3基因编码的蛋白质,是一种细胞因子受体,属于受体酪氨酸激酶III类。有结果显示,FLT3在大约50%的正常造血干细胞(Hematopoietic stem cells,HSCs)和部分树突状细胞上表达,在脐血淋巴细胞上大部分不表达。但有研究发现,FLT3在AML病人细胞表面高表达,并且在初诊AML患者中,约1/3的患者存在FLT3激活突变。

[0005] 靶向FLT3的药物,目前以小分子抑制剂的数量最多,进展最快,目前共有多个可作用于FLT3的小分子抑制剂药物获批上市,其中第一三共的奎扎替尼(Quizartinib)和安斯泰来的吉瑞替尼(Gilteritinib)属于第二代抑制剂,选择性较高,比第一代抑制剂效果更好,但FLT3抑制剂在临床上只对FLT3-ITD突变的AML病人有效,对FLT3未突变的AML患者无效,而且FLT3容易在酪氨酸激酶结构域部分产生新的突变而对FLT3抑制剂产生耐药性,导致疗效非常有限。

[0006] 近些年来,嵌合抗原受体(CAR)T细胞在B细胞白血病和淋巴瘤患者中取得了前所未有的临床效果,提示这种新颖的治疗方式对于AML患者来说也可能是很有效的。但目前,国内外还没有靶向FLT3的CAR-T产品上市或正式获批临床。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种针对FLT3的纳米抗体、一种由所述纳米抗体构建的嵌合抗原受体免疫细胞,以及它们制法与应用。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种针对FLT3的纳米抗体。

[0009] 在另一优选例中,所述针对FLT3的纳米抗体能够特异性结合FLT3。

[0010] 在另一优选例中,所述针对FLT3的纳米抗体的互补决定区CDR为选自下组的一种或多种:

[0011] (1)SEQ ID NO:18所示的CDR1、SEQ ID NO:19所示的CDR2、和SEQ ID NO:20所示的CDR3;

[0012] (2)SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:23所示的CDR3;

[0013] (3)SEQ ID NO:24所示的CDR1、SEQ ID NO:19所示的CDR2、和SEQ ID NO:25所示的CDR3;

[0014] (4)SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:26所示的CDR2、和SEQ ID NO:27所示的CDR3;

[0015] (5)SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:28所示的CDR3;

[0016] (6)SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:29所示的CDR3;

[0017] (7)SEQ ID NO:21所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:30所示的CDR3;

[0018] (8)SEQ ID NO:31所示的CDR1、SEQ ID NO:26所示的CDR2、和SEQ ID NO:32所示的CDR3;

[0019] (9)SEQ ID NO:33所示的CDR1、SEQ ID NO:34所示的CDR2、和SEQ ID NO:35所示的CDR3;

[0020] (10)SEQ ID NO:31所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:36所示的CDR3;

[0021] (11)SEQ ID NO:31所示的CDR1、SEQ ID NO:22所示的CDR2、和SEQ ID NO:37所示的CDR3。

[0022] 在另一优选例中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸并能保留与FLT3特异性结合能力的衍生序列。

[0023] 在另一优选例中,所述的经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留与FLT3特异性结合能力的衍生序列为同源性或序列相同性为至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的氨基酸序列。

[0024] 在另一优选例中,所述的CDR1、CDR2和CDR3由VHH链的框架区FR1、FR2、FR3和FR4所隔开。

[0025] 在另一优选例中,所述针对FLT3的纳米抗体还包括骨架区FR。

[0026] 在另一优选例中,所述骨架区FR衍生自如SEQ ID NO:7-17所示的氨基酸序列。

[0027] 在另一优选例中,所述的骨架区FR为选自下组的一种或多种:

[0028] (1)SEQ ID NO:38所示的FR1、SEQ ID NO:39所示的FR2、SEQ ID NO:40所示的FR3、和SEQ ID NO:41所示的FR4;

[0029] (2)SEQ ID NO:42所示的FR1、SEQ ID NO:43所示的FR2、SEQ ID NO:44所示的FR3、和SEQ ID NO:41所示的FR4;

- [0030] (3)SEQ ID NO:45所示的FR1、SEQ ID NO:46所示的FR2、SEQ ID NO:47所示的FR3、和SEQ ID NO:48所示的FR4；
- [0031] (4)SEQ ID NO:42所示的FR1、SEQ ID NO:43所示的FR2、SEQ ID NO:49所示的FR3、和SEQ ID NO:50所示的FR4；
- [0032] (5)SEQ ID NO:42所示的FR1、SEQ ID NO:51所示的FR2、SEQ ID NO:52所示的FR3、和SEQ ID NO:53所示的FR4；
- [0033] (6)SEQ ID NO:42所示的FR1、SEQ ID NO:54所示的FR2、SEQ ID NO:44所示的FR3、和SEQ ID NO:55所示的FR4；
- [0034] (7)SEQ ID NO:56所示的FR1、SEQ ID NO:43所示的FR2、SEQ ID NO:57所示的FR3、和SEQ ID NO:58所示的FR4；
- [0035] (8)SEQ ID NO:59所示的FR1、SEQ ID NO:60所示的FR2、SEQ ID NO:61所示的FR3、和SEQ ID NO:50所示的FR4；
- [0036] (9)SEQ ID NO:62所示的FR1、SEQ ID NO:63所示的FR2、SEQ ID NO:64所示的FR3、和SEQ ID NO:48所示的FR4；
- [0037] (10)SEQ ID NO:65所示的FR1、SEQ ID NO:60所示的FR2、SEQ ID NO:66所示的FR3、和SEQ ID NO:67所示的FR4；
- [0038] (11)SEQ ID NO:62所示的FR1、SEQ ID NO:60所示的FR2、SEQ ID NO:68所示的FR3、和SEQ ID NO:48所示的FR4。
- [0039] 在另一优选例中，所述的针对FLT3的纳米抗体的VHH链的氨基酸序列选自下组：SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17，或其组合。
- [0040] 在另一优选例中，所述的针对FLT3的纳米抗体包括人源化抗体、骆驼源抗体、嵌合抗体。
- [0041] 在另一优选例中，所述的针对FLT3的纳米抗体为羊驼。
- [0042] 在本发明的第二方面，提供一种针对FLT3的抗体，所述抗体包括一个或多个如本发明第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体的VHH链。
- [0043] 在另一优选例中，所述的针对FLT3的纳米抗体的VHH链的氨基酸序列选自下组：SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17，或其组合。
- [0044] 在另一优选例中，所述的针对FLT3的抗体，可以为单体、二价抗体、和/或多价抗体。
- [0045] 在本发明的第三方面，提供一种嵌合抗原受体CAR，所述CAR含有一胞外结构域，所述胞外结构域包含如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体，或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体。
- [0046] 在另一优选例中，所述胞外结构域还包括信号肽。
- [0047] 在另一优选例中，所述胞外结构域还包括选自下组蛋白的铰链区：CD8、CD28、CD137、IgG，或其组合。
- [0048] 在另一优选例中，所述铰链区为human IgG1 Fc铰链区。
- [0049] 在另一优选例中，所述胞外结构域含有的抗体具有SEQ ID NO:7-17所示的氨基酸

序列。

[0050] 在另一优选例中,所述胞外结构域含有的抗体其氨基酸序列与SEQ ID NO:7-17的同源性 $\geq 85\%$ ,较佳地 $\geq 90\%$ ,更佳地 $\geq 95\%$ ,或与SEQ ID NO:7-17相比具有1、2或3个氨基酸的差异。

[0051] 在另一优选例中,所述的CAR具有式Ia所示结构:

[0052] L1-Nb-H-TM-C-CD3 $\zeta$  (Ia)

[0053] 式中,

[0054] L为无或信号肽序列;

[0055] Nb是特异性结合结构域;

[0056] H为无或铰链区;

[0057] TM为跨膜结构域;

[0058] C为共刺激信号结构域;

[0059] CD3 $\zeta$ 为源于CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列(包括野生型、或其突变体/修饰体);

[0060] 所述“-”连接肽或肽键。

[0061] 在另一优选例中,所述L分别选自下组蛋白的信号肽:CD8、GM-CSF、CD4、CD28、CD137,或其突变/修饰体,或其组合。

[0062] 在另一优选例中,所述Nb靶向FLT3。

[0063] 在另一优选例中,所述Nb为FLT3纳米抗体。

[0064] 在另一优选例中,所述H选自下组蛋白的铰链区:CD8、CD28、CD137、IgG,或其组合。

[0065] 在另一优选例中,所述H为human IgG1 Fc铰链区。

[0066] 在另一优选例中,所述TM选自下组蛋白的跨膜区:CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CD278、CD152、CD279、CD233,或其突变/修饰体,或其组合。

[0067] 在另一优选例中,所述C选自下组蛋白的共刺激结构域:OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB (CD137)、PD-1、Dap10、LIGHT、NKG2C、B7-H3、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、NKG2D、GITR、OX40L、2B4、TLR,或其突变/修饰体,或其组合。

[0068] 在另一优选例中,所述C选自ICOS、41BB,或其组合的共刺激结构域。

[0069] 在另一优选例中,所述CAR的氨基酸序列如SEQ ID NO:1、3、4、5、6所示。

[0070] 在另一优选例中,所述CAR的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0071] 在本发明的第四方面,提供了一种重组蛋白,所述的重组蛋白具有:

[0072] (i) 如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体;和

[0073] (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

[0074] 在另一优选例中,所述的标签序列包括Fc标签、HA标签、GGGS序列、FLAG标签、Myc标签、6His标签,或其组合。

[0075] 在另一优选例中,所述的重组蛋白特异性结合FLT3。

[0076] 在另一优选例中,所述的重组蛋白(或多肽)包括融合蛋白。

[0077] 在另一优选例中,所述的重组蛋白为单体、二聚体,或多聚体。

- [0078] 在另一优选例中,所述的重组蛋白特异性结合FLT3。
- [0079] 在另一优选例中,所述的标签序列是Fc标签。
- [0080] 在本发明的第五方面,提供一种多核苷酸,所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质:如本发明第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或本发明第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白。
- [0081] 在另一优选例中,本发明涉及编码本发明的针对FLT3的纳米抗体的核酸分子。本发明的核酸可为RNA、DNA或cDNA。
- [0082] 在本发明的第六方面,提供一种表达载体,所述表达载体含有本发明的第五方面所述的多核苷酸。
- [0083] 在另一优选例中,所述的表达载体选自下组:DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子、其他基因转移系统、或其组合。优选地,所述表达载体包括病毒载体,如慢病毒、腺病毒、AAV病毒、逆转录病毒、或其组合。
- [0084] 在另一优选例中,所述的表达载体选自下组:pTomo慢病毒载体、plenti、pLVTH、pLJM1、pHCMV、pLBS.CAG、pHR、pLV、pBlue等。
- [0085] 在另一优选例中,所述的表达载体是pBlue载体。
- [0086] 在另一优选例中,所述的表达载体中还包括选自下组的:启动子、转录增强元件WPRE、长末端重复序列LTR等。
- [0087] 在本发明的第七方面,提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有本发明的第六方面所述的表达载体,或其基因组中整合有本发明的第五方面所述的多核苷酸。
- [0088] 在另一优选例中,所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。
- [0089] 在另一优选例中,所述的宿主细胞选自下组:大肠杆菌、酵母细胞、哺乳动物细胞。
- [0090] 在另一优选例中,所述的宿主细胞为293F细胞。
- [0091] 在本发明的第八方面,提供一种工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞含有本发明的第六方面所述的表达载体或染色体中整合有外源的本发明的第五方面所述的多核苷酸。
- [0092] 在另一优选例中,所述工程化免疫细胞包含如本发明的第三方面所述的嵌合抗原受体。
- [0093] 在另一优选例中,所述工程化免疫细胞选自下组:
- [0094] (i) 嵌合抗原受体 $\alpha\beta$ T细胞(CAR-T细胞);
- [0095] (ii) 嵌合抗原受体 $\gamma\delta$ T细胞(CAR-T细胞);
- [0096] (iii) 嵌合抗原受体NKT细胞(CAR-NKT细胞);
- [0097] (iv) 嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞)。
- [0098] 在另一优选例中,所述工程化免疫细胞包括自体或异体的 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞、NK细胞,或其组合。
- [0099] 在另一优选例中,所述工程化免疫细胞为CAR-T细胞。
- [0100] 在本发明的第九方面,提供一种产生针对FLT3的纳米抗体的方法,包括步骤:
- [0101] (a) 在适合产生纳米抗体的条件下,培养如本发明的第七方面所述的宿主细胞,从而获得含针对FLT3的纳米抗体的培养物;
- [0102] (b) 从所述培养物中分离和/或回收所述的针对FLT3的纳米抗体;和

[0103] (c) 任选地,对步骤(b)获得的针对FLT3的纳米抗体进行纯化和/或修饰。

[0104] 在本发明的第十方面,提供一种制备如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞的方法,包括以下步骤:将如本发明的第五方面所述的多核苷酸或如本发明的第六方面所述的表达载体转导入免疫细胞内,从而获得所述工程化免疫细胞。

[0105] 在另一优选例中,所述的方法还包括对获得的工程化免疫细胞进行功能和有效性检测的步骤。

[0106] 在另一优选例中,所述的方法包括将如本发明的第三方面所述的嵌合抗原受体转导入免疫细胞内,从而获得所述工程化免疫细胞。

[0107] 在本发明的第十一方面,提供一种免疫偶联物,所述免疫偶联物含有:

[0108] (a) 如本发明第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白;和

[0109] (b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、细胞因子、放射性核素、酶、金纳米颗粒/纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP,或其组合。

[0110] 在另一优选例中,所述的(a)部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

[0111] 在另一优选例中,所述的放射性核素包括:

[0112] (i) 诊断用同位素,所述的诊断用同位素选自下组:Tc-99m、Ga-68、F-18、I-123、I-125、I-131、In-111、Ga-67、Cu-64、Zr-89、C-11、Lu-177、Re-188,或其组合;和/或

[0113] (ii) 治疗用同位素,所述的治疗用同位素选自下组:Lu-177、Y-90、Ac-225、As-211、Bi-212、Bi-213、Cs-137、Cr-51、Co-60、Dy-165、Er-169、Fm-255、Au-198、Ho-166、I-125、I-131、Ir-192、Fe-59、Pb-212、Mo-99、Pd-103、P-32、K-42、Re-186、Re-188、Sm-153、Ra223、Ru-106、Na24、Sr89、Tb-149、Th-227、Xe-133、Yb-169、Yb-177,或其组合。

[0114] 在另一优选例中,所述偶联部分为药物或毒素。

[0115] 在另一优选例中,所述的药物为靶向治疗FLT3高表达疾病的药物。

[0116] 在另一优选例中,所述的药物为靶向治疗急性髓系白血病的药物。

[0117] 在另一优选例中,所述的药物为细胞毒性药物。

[0118] 在另一优选例中,所述的细胞毒性药物选自下组:抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱,或其组合。

[0119] 特别有用的细胞毒性药物类的例子包括,例如,DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(Auristatins)、喜树碱(Camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(Duocarmycins)、依托泊甙(Etoposides)、美登木素(Maytansines)和美登素类化合物(Maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(Taxanes)、苯二氮卓类(Benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(Benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs),吲哚啉苯并二氮卓类(Indolinobenzodiazepines)和噁唑啉烷并苯并二氮卓类(Oxazolidinobenzodiazepines))、长春花生物碱(Vinca alkaloids),或其组合。

[0120] 在另一优选例中,所述的毒素选自下组:耳他汀类(例如,耳他汀E、耳他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙

(Tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ -八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(Mitogellin)、局限曲菌素(Retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(Curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(*Saponaia officinalis*)抑制剂、糖皮质激素,或其组合。

[0121] 在另一优选例中,所述偶联部分为可检测标记物。

[0122] 在另一优选例中,所述偶联部分选自下组:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂,或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))或任何形式的纳米颗粒。

[0123] 在另一优选例中,所述免疫偶联物含有:多价(如二价)的如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体的VHH链。

[0124] 在另一优选例中,所述多价是指在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的相同或不同的如本发明的第一方面所述针对FLT3的纳米抗体VHH链。

[0125] 在本发明的第十二方面,提供一种活性成分的用途,所述活性成分选自下组:如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或如本发明第十一方面所述的免疫偶联物,或其组合,所述活性成分被用于制备:

[0126] (a)预防和/或治疗FLT3高表达疾病的药物;

[0127] (b)检测FLT3高表达疾病的试剂。

[0128] 在另一优选例中,所述活性成分选自下组:如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或其组合。

[0129] 在另一优选例中,所示试剂为诊断试剂,较佳地,所述的诊断试剂为检测片或检测板。

[0130] 在另一优选例中,所述诊断试剂用于:检测样品中的FLT3蛋白或其片段。

[0131] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病选自:急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病(Acute lymphoblastic leukemia, ALL)、慢性髓性白血病(Chronic myelogenous leukemia, CML)、骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic syndromes, MDS)等。

[0132] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病为急性髓系白血病。

[0133] 在本发明的第十三方面,提供了一种体外检测样品中FLT3蛋白或其片段的方法,所述方法包括步骤:

[0134] (1)在体外,将所述样品与如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或如本发明第十一方面所述的免疫偶联物,或其组合接触;

[0135] (2)检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在FLT3蛋白

或其片段。

[0136] 在另一优选例中,所述的检测包括诊断性的或非诊断性的。

[0137] 在本发明的第十四方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物含有:

[0138] (i) 如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或如本发明第十一方面所述的免疫偶联物,或其组合作为活性成分;和

[0139] (ii) 药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0140] 在另一优选例中,所述活性成分选自下组:如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或其组合。

[0141] 在另一优选例中,所述药物组合物的剂型选自下组:注射剂、冻干剂。

[0142] 在另一优选例中,所述的药物组合物包括0.01~99.99%的如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白,或如本发明第十一方面所述的免疫偶联物,或其组合和0.01~99.99%的药用载体,所述百分比为占所述药物组合物的质量百分比。

[0143] 在另一优选例中,所述活性成分中所述工程化的免疫细胞的浓度为 $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^8$ 个细胞/mL,较佳地 $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^7$ 个细胞/mL。

[0144] 本发明的第十五方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒中包括:

[0145] (1) 第一容器,所述第一容器中含有如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或如本发明第十一方面所述的免疫偶联物,或其组合;和/或

[0146] (2) 第二容器,所述第二容器中含有抗所述第一容器内容物的二抗;

[0147] 或者,

[0148] 所述试剂盒含有一检测板,所述检测板包括:基片(支撑板)和测试条,所述的测试条含有如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体、如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的重组蛋白,或如本发明第八方面所述的免疫偶联物,或其组合。

[0149] 在另一优选例中,所述试剂盒中还含有一说明书,根据所述的说明书记载,所述的试剂盒用于非侵入性地检测待测对象的FLT3的表达。

[0150] 在另一优选例中,所述的试剂盒用于FLT3高表达疾病的检测。

[0151] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病选自:急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征等。

[0152] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病为急性髓系白血病。

[0153] 在本发明的第十六方面,提供了一种预防和/或治疗FLT3高表达疾病的方法,所述方法包括:给需要的对象施用如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本

发明第四方面所述的重组蛋白,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或如本发明第十一方面所述的免疫偶联物,或如本发明的第十四方面所述的药物组合物,或其组合。

[0154] 在另一优选例中,所述对象包括哺乳动物,如人。

[0155] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病选自:急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征等。

[0156] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病为急性髓系白血病。

[0157] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞或药物组合物中所包含的CAR免疫细胞是来源于所述对象的细胞(自体细胞)。

[0158] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞或药物组合物中所包含的CAR免疫细胞是来源于健康个体的细胞(异体细胞)。

[0159] 在另一优选例中,所述的方法可与其他治疗方法联合使用。

[0160] 在另一优选例中,所述的其他治疗方法包括化疗、放疗、靶向治疗等方法。

[0161] 在本发明的第十七方面,提供了一种针对FLT3高表达疾病的诊断方法,包括步骤:

[0162] (i) 从诊断对象获取一样品,将所述的样品与如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白,或如本发明第八方面所述的工程化免疫细胞,或如本发明第十一方面所述的免疫偶联物,或其组合接触;和

[0163] (ii) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示所述的对象为FLT3高表达疾病的确诊患者。

[0164] 在另一优选例中,所述的样品为血液样品或咽拭子样品,或其他组织器官中的样品。

[0165] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病选自:急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征等。

[0166] 在另一优选例中,所述FLT3高表达疾病为急性髓系白血病。

[0167] 在本发明的第十八方面,提供了一种重组多肽的制备方法,所述的重组多肽是如本发明的第一方面所述的针对FLT3的纳米抗体,或如本发明的第二方面所述的针对FLT3的抗体,或如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体,或如本发明第四方面所述的重组蛋白,所述的方法包括:

[0168] (a) 在适合表达的条件下,培养如本发明第五方面所述的宿主细胞;和

[0169] (b) 从培养物中分离出所述的重组多肽。

[0170] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

[0171] 图1显示了VHH片段的扩增结果。

[0172] 图2显示了酵母展示库多样性比对结果。

[0173] 图3显示了第一次分选后流式检测结果。

[0174] 图4显示了第二次分选后流式检测结果。

- [0175] 图5显示了酵母单克隆流式检测结果。
- [0176] 图6显示了构建的VHH真核表达载体的结构。
- [0177] 图7显示了FLT3单域抗体真核表达流式检测结果。
- [0178] 图8A-8K显示了靶向FLT3的单域抗体序列信息。
- [0179] 图9显示了FLT3-CAR载体结构图,其中FC为human IgG1 Fc铰链区。
- [0180] 图10显示了不同结构的FLT3-CAR慢病毒滴度检测结果。
- [0181] 图11显示了不同肿瘤细胞株表面FLT3的表达情况。
- [0182] 图12显示了不同结构FLT3-CAR-T对Raji细胞(FLT3阴性细胞株)的体外杀伤。
- [0183] 图13显示了不同结构FLT3-CAR-T对FLT3阳性肿瘤细胞株的体外杀伤。靶细胞分别为MV-4-11、MOLM-13、AML3,设置不同的效靶比。
- [0184] 图14显示了不同结构FLT3-CAR-T与FLT3阳性肿瘤细胞株孵育后上清中细胞因子Granzyme-B的分泌情况。靶细胞分别为MV-4-11、MOLM-13、AML3,效靶比分别为1:1。
- [0185] 图15显示了不同结构FLT3-CAR-T对FLT3阳性肿瘤细胞株MV-4-11的持续杀伤。靶细胞分别为MV-4-11,效靶比分别为1:1和1:5。每隔24h或48小时补加一次肿瘤细胞。
- [0186] 图16显示了人HSPC细胞表面FLT3和CD33的表达情况。
- [0187] 图17显示了CD34+HSPC细胞分别与不同FLT3-CAR-T细胞孵育后细胞因子的释放情况。
- [0188] 图18显示了不同CAR-T细胞与CD34+HSPC细胞孵育后克隆形成情况。BFU-E代表HSPC细胞中红系细胞的克隆形成数量,CFU-GM代表HSPC细胞中粒系和巨噬细胞的克隆形成情况。
- [0189] 图19显示了TAA05-CAR-T对OCI-AML3-Luc-GFP模型鼠的药效实验方案。
- [0190] 图20显示了TAA05-CAR-T对AML3-Luc-GFP模型小鼠的药效实验小鼠活体荧光成像。A.小鼠给药后不同时间的活体成像;B.D16至D23小鼠活体成像荧光值的生长情况:CAR-T组的5只小鼠中有4只出现负增长,反映出CAR-T回输后肿瘤出现了消退的现象。
- [0191] 图21显示了TAA05-CAR-T对AML3-Luc-GFP模型鼠的药效实验小鼠体重及生存期。A.各组小鼠的体重变化曲线:PBS和Mock T组小鼠在发病后均出现体重下降的情况,CAR-T组小鼠体重一直比较平稳;B.小鼠生存期:CAR-T组小鼠生存期明显延长。

### 具体实施方式

[0192] 本发明人经过广泛而深入的研究,经过大量的筛选,首次开发了一种新型FLT3纳米抗体,并基于开发的FLT3纳米抗体成功构建了靶向FLT3的FLT3-CAR-T细胞,用于治疗难治复发AML等肿瘤患者。本发明人通过大量的体外功能实验和动物实验证明了开发的FLT3-CAR-T细胞产品对AML肿瘤细胞具有显著的体外和体内抗肿瘤作用,并证明了同CD33-CAR-T细胞相比,本发明的FLT3-CAR-T细胞具有更好的安全性。在此基础上完成了本发明。本发明的靶向FLT3的新型FLT3-CAR-T可以作为靶向治疗难治复发AML的一种新型治疗手段。

[0193] 本发明以CAR-T细胞为例,代表性地对本发明的工程化免疫细胞进行详细说明。本发明的工程化免疫细胞不限于上下文所述的CAR-T细胞,本发明的工程化免疫细胞具有与上下文所述的CAR-T细胞相同或类似的技术特征和有益效果。具体地,当免疫细胞表达嵌合抗原受体CAR时,NK细胞等同于T细胞(或T细胞可替换为NK细胞)。

[0194] 术语

[0195] 如本文所用,术语“单域抗体”、“本发明的单域抗体”、“重组抗体”、“FLT3纳米抗体”、“抗FLT3纳米抗体”可互换使用,均指本发明中与靶蛋白FLT3特异性结合的重组/单域抗体。

[0196] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。

[0197] 本发明的纳米抗体的抗体编号以及对应的序列编号如下表1所示。

[0198] 表1

序号	抗体编号	CDR1	CDR2	CDR3	FR1	FR2	FR3	FR4	VHH链氨基酸序列编号
1	C-F15-10	18	19	20	38	39	40	41	7
2	C-F21-1	21	22	23	42	43	44	41	8
3	C-A5-11	24	19	25	45	46	47	48	9
4	C-1-D3	21	26	27	42	43	49	50	10
[0199] 5	C-1-G3	21	22	28	42	51	52	53	11
6	C-2-C2	21	22	29	42	54	44	55	12
7	C-1-E6	21	22	30	56	43	57	58	13
8	C-2-D8	31	26	32	59	60	61	50	14
9	C-2-A5	33	34	35	62	63	64	48	15
10	C-2-A3	31	22	36	65	60	66	67	16
11	C-2-C4	31	22	37	62	60	68	48	17

[0200] 注:表中各个数值表示序列编号,即“1”表示“SEQ ID NO:1”,表中显示的CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4的序列编号为其氨基酸序列的编号。

[0201] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0202] 如本文所用,术语“单域抗体”、“VHH”、“纳米抗体(Nanobody)”、“单域抗体(Single domain antibody, sdAb,或纳米抗体nanobody)”具有相同的含义并可互换使用,指克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH),它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的抗体后,再克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)。

[0203] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗

体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区 (CDR) 或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为骨架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 $\beta$ -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 $\beta$ 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0204] 如本领域技术人员所知,免疫偶联物及融合表达产物包括:药物、毒素、细胞因子(Cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本发明还包括与所述的针对新型冠状病毒的纳米抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

[0205] 如本文所用,术语“重链可变区”与“VH”可互换使用。

[0206] 如本文所用,术语“可变区”与“互补决定区(Complementarity determining region,CDR)”可互换使用。

[0207] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链可变区包括三个互补决定区CDR1、CDR2、和CDR3。

[0208] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区。

[0209] 在本发明中,术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用,都指特异性结合FLT3蛋白的多肽,例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

[0210] 本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地,本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少90%同源性,较佳地至少95%同源性。

[0211] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的3个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个骨架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 $\beta$ 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0212] 本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣,因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此,本发明包括那些具有带CDR的抗体重链可变区的分子,只要其CDR与此处鉴定的CDR具有90%以上(较佳地95%以上,最佳地98%以上)的同源性。

[0213] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0214] 如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代

基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0215] 本发明抗体指具有FLT3蛋白结合活性的、包括上述CDR区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述CDR区的多肽的变异形式。这些变异形式包括(但不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

[0216] 该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

[0217] 本发明还提供了其他多肽,如包含抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了本发明抗体的片段。通常,该片段具有本发明抗体的至少约50个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

[0218] 在本发明中,“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表2进行氨基酸替换而产生。

[0219] 表2

[0220]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu

[0221] 本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0222] 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0223] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0224] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，更佳地至少70%，更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2 \times \text{SSC}$ ，0.1% SDS，60℃；或(2) 杂交时加有变性剂，如50% (v/v) 甲酰胺，0.1% 小牛血清/0.1% Ficoll，42℃等；或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上，更好是95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0225] 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签(如6His)融合在一起，形成融合蛋白。

[0226] 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

[0227] 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0228] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

[0229] 宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；果蝇S2或Sf9的昆虫细胞；CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

[0230] 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 $\text{CaCl}_2$ 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 $\text{MgCl}_2$ 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0231] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0232] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0233] 本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

[0234] 用于诊断目的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0235] 可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于:1.放射性核素;2.生物毒;3.细胞因子如IL-2等;4.金纳米颗粒/纳米棒;5.病毒颗粒;6.脂质体;7.纳米磁粒;8.前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))等。

[0236] 纳米抗体(Nb)

[0237] 如本文所用,术语“纳米抗体”(Nanobody, Nb)指在羊驼外周血液中存在一种天然缺失轻链的抗体,纳米抗体和传统抗体的主要区别在于它们的结构和结构域:传统的抗体有两个可变域,称为VH和VL,它们相互提供稳定性和结合特异性;纳米抗体只包含一个重链可变区(VHH)、一个铰链区和两个常规的恒定区CH2与CH3,缺乏VL结构域,但仍然高度稳定。缺少VL结构域也意味着纳米体有亲水的一面,且纳米抗体不像人工改造的单链抗体片段(scFv)那样容易相互沾粘,甚至聚集成块。更重要的是单独克隆并表达出来的VHH结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性,是已知的可结合目标抗原的最小单位。VHH晶体为2.5nm,长4nm,分子量只有15KDa。

[0238] 纳米抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的3个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 $\beta$ 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0239] 嵌合抗原受体(CAR)

[0240] 如本文所用,嵌合免疫抗原受体包括细胞外结构域、任选的铰链区、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括任选的信号肽和靶点特异性结合结构域(也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域包括共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 链部分。CAR在T细胞中表达时,胞外段可识别一个特异的抗原,随后通过胞内结构域转导该信号,引起细胞的活化增殖、细胞溶解毒性和分泌细胞因子如IL-2和IFN- $\gamma$ 等,影响肿瘤细胞,导致肿瘤细胞不生长、被促使死亡或以其他方式被影响,并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共刺激分子和CD3 $\zeta$ 链中的一个或多个的细胞内结构域融合。

[0241] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)

[0242] 如本文所用,术语“CAR-T细胞”、“CAR-T”、“FLT3-CAR-T细胞”、“本发明的CAR-T细胞”等均指本发明第八方面所述的CAR-T细胞。本发明CAR-T细胞可用于治疗FLT3高表达的肿瘤,如急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征等。

[0243] CAR-T细胞较其它基于T细胞的治疗方式存在以下优势:(1)CAR-T细胞的作用过程不受MHC的限制;(2)鉴于很多肿瘤细胞表达相同的肿瘤抗原,针对某一种肿瘤抗原的CAR基因构建一旦完成,便可以广泛利用;(3)CAR既可以利用肿瘤蛋白质抗原,又可利用糖脂类非蛋白质抗原,扩大了肿瘤抗原的靶点范围;(4)使用患者自体细胞降低了排异反应的风险;(5)CAR-T细胞具有免疫记忆功能,可以长期在体内存活。

[0244] 嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞)

[0245] 如本文所用,术语“CAR-NK细胞”、“CAR-NK”、“FLT3-CAR-NK细胞”、“本发明的CAR-NK细胞”等均指本发明第八方面所述的CAR-NK细胞。本发明CAR-NK细胞可用于治疗FLT3高表达的肿瘤,如急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征等。

[0246] 自然杀伤细胞(Natural killer cell,NK)是一类主要的免疫效应细胞,通过非抗原特异性途径去保护机体免受病毒感染和肿瘤细胞的侵袭。通过工程化(基因修饰)的NK细胞可能获得新的功能,包括特异性识别肿瘤抗原的能力及具有增强的抗肿瘤细胞毒作用。

[0247] 与自体CAR-T细胞相比,CAR-NK细胞还具有以下优点,例如:(1)通过释放穿孔素和颗粒酶直接杀伤肿瘤细胞,而对机体正常的细胞没有杀伤作用;(2)它们释放很少量的细胞因子从而降低了细胞因子风暴的危险;(3)体外极易扩增及发展为“现成的”产品。除此之外,与CAR-T细胞治疗类似。

[0248] FLT3

[0249] FLT3(Fms-like tyrosine kinase,FMS样的酪氨酸激酶3)属于III型受体酪氨酸激酶(Receptor tyrosine kinase III,RTK III)家族成员,近年来,许多大样本研究已经证实FLT3的激活突变在AML等疾病的发生及进展中起到十分重要的病理作用。

[0250] 具有FLT3/ITD激活突变的AML患者通常具有外周血白细胞计数高,临床预后较差,易复发等独特的临床特征,并且由于FLT3激活突变的检测方法简单易行,故有越来越多的研究者致力于将FLT3发展成为AML患者常规的检测手段用来指导AML患者的治疗和预后的判断以及作为微小残留白血病的检测手段,并将其作为白血病患者化疗药物的又一新的靶点(目前已经有针对FLT3-ITD突变进行治疗的药物)。现已证实FLT3的激活突变主要有两种:内部串联重复(Internal tandem duplication,ITD),在AML和MDS患者中的发生率分别为15~35%和5~10%,在ALL中的发生率<1%,且主要见于双表型的ALL病例;活化环中的点突变(Point mutation in the activation loop,TKD点突变),在AML、MDS和ALL患者中的发生率分别为5~10%、2~5%和1~3%。FLT3的这两种激活突变均能引起FLT3发生自动磷酸化进而导致FLT3发生配体非依赖性的组成性激活,进一步激活其下游异常的信号传导,从而起到促进增殖和抑制凋亡的作用,使得具有此突变表型的白血病患者临床预后较差

[0251] 药物组合物

[0252] 本发明还提供了一种组合物。优选地,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的

抗体或其活性片段或其融合蛋白,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0253] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约10微克/千克体重至约50毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0254] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重至约10毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0255] 针对FLT3的纳米抗体

[0256] 在本发明中,所述针对FLT3的纳米抗体包括单体、二价体(二价抗体)、四价体(四价抗体)、和/或多价体(多价抗体)。

[0257] 在本发明的一个优选例中,所述针对FLT3的纳米抗体包括一条或多条具有如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VHH链。

[0258] 标记的抗体

[0259] 在本发明的一个优选例中,所述抗体带有可检测标记物。更佳地,所述的标记物选自下组:同位素、胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

[0260] 胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中,针对FLT3蛋白的抗体用胶体金标记,得到胶体金标记的抗体。

[0261] 本发明的针对FLT3的纳米抗体能够有效结合FLT3蛋白。

[0262] 检测方法

[0263] 本发明还涉及检测FLT3蛋白或其片段的方法。该方法步骤大致如下:获得细胞和/或组织样本;将样本溶解在介质中;检测在所述溶解的样本中FLT3蛋白的水平。

[0264] 在本发明的检测方法中,所使用的样本没有特别限制,代表性的例子是存在于细胞保存液中的含细胞的样本。

[0265] 试剂盒

[0266] 本发明还提供了一种含有本发明的抗体(或其片段)或检测板的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

[0267] 本发明还提供了用于检测FLT3蛋白水平的检测试剂盒,该试剂盒包括识别FLT3蛋白的抗体,用于溶解样本的裂解介质,检测所需的通用试剂和缓冲液,如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

**[0268] 制剂**

[0269] 本发明提供了一种含有本发明第八方面所述的工程化免疫细胞(如CAR-T细胞),以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方式中,所述制剂为液态制剂。优选地,所述制剂为注射剂。优选地,所述制剂中所述CAR-T细胞的浓度为 $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^8$ 个细胞/mL,更优选地 $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^7$ 个细胞/mL。

[0270] 在一个实施方式中,所述制剂可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的制剂优选配制用于静脉内施用。

**[0271] 应用**

[0272] 如上所述,本发明的抗体有广泛生物应用价值和临床应用价值,其应用涉及到与FLT3蛋白相关的疾病的诊断和治疗、基础医学研究、生物学研究等多个领域。一个优选的应用是用于针对FLT3蛋白的临床诊断、预防和治疗。

[0273] 本发明也提供了刺激靶向哺乳动物肿瘤细胞群或组织的T细胞所介导的免疫应答的方法,其包括以下步骤:给哺乳动物施用本发明的CAR-T细胞。

[0274] 在一个实施方式中,本发明包括一类细胞疗法,分离病人自体T细胞(或者异源供体),激活并进行基因改造产生CAR-T细胞,随后注入同一病人体内。这种方式使移植物抗宿主反应的发生概率极低,抗原被T细胞以无MHC限制方式识别。此外,一种CAR-T就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法,CAR-T细胞能够体内复制,产生可导致持续控制肿瘤的长期持久性。

[0275] 在一个实施方式中,本发明的CAR-T细胞可经历稳定的体内扩增并可持续数月至数年的时间。另外,CAR介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分,其中,CAR-T细胞可诱导对CAR抗原结合结构域所识别的抗原的高表达肿瘤细胞的特异性免疫应答。例如,本发明的CAR-T细胞引起针对FLT3高表达的肿瘤细胞的特异性免疫应答。

[0276] 可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤,以及血管化的肿瘤。用本发明的CAR治疗的癌症类型包括但不限于:急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征等。

[0277] 通常地,如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防肿瘤等疾病。因此,本发明提供了治疗癌症的方法,其包括给予给需要其的对象治疗有效量的本发明的CAR-T细胞。

[0278] 本发明的CAR-T细胞可被单独给予或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分诸如IL-2、IL-17或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说,本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群,与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。

[0279] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度等因素确定,或可由临床试验确定。

[0280] 当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定,其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。包括本文描述的T细胞的药物组合物可以以 $10^4$ 至 $10^9$ 个细胞/kg体重的剂量,优选 $10^5$ 至 $10^7$ 个细胞/kg体重的剂量(包括范围内的所有整数值)

施用。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如Rosenberg等, NewEng. J. of Med. 319:1676, 1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可由医学领域技术人员通过监测患者的疾病迹象容易地确定,并以此调整治疗。

[0281] 对象组合物的给予可以以任何方便的方式进行,包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中,本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中,本发明的T细胞组合物优选通过静脉内注射施用。T细胞的组合物可被直接注入肿瘤,淋巴结或感染位置。

[0282] 在本发明的某些实施方式中,利用本文描述的方法或本领域已知的其他将T细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞,与任何数量的有关治疗形式结合(例如,之前、同时或之后)施用给患者,所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗:所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也已知为ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对PML患者的其他治疗。在进一步的实施方式中,本发明的T细胞可与以下结合使用:化疗、辐射、免疫抑制剂,诸如,环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506,抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中,本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺结合(例如,之前、同时或之后)而施用给患者。例如,在一个实施方式中,对象可经历高剂量化疗的标准治疗,之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中,在移植后,对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中,扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

[0283] 施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常,每次治疗或每个疗程,可将 $1 \times 10^5$ 个至 $1 \times 10^{10}$ 个本发明经修饰的T细胞,通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

[0284] 氨基酸及核苷酸序列

[0285] SEQ ID NO:1 (PA0135-MN-CAR氨基酸序列)

[0286] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPQVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCEVSGVIFSMLGMGWYRQAPGQEREL  
FAAVTSGGFTSYIESVRGRFTISRDNDRKRSVYLQMNVPEDTGVYYCNRDPVRSSDNWGQGTQVTVSSESKYGPCC  
PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKWLPIGCAAFV  
VVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0287] SEQ ID NO:2 (PA0135-MN-CAR核苷酸序列)

[0288] ATGCTGCTGCTGGTGACCTCTCTGCTGCTGCTGCGAACTGCCTCACCCAGCCTTTCTGCTGATCCCCAA  
GTGCAACTTGTGGAATCAGGAGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCACTTAACCTTTCATGCGAAGTGTCAGGAGT  
GATCTTCTCCATGCTTGAATGGGATGGTACAGACAAGCACCTGGACAAGAAAGAGAATTATTCGCCGCTGTGACAT  
CAGGAGGATTTACATCATAATCGAATCAGTGAGAGGAAGATTACAATCTCAAGAGATAACGATAAGCGCTCGGTG

TACCTTCAAATGAACAACGTGAAACCTGAAGATACAGGAGTGTACTACTGCAACAGAGATCCTGTGAGATCATCAGA  
TAACTGGGGGCAGGGAACACAAGTGACAGTGTTCATCAGAGAGCAAATACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCAGCCC  
CAGAATTTGAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCA  
GAAGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAAGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGA  
AGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCCAGAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC  
TGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAG  
ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATGACCAA  
GAACCAGGTGTCCCTGACTTGCTCGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATATTGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCC  
AGCCCAGAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGATAGCGACGGCTCTTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACA  
GTGGACAAAAGTGCCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCAAGTGCAGCGTGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC  
CCAGAAGAGCCTGTCTGTCTCTCGGCAAGTGGCTCCCTATCGGTTGCGCCGCTTTGTCGTCGTCTGTATCCTCG  
GCTGCATCCTCATCTGTTGGCTACCAAGAAGAAGTACAGCAGCAGCGTGCACGACCCCAACGGCGAGTACATGTTT  
ATGCGGGCCGTCAACACCGCCAAGAAGAGCAGACTGACCGACGTGACCCTGAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTA  
CATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAAGACGGCTGCTCTTGCAGATCCCCGAGG  
AAGAAGAGGGCGGTTGCGAGCTGCGCGTAAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAAC  
CAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGA  
AATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAG  
CCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACC  
GCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGGTGA

[0289] SEQ ID NO:3 (PA0135-EF-CAR氨基酸序列)

[0290] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPVQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMGWYRQAPGQEREL  
IAAITSGGFTSYVESVRGRFTISRDNKRSVYLMNMLKPEDTAVYYCNQDPVRSDDVWGQGTQVTVSGESKYGPPC  
PPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKWLPIGCAAFV  
VVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFRAVNTAKKSRLTDVTLKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0291] SEQ ID NO:4 (PA0135-GH-CAR氨基酸序列)

[0292] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPAVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSGTIFSMFGMGWYRQAPGHEREL  
IAAITSGHFTSYVESVRGRFTISRDNKRSVYLMNGVKPEDTAVYYCNRDPIQSSDVWGQGTQVTVSSESKYGPPC  
PPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKWLPIGCAAFV  
VVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFRAVNTAKKSRLTDVTLKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0293] SEQ ID NO:5 (PA0135-KL-CAR氨基酸序列)

[0294] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPVQQLVESGGGLVQPGGSLNLTCKVSGTIFSMFGMGWYRRAPGQEREL

FAAITSGGFDSYVESVRGRFII SRDNDKRSVYLQMNNLKPEDTAVYYCNQDP IRFSDVWGQGLVTVSSESKYGPPC  
PPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKWLPIGCAAFV  
VVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFRAVNTAKKSRLTDVTLKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0295] SEQ ID NO:6 (PA0135-PQ-CAR氨基酸序列)

[0296] MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLVESGGGLVLPGGSLNLSCEVSGTIFSM LGMGWYRRAPGQEREL  
FAAITSGGFTSYIESVKGRFTISRDNDRKRSVYLQMNVLKPEDTAVYYCNRDPLRSSDVWGQGTQITVSSSESKYGPPC  
PPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKWLPIGCAAFV  
VVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFRAVNTAKKSRLTDVTLKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0297] SEQ ID NO:7 (纳米抗体C-F15-10)

[0298] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGTIFSM LGMGWYRRAPGQERELVAAITSGHFTSYIESVKGRFTI  
SRDNAKRSVYLQMN SVKPEDTAVYYCNRDPVRS SDVWGQGTQVTVSG

[0299] SEQ ID NO:8 (纳米抗体C-F21-1)

[0300] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMWYRQAPGQERELIAAITSGGFTSYVESVRGRFTI  
SRDNAKRSVYLQMN NLKPEDTAVYYCNQDPVRS SDVWGQGTQVTVSG

[0301] SEQ ID NO:9 (纳米抗体C-A5-11)

[0302] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS GTIFSMFGMWYRQAPGHERELIAAITSGHFTSYVESVRGRFTI  
SRDNAKRSVYLQMN GVKPEDTAVYYCNRDPIQSS DVWGQGTQVTVSS

[0303] SEQ ID NO:10 (纳米抗体C-1-D3)

[0304] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMWYRQAPGQERELIAAITSGGFDSYVESVRGRFTI  
SRDNDKRSVYLQMN NLKPEDTAVYYCNADVIRRVGSEHRGPRTIWGQGLVTVSS

[0305] SEQ ID NO:11 (纳米抗体C-1-G3)

[0306] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMWYRQTPGQERELIAAITSGGFTSYVESVRGRFTI  
SRDNAKNTLYLQMN NIKPEDTAVYYCNGDRLARRGIWGPGLVTVSS

[0307] SEQ ID NO:12 (纳米抗体C-2-C2)

[0308] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMWYRQAPGQEREHIAAITSGGFTSYVESVRGRFTI  
SRDNAKRSVYLQMN NLKPEDTAVYYCIREN YNDRKDG GTQVTVSS

[0309] SEQ ID NO:13 (纳米抗体C-1-E6)

[0310] QVQLVESGGGLVLPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMWYRQAPGQERELIAAITSGGFTSYVESVRGRFTI  
SRDNAKNTVYLHMNDLKPEDTAVYYCAADLWGDG TKWDRANEYDYWGGGTQVTVSS

[0311] SEQ ID NO:14 (纳米抗体C-2-D8)

[0312] QVQLVESGGGLVQPGGSLNLTCKVSGTIFSM LGMGWYRRAPGQERELFAAITSGGFDSYVESVRGRFII

SRDNDKRSVYLQMNNLKPEDTAVYYCNQDPIRFSVDVWGQGLVTVSS

[0313] SEQ ID NO:15 (纳米抗体C-2-A5)

[0314] QVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCEVSGVIFSM LGMGWYRQAPGQERELFAAVTSGGFTSYIESVRGRFTI

SRDNDKRSVYLQMNNVKPEDTGVYYCNRDPVRSNDNWGQGTQVTVSS

[0315] SEQ ID NO:16 (纳米抗体C-2-A3)

[0316] QVQLVESGGGLVLPGGSLNLSCEVSGTIFSM LGMGWYRRAPGQERELFAAITSGGFTSYIESVKGRFTI

SRDNDKRSVYLQMNNVKPEDTAVYYCNRDPLRSSDVWGQGTQITVSS

[0317] SEQ ID NO:17 (纳米抗体C-2-C4)

[0318] QVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCEVSGTIFSM LGMGWYRRAPGQERELFAAITSGGFTSYIESVKGRFTI

SRDNAKRSVYLQMNNLKPEDTAVYYCNQDPVRSNDNWGQGTQVTVSS

[0319] SEQ ID NO:18 (纳米抗体C-F15-10的CDR1)

[0320] GTIFSM LG

[0321] SEQ ID NO:19 (纳米抗体C-F15-10、C-A5-11的CDR2)

[0322] ITSGHFT

[0323] SEQ ID NO:20 (纳米抗体C-F15-10的CDR3)

[0324] NRDPVRSNDV

[0325] SEQ ID NO:21 (纳米抗体C-F21-1、C-1-D3、C-1-G3、C-2-C2、C-1-E6的CDR1)

[0326] GMIFSMFG

[0327] SEQ ID NO:22 (纳米抗体C-F21-1、C-1-G3、C-2-C2、C-1-E6、C-2-A3、C-2-C4的  
CDR2)

[0328] ITSGGFT

[0329] SEQ ID NO:23 (纳米抗体C-F21-1的CDR3)

[0330] NQDPVRSNDV

[0331] SEQ ID NO:24 (纳米抗体C-A5-11的CDR1)

[0332] GTIFSMFG

[0333] SEQ ID NO:25 (纳米抗体C-A5-11的CDR3)

[0334] NRDPVRSNDV

[0335] SEQ ID NO:26 (纳米抗体C-1-D3、C-2-D8的CDR2)

[0336] ITSGGFD

[0337] SEQ ID NO:27 (纳米抗体C-1-D3的CDR3)

[0338] NADVIRRVGSEHRGPRTI

[0339] SEQ ID NO:28 (纳米抗体C-1-G3的CDR3)

[0340] NGDRLARRGI

[0341] SEQ ID NO:29 (纳米抗体C-2-C2的CDR3)

[0342] IRENYNDRK

[0343] SEQ ID NO:30 (纳米抗体C-1-E6的CDR3)

[0344] AADLWGDGTKWDRANEYDY

[0345] SEQ ID NO:31 (纳米抗体C-2-D8、C-2-A3、C-2-C4的CDR1)

[0346] GTIFSM LGMG

- [0347] SEQ ID NO:32 (纳米抗体C-2-D8的CDR3)  
[0348] NQDPIRFSVDV  
[0349] SEQ ID NO:33 (纳米抗体C-2-A5的CDR1)  
[0350] GVIFSMLGMG  
[0351] SEQ ID NO:34 (纳米抗体C-2-A5的CDR2)  
[0352] VTSGGFT  
[0353] SEQ ID NO:35 (纳米抗体C-2-A5的CDR3)  
[0354] NRDPVRSSDN  
[0355] SEQ ID NO:36 (纳米抗体C-2-A3的CDR3)  
[0356] NRDPLRSSDV  
[0357] SEQ ID NO:37 (纳米抗体C-2-C4的CDR3)  
[0358] NQDPVRSSDN  
[0359] SEQ ID NO:38 (纳米抗体C-F15-10的FR1)  
[0360] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS  
[0361] SEQ ID NO:39 (纳米抗体C-F15-10的FR2)  
[0362] MGWYRRAPGQERELVAA  
[0363] SEQ ID NO:40 (纳米抗体C-F15-10的FR3)  
[0364] SYIESVKGRFTISRDNKR SVY LQMNSVKPEDTAVYYC  
[0365] SEQ ID NO:41 (纳米抗体C-F15-10、C-F21-1的FR4)  
[0366] WGQGTQVTVSG  
[0367] SEQ ID NO:42 (纳米抗体C-F21-1、C-1-D3、C-1-G3、C-2-C2的FR1)  
[0368] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVS  
[0369] SEQ ID NO:43 (纳米抗体C-F21-1、C-1-D3、C-1-E6的FR2)  
[0370] MGWYRQAPGQERELIAA  
[0371] SEQ ID NO:44 (纳米抗体C-F21-1、C-2-C2的FR3)  
[0372] SYVESVRGRFTISRDNKR SVY LQMNLKPEDTAVYYC  
[0373] SEQ ID NO:45 (纳米抗体C-A5-11的FR1)  
[0374] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS  
[0375] SEQ ID NO:46 (纳米抗体C-A5-11的FR2)  
[0376] MGWYRQAPGHERELIAA  
[0377] SEQ ID NO:47 (纳米抗体C-A5-11的FR3)  
[0378] SYVESVRGRFTISRDNKR SVY LQMNGVKPEDTAVYYC  
[0379] SEQ ID NO:48 (纳米抗体C-A5-11、C-2-A5、C-2-C4的FR4)  
[0380] WGQGTQVTVSS  
[0381] SEQ ID NO:49 (纳米抗体C-1-D3的FR3)  
[0382] SYVESVRGRFTISRDNKR SVY LQMNLKPEDTAVYYC  
[0383] SEQ ID NO:50 (纳米抗体C-1-D3、C-2-D8的FR4)  
[0384] WGQGLTVTVSS  
[0385] SEQ ID NO:51 (纳米抗体C-1-G3的FR2)

- [0386] MGWYRQTPGQERELIAA
- [0387] SEQ ID NO:52 (纳米抗体C-1-G3的FR3)
- [0388] SYVESVRGRFTISRDNKNTLYLQMNNIKPEDTAVYYC
- [0389] SEQ ID NO:53 (纳米抗体C-1-G3的FR4)
- [0390] WPGTLVTVSS
- [0391] SEQ ID NO:54 (纳米抗体C-2-C2的FR2)
- [0392] MGWYRQAPGQEREHIAA
- [0393] SEQ ID NO:55 (纳米抗体C-2-C2的FR4)
- [0394] DGGTQVTVSS
- [0395] SEQ ID NO:56 (纳米抗体C-1-E6的FR1)
- [0396] QVQLVESGGGLVLRPGGSLRLSCKVS
- [0397] SEQ ID NO:57 (纳米抗体C-1-E6的FR3)
- [0398] SYVESVRGRFTISRDNKNTVYLHMNDLKPEDTAVYYC
- [0399] SEQ ID NO:58 (纳米抗体C-1-E6的FR4)
- [0400] WGGTQVTVSS
- [0401] SEQ ID NO:59 (纳米抗体C-2-D8的FR1)
- [0402] QVQLVESGGGLVQPGGSLNLTCKVS
- [0403] SEQ ID NO:60 (纳米抗体C-2-D8、C-2-A3、C-2-C4的FR2)
- [0404] WYRRAPGQERELFAA
- [0405] SEQ ID NO:61 (纳米抗体C-2-D8的FR3)
- [0406] SYVESVRGRFTISRDNKRSVYLQMNNLKPEDTAVYYC
- [0407] SEQ ID NO:62 (纳米抗体C-2-A5、C-2-C4的FR1)
- [0408] QVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCEVS
- [0409] SEQ ID NO:63 (纳米抗体C-2-A5的FR2)
- [0410] WYRQAPGQERELFAA
- [0411] SEQ ID NO:64 (纳米抗体C-2-A5的FR3)
- [0412] SYIESVRGRFTISRDNKRSVYLQMNNVKPEDTGVYYC
- [0413] SEQ ID NO:65 (纳米抗体C-2-A3的FR1)
- [0414] QVQLVESGGGLVLRPGGSLNLSCEVS
- [0415] SEQ ID NO:66 (纳米抗体C-2-A3的FR3)
- [0416] SYIESVKGRFTISRDNKRSVYLQMNNVKPEDTAVYYC
- [0417] SEQ ID NO:67 (纳米抗体C-2-A3的FR4)
- [0418] WQGTQITVSS
- [0419] SEQ ID NO:68 (纳米抗体C-2-C4的FR3)
- [0420] SYIESVKGRFTISRDNKRSVYLQMNNLKPEDTAVYYC
- [0421] 本发明的主要优点包括:
- [0422] 1. 本发明开发的FLT3纳米抗体具有高亲和力,在此基础上用不同FLT3纳米抗体序列构建的FLT3-CAR-T细胞,通过体外杀伤实验证明其对FLT3阳性AML肿瘤细胞株的特异性杀伤十分显著,还对AML肿瘤模型具有显著的体内抗肿瘤作用,治疗效果佳。

[0423] 2. 本发明通过不同克隆FLT3纳米抗体序列构建的CAR-T细胞与正常造血干细胞孵育后的克隆形成实验,证明了本发明构建的FLT3-CAR-T细胞对正常造血干细胞不具有特异性杀伤,不会造成血液毒性,证明安全性较好。

[0424] 3. 本发明通过对肿瘤细胞的重复杀伤实验成功筛选到对AML肿瘤细胞持续杀伤能力最强的FLT3-CAR-T细胞,由于FLT3-CAR-T细胞能够在体内复制,因此可长期持续控制肿瘤,对于易复发的AML是良好的应对策略。

[0425] 4. 本发明的FLT3-CAR-T细胞疗法在一定程度上能减轻患者痛苦并改善AML的预后。一方面本发明的治疗手段可通过多种方式如注射、喷雾法、吞咽、输液等进行,相比现有的化疗策略减轻了患者接受治疗时的痛苦,也降低了进行治疗所需的次数;另一方面,本发明的FLT3-CAR-T细胞疗法可长期控制肿瘤,减少复发的可能性,将疾病控制在较低程度的水平,改善预后。

[0426] 5. 本发明的FLT3-CAR-T细胞相比现有FLT3小分子抑制剂的应用范围更广,能适用于更广泛的患者人群。FLT3-CAR-T细胞不限于只对FLT3-ITD突变的AML病人有效,对FLT3未突变的AML患者也有效。

[0427] 6. 本发明的FLT3-CAR-T细胞相比现有FLT3小分子抑制剂的疗效更佳,FLT3容易在酪氨酸激酶结构域部分产生新的突变,这会导致对FLT3抑制剂产生耐药性,限制了FLT3抑制剂的疗效。而本发明的FLT3-CAR-T细胞受FLT3突变的影响小,即使FLT3发生突变,FLT3-CAR-T细胞依然保持其靶向性和结合活性,对疗效的限制小。

[0428] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

#### [0429] 实施例1抗原制备方案

[0430] 通过基因合成FLT3的胞外段(27AA-543AA)序列,在N端添加human IgG1 Fc标签,且FLT3和Fc之间添加肠激酶酶切位点,用于去除Fc标签;亚克隆至真核表达载体中,构建抗原FLT3-Fc蛋白表达载体。

[0431] 将构建好的FLT3-Fc蛋白表达载体进行质粒大抽,瞬时转染293细胞后,连续培养8天,离心收集培养基上清,用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤,滤液转至无菌离心管中,使用Protein A柱子纯化得到纯化的FLT3-Fc蛋白。

[0432] 所述经纯化得到的FLT3-Fc蛋白即为抗原,也称为免疫原、免疫抗原。

#### [0433] 实施例2抗原免疫羊驼方案

[0434] 采用上述实施例1中制备的FLT3-Fc蛋白免疫1只羊驼,采用皮下多点免疫共进行4次免疫,免疫方案流程如表3所示。

[0435] 表3

羊驼免疫方案	
[0436] 一免	免疫前采血 5 mL, 作为阴性血清; 佐剂与抗原(1 mg)以 1:1 混合, 乳化后、皮下多点注射
二免	抗原(2 mg)与佐剂 1:1 混合, 乳化后皮下多点注射
三免	抗原(2 mg)与佐剂 1:1 混合, 乳化后皮下多点注射, 三免后一周, 取血清进行效价检测 (检测方法见实施例 3)
冲击免疫	抗原(2 mg), 颈静脉注射
冲击免疫 3 天后采集 100 mL 外周血, 用于酵母展示库构建	

[0437] 经抗原的三次免疫后, 将羊驼免疫血清进行效价检测, 若三免后血清效价达到 1:8000 稀释条件下, OD 值大于 1.0 以上, 即可进行冲击免疫 (第四次免疫)。冲击免疫后得到的羊驼外周血用于分离免疫血清, 进行后续酵母展示库的构建。

#### [0438] 实施例 3 免疫效价的检测

[0439] 采集 5 mL 上述实施例 2 中制备的三免后外周血和/或冲击免疫后外周血, 将收集有血液样本的离心管置于 37°C 培养箱内放置 1 小时, 随后将血液样本转移至 4°C 过夜。将血清转移至一个新的无菌离心管中, 5000 rpm 离心 20 min, 之后采用 ELISA 检测免疫效价。

[0440] 将免疫的羊驼分离血清按照如表 4 所示的稀释梯度进行有限稀释, 与 FLT3 抗原预包被的 96 孔板进行 ELISA 实验, 使用阴性血清作为阴性对照, PBS 缓冲液作为空白对照, 检测结果如表 2 所示。

#### [0441] 表 4

血清	OD 值
1:1k	2.514
1:2k	2.659
1:4k	2.46
1:8k	2.204
1:16k	1.84
1:32k	1.372
1:64k	0.943
PBS	0.099

[0443] 根据 ELISA 检测结果, 经过三次免疫, 免疫效价较好, 1:8000 条件下 OD 值达到了 2.204, 远高于 1.0, 可以进行冲击免疫。

[0444] 进行一次冲击免疫, 3 天后采集 100 mL 外周血进行酵母展示库的构建。

#### [0445] 实施例 4 Biotin 偶联抗原蛋白

[0446] 准备 1 mg 的实施例 1 中制备的纯化抗原, 缓冲体系为 PBS, 浓度 1 mg/mL。称取 NHS-biotin, 使用 DMSO 溶解, 配制 10 mM 的 NHS-biotin。

[0447] 向上述抗原蛋白样品中加入新鲜制备的 10 mM 的 NHS-biotin 溶液, 将样品管装入避光自封袋中, 180 rpm 室温偶联 30 min。随后使用 PBS 进行置换, 去除未标记的 Biotin, 将标记好的抗原蛋白保存于 -80°C。使用 ELISA 方案检测 Biotin 偶联效果。

[0448] 实施例5PBMC分离及VHH抗体片段的获得

[0449] 1. 采集50mL实施例2中制备的冲击免疫后外周血,使用淋巴细胞分离液分选PBMC。

[0450] 2. 提取PBMC的RNA,随后使用PrimeScript™II 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录,制备其cDNA,具体步骤如下:

[0451] (1) 在200 $\mu$ L的PCR管中配制如表5所示的反应混合液MIX1:

[0452] 表5

试剂	用量
Oligo dT Primer(50 $\mu$ M)	8 $\mu$ L
dNTP Mixture(10 mM each)	8 $\mu$ L
总 RNA 样品	20 $\mu$ g

RNase-Free 水	Up to 80 $\mu$ L
--------------	------------------

[0455] (2) 65 $^{\circ}$ C 保温5min后,冰上迅速冷却。

[0456] (3) 在上述PCR管中配制如表6所示反应液:

[0457] 表6

试剂	用量
上述变性后的反应液	80 $\mu$ L
5 $\times$ PrimeScript II Buffer	32 $\mu$ L
RNase Inhibitor(40U/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L
PrimeScript II RTase(200U/ $\mu$ L)	8 $\mu$ L
RNase-Free水	36 $\mu$ L

[0459] (4) 吹打混匀后,分装80 $\mu$ L/管,置于PCR仪中42 $^{\circ}$ C 1小时,70 $^{\circ}$ C 热失活15分钟,最后将cDNA样品置于冰上或-20 $^{\circ}$ C 长期保存。

[0460] 3. VHH片段的扩增,具体步骤如下:

[0461] (1) 配置如表7所示的第一轮PCR反应体系(50 $\mu$ L/管):

[0462] 表7

成分	用量
上游引物(5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
下游引物(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
NuHi Power mix(2 $\times$ )	25 $\mu$ L
cDNA模板	2 $\mu$ L
无菌水	20 $\mu$ L

[0464] 配置好PCR反应体系后,按照如表8所示的程序设置PCR仪:

[0465] 表8

程序	温度	时间	循环数
预变性	95℃	10min	
[0466] 变性	95℃	15s	30×
退火	55℃	30s	
延伸	68℃	1min	
最后延伸	68℃	10min	

[0467] (2) PCR产物的琼脂糖电泳：

[0468] 使用1%的琼脂糖进行电泳分析PCR产物，分离分子量大小为750bp左右的片段。使用胶回收试剂盒回收PCR产物，并用NanoDrop测定浓度。

[0469] (3) 配置如表9所示的二轮PCR反应体系(50μL/管)：

[0470] 表9

成分	用量
2 <sup>nd</sup> F 引物	2 μL
2 <sup>nd</sup> R 引物	2 μL
[0472] NuHi Power mix(2×)	25 μL
一轮 PCR 回收产物	200 ng
无菌水	补足至 50 μL

[0473] 配置好PCR反应体系后，按照如表10所示的程序设置PCR仪：

[0474] 表10

程序	温度	时间	循环数
预变性	95℃	10min	
[0475] 变性	95℃	15s	25×
退火	55℃	30s	
延伸	68℃	1min	
最后延伸	68℃	10min	

[0476] (4) 二轮PCR产物的琼脂糖电泳分析：

[0477] 使用1%的琼脂糖进行电泳分析PCR产物，分离分子量大小为400bp左右的VHH片段。使用胶回收试剂盒回收VHH PCR产物，并用NanoDrop测定浓度。

[0478] 采集实施例2中制备的冲击免疫后的外周血，提供总的RNA，逆转录为cDNA后，使用单域抗体扩增引物进行两轮PCR，使用琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物。

[0479] 琼脂糖凝胶电泳结果如图1所示：第一轮PCR分别获得1000bp和750bp左右的PCR条带，胶回收750bp的片段作为二轮PCR的模板，第二轮PCR获得450bp的条带即为VHH片段。

[0480] 实施例6酵母展示库载体的构建及电转化

[0481] 1. 酵母展示载体的构建：

[0482] (1) 使用SfiI分别酶切pBlue载体和上述实施例5中获得的VHH PCR胶回收产物,50℃酶切过夜。

[0483] (2) 使用1%的琼脂糖凝胶分离pBlue载体片段,切取9000bp的载体片段进行胶回收。同时使用DNA片段回收试剂盒纯化PCR酶切产物,并用NanoDrop测定浓度。

[0484] (3) 酶切好的pBlue载体和VHH片段使用T4 ligase连接,16℃连接过夜。

[0485] 2. 酵母展示载体电转化获得大肠杆菌库:

[0486] (1) 准备电转杯、连接产物和电转感受态置于冰上预冷。

[0487] (2) 取预冷的建库连接产物加入到电转感受态中,置于冰上1min,向每个电转杯中加入70μL DNA/感受态混合物,将电转杯放于冰上。

[0488] (3) 按照2500V,5ms进行电转。

[0489] (4) 电击结束后,立刻加入平衡至室温的SOC培养基重悬菌体,37℃摇床培养1小时。

[0490] (5) 取20μL菌液进行库容QC以及多样性QC,其余菌液接种含Amp抗性的LB培养基中,180rpm 37℃选择培养过夜。

[0491] (6) 从上述过夜培养的菌液中,离心收集菌体沉淀,使用质粒大抽试剂盒进行质粒大抽。并用Nanodrop测定质粒浓度,计算获得的质粒总量。

[0492] 由上述步骤完成酵母展示载体的构建,并通过电转化获得大肠杆菌库质粒。

[0493] 实施例7电转化酵母感受态细胞获得酵母展示库

[0494] 1. 将实施例6中制备的大肠杆菌库质粒进行PmeI线性化,酶切体系如表11所示:

[0495] 表11

试剂	用量
质粒	12μg
10×buffer	5μL
PmeI	1μL
无菌水	Up to 50μL

[0497] 37℃酶切3h,取5μL进行1%琼脂糖电泳检测,剩余酶切产物沉淀浓缩后待用,共酶切3mg质粒。

[0498] 2. 制备酵母感受态细胞:

[0499] (1) 从酵母甘油菌挑取酵母菌体,在YPD琼脂平板上划线,将平板置于24℃-30℃的培养箱中连续培养3-5天,直至单克隆长出。

[0500] (2) 从平板上挑取酵母菌单克隆,并加入至YPD液体培养基中,置于24℃-30℃的摇床中250rpm培养1-2天。

[0501] (3) 使用1L的无菌锥形瓶,加入100mL YPD培养基,将上述准备的摇菌产物加入瓶中,置于24℃-30℃的摇床中250rpm培养1-2天。

[0502] (4) 取样检测OD<sub>600</sub>直至1.3-1.5(对数生长期)。

[0503] (5) 将菌液全部转移至离心管内,1500×g、4℃离心5分钟,去掉上清后,使用250mL冰上预冷的无菌水重悬菌体沉淀。

[0504] (6) 再进行一轮1500×g、4℃离心5分钟,去掉上清后,使用50mL冰上预冷的无菌水重悬菌体沉淀。

[0505] (7) 再进行一次 $1500 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 离心5分钟, 去掉上清后, 使用10mL冰上预冷的1M山梨糖醇重悬菌体沉淀。

[0506] (8) 再进行一次 $1500 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 离心5分钟, 去掉上清后, 使用500 $\mu\text{L}$ 冰上预冷的1M山梨糖醇重悬菌体沉淀。

[0507] (9) 最终获得500 $\mu\text{L}$ 酵母感受态细胞, 分装为80 $\mu\text{L}$ /管备用, 感受态细胞一般现做现用, 以确保电转效率更高。

[0508] 3. 电转酵母感受态细胞:

[0509] (1) 取80 $\mu\text{L}$ 酵母感受态细胞, 加入1 $\mu\text{g}$ 线性化质粒DNA, 充分混匀后, 加入至冰上预冷的电击杯中, 将电击杯置于冰上冰浴5分钟。

[0510] (2) 电转化条件为: 电压: 1500V, 时间: 5ms, 电击2次。

[0511] (3) 电击结束后, 立即加入1mL冰上预冷的YPDS培养基, 轻轻吹打混匀后, 将电击杯的液体全部转移到新的EP管中,  $30^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中静置培养2小时。

[0512] (4) 孵育结束后, 取50 $\mu\text{L}$ 电转化后产物, 分别均匀的涂布在YPD选择性平板上。将平板置于 $28^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中3天, 直至单克隆长出。

[0513] (5) 其余转化产物, 转移至液体的PAD培养基中,  $28^{\circ}\text{C}$ 震荡培养3天。

[0514] (6) 观察当白色菌体成为优势菌群后,  $1500 \times g$ , 离心5min收集菌体, 取一部分用于实施例8中酵母展示库的诱导表达。剩余加入50%无菌甘油, 保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0515] 由上述步骤完成酵母感受态细胞的电转, 并得到酵母展示库转化菌种。

[0516] 实施例8酵母展示库诱导表达以及分选

[0517] 1. 酵母展示库诱导表达:

[0518] (1) 将实施例7中获得的酵母展示库转化菌种使用PAD液体培养基培养。

[0519] (2) 将PAD液体培养基选择生长的酵母菌用无菌PBS清洗一次后, 重悬在BMMY培养基中, 添加氨苄和卡那霉素抗生素,  $28^{\circ}\text{C}$ , 220rpm诱导表达24-48h。

[0520] (3) 诱导前取1mL菌液, 加入YPD培养基, 添加氨苄和卡那霉素抗生素,  $28^{\circ}\text{C}$ , 220rpm震荡培养, 此样品为诱导前对照。

[0521] (4) 随机挑选20个酵母单克隆进行测序, 分析构建酵母展示库的多样性。

[0522] 根据如图2的测序结果比对显示, 酵母展示库具有多样性, 酵母展示库库容为 $6.74 \times 10^6$ 。

[0523] 2. 酵母展示库磁分选:

[0524] (1) 链霉亲和素磁珠预吸附:

[0525] ①取100D诱导酵母菌, 使用500 $\mu\text{L}$ 预冷的0.5%PBSA重悬。

[0526] ②取50 $\mu\text{L}$ 链霉亲和素磁珠, 充分吹打混合均匀后, 加入1mL PBSA, 置于磁力架上, 放置3-5min, 小心去除上清。

[0527] ③加入1mL PBSA, 重复洗涤一次磁珠。吸去上清, 将步骤①中的酵母菌加入, 混合均匀,  $4^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。

[0528] ④置于磁力架上, 放置3-5min, 小心吸出上清, 将酵母菌转移至一新的EP管中, 重复吸附一次; 小心吸出上清, 用于下一步实验。

[0529] (2) Biotin-Fc负分选:

[0530] ①取预吸附后的酵母菌,  $800 \times g$ 离心5min, 重悬在Biotin-Fc中,  $4^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。

[0531] ②将孵育结束的酵母中加入1mL的PBSA, 800×g离心5min, 弃去上清。重复洗涤2次, 最终重悬在500μL的PBS中。

[0532] ③取50μL链霉亲和素磁珠, 充分吹打混合均匀后, 加入1mL PBSA, 置于磁力架上, 放置3-5min, 小心去除上清。

[0533] ④加入1mL PBSA, 重复洗涤一次磁珠。吸去上清, 将孵育Biotin-Fc的酵母菌加入, 混合均匀, 4℃孵育1h。

[0534] ⑤置于磁力架上, 放置3-5min, 小心吸出上清, 将酵母菌转移至一新的EP管中, 重复吸附一次; 小心吸出上清, 800×g离心5min, 收集酵母菌用于下一步实验。

[0535] (3) Biotin-FLT3-Fc磁分选:

[0536] ①取Biotin-Fc负分选后的酵母菌, 800×g离心5min, 重悬在Biotin-FLT3-Fc中, 4℃孵育1h。

[0537] ②将孵育结束的酵母中加入1mL的PBSA, 800×g离心5min, 弃去上清。重复洗涤2次, 最终重悬在500μL的PBS中。

[0538] ③取100μL链霉亲和素磁珠, 充分吹打混合均匀后, 加入1mL PBSA, 置于磁力架上, 放置3-5min, 小心去除上清。

[0539] ④加入1mL PBSA, 重复洗涤一次磁珠。吸去上清, 将孵育Biotin-FLT3-Fc的酵母菌加入, 混合均匀, 4℃孵育1h。

[0540] ⑤孵育结束后, 置于磁力架上, 放置3-5min, 小心吸出上清;

[0541] ⑥加入1mL PBSA, 重复洗涤两次磁珠, 使用YPD培养基重悬酵母菌, 进行培养和诱导表达。分选的酵母细胞培养和诱导表达后进行流式分析, 孵育Biotin-FLT3-Fc, 二抗使用PE Streptavidin, 孵育完成后进行流式检测。

[0542] ⑦将第一轮磁分选产物, 分别与Biotin-FLT3-Fc蛋白充分结合, 使用链霉亲和素磁珠进行第二轮磁分选。将分选的酵母细胞一部分直接涂PAD平板, 用于挑选单克隆进行验证; 一部分培养进行流式分析。孵育Biotin-FLT3-Fc, 二抗使用PE Streptavidin, 孵育完成后进行流式检测。

[0543] 根据如图3所示的第一次分选后流式检测结果, Biotin-FLT3-Fc用于酵母阳性克隆的磁分选, 分选效果较好。将第一轮分选酵母细胞培养诱导表达后进行二轮分选。

[0544] 如图4所示, 第二次磁分选后, 酵母阳性率为91.721%, 阳性克隆显著富集, 将分选产物直接涂PAD平板, 挑选单克隆进行流式检测。

[0545] 3. 酵母单克隆的流式检测:

[0546] 重复两轮磁分选后, 一部分酵母进行培养, 诱导表达流式检测; 一部分直接涂PAD平板, 挑取单克隆培养, 接种至96孔板中, 诱导表达24h后, 与Biotin-FLT3-Fc孵育, 二抗使用PE-Streptavidin, 孵育完成后进行流式检测。

[0547] 流式分析结果如图5所示, 表明挑选的克隆均和Biotin-FLT3-Fc结合。

[0548] 实施例9 VHH真核表达载体的构建

[0549] 根据实施例8中酵母单克隆流式检测结果, 选择与目的抗原不同结合能力的克隆, 抽提基因组DNA, 使用pBlue载体的通用引物进行PCR, 将PCR产物进行测序, 获得VHH抗体序列。

[0550] 将分析获得的VHH抗体序列分别进行基因合成, 与human IgG1 Fc串联亚克隆至如

图6所示的表达载体Lenti-hIgG1-Fc2后,测序以对载体进行验证。

[0551] 载体经测序验证无误后,即得到抗体表达载体Lenti-hIgG1-Fc2,使用Qiagen质粒大抽试剂盒制备去内毒素质粒备用。

#### [0552] 实施例10重组抗体的表达

[0553] 1.从冰箱中取出LVTransm转染试剂及抗体表达载体Lenti-hIgG1-Fc2,室温解冻后,用移液枪上下吹打完全混匀。取出PBS缓冲液,温热至室温。取500 $\mu$ L PBS至24孔板的一个孔,加入4 $\mu$ g Lenti-hIgG1-Fc2,移液枪上下吹打充分混匀后,加入12 $\mu$ L LVTransm,立即用移液器上下吹打混匀,室温下静置10分钟。此处的混合物称为DNA/LVTransm复合物。

[0554] 2.将上述532 $\mu$ L DNA/LVTransm复合物加入到1.5mL 293F细胞中,轻轻晃动充分混匀。将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱,130rpm培养6-8小时后,加入1.5mL新鲜的FreeStyle<sup>TM</sup>293培养基,将细胞重新放回培养箱中继续培养。

[0555] 3.连续培养3天后,离心收集培养基上清,用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤,滤液转至无菌离心管中,进行后续的流程和ELISA检测。

[0556] 由此步骤得到经实施例9中抗体表达载体Lenti-hIgG1-Fc2所表达的重组抗体,也称单域抗体、本发明的单域抗体、FLT3纳米抗体。

#### [0557] 实施例11流式检测重组抗体与靶蛋白的结合

[0558] 1.从液氮中复苏CHO-K1和CHO-K1-FLT3细胞株,调整细胞状态至对数生长期。

[0559] 2.将两种细胞分别分为若干份,每份细胞的数量为5 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞。

[0560] 3.将表达的抗体分别孵育靶细胞,充分混匀后,室温孵育1小时。

[0561] 4.800 $\times$ g室温离心5分钟,去掉含有抗体的上清,使用PBS洗涤细胞3次。

[0562] 5.加入1 $\mu$ L PE标记的Anti-human IgG,充分混匀后,室温避光孵育30分钟。

[0563] 6.800 $\times$ g室温离心5分钟,去掉含有二抗的上清,使用PBS洗涤细胞3次。

[0564] 7.使用500 $\mu$ L PBS重悬细胞,进行流式分析。

[0565] 根据如图7所示的FACS检测结果,筛选抗体均可以结合CHO-K1-FLT3重组细胞,与CHO-K1不结合,说明实施例10中制备的重组抗体与靶蛋白的结合具有特异性。

[0566] 安排11个靶蛋白结合阳性抗体(SEQ ID NO:7-17)的表达纯化,同时对C-F21-1(SEQ ID NO:8)、C-A5-11(SEQ ID NO:9)和C-2-A5(SEQ ID NO:15)三个克隆的抗体进行亲和力检测。

#### [0567] 实施例12重组抗体的表达纯化

[0568] 1.从冰箱中取出LVTransm转染试剂及单链抗体表达载体,室温解冻后,用移液枪上下吹打完全混匀。取出PBS缓冲液,温热至室温。取2mL PBS至6孔板的一个孔,分别加入130 $\mu$ g Lenti-hIgG1-Fc2,移液枪上下吹打充分混匀后,加入400 $\mu$ L LVTransm,立即用移液器上下吹打混匀,室温下静置10分钟。

[0569] 2.将上述DNA/LVTransm复合物加入到50mL 293F细胞中,轻轻晃动充分混匀。将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱,130rpm培养6-8小时后,加入50mL新鲜的FreeStyle<sup>TM</sup>293培养基,将细胞重新放回培养箱中继续培养。

[0570] 3.连续培养7天后,离心收集培养基上清,用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤,滤液转至无菌离心管中,使用Protein A柱子纯化抗体。

[0571] 由此步骤将实施例11中获得的阳性重组抗体进行了表达纯化。

[0572] 实施例13亲和力检测

[0573] 将FLT3-Fc重组蛋白使用10mM Acetate缓冲液固定在CM5芯片上,分别以上述实施例11及12中制备的单域抗体作为流动相,检测候选单域抗体与靶蛋白FLT3的结合能力,亲和力检测结果如表12所示。

[0574] 表12

纳米抗体	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	KD(M)
C-F21-1	$4.752 \times 10^4$	0.001682	$3.539 \times 10^{-8}$
C-A5-11	$2.956 \times 10^5$	0.002313	$7.824 \times 10^{-9}$
C-2-A5	$1.411 \times 10^5$	0.001596	$1.131 \times 10^{-8}$

[0576] 检测结果显示,本发明的单域抗体与靶蛋白FLT3的亲和力(很好,说明单域抗体与靶蛋白FLT3具有良好的结合效果)。

[0577] 实施例14单域抗体序列

[0578] 采用酵母展示库筛选获得靶向FLT3的单域抗体,抗体序列信息如图8A-8K所示。其中,以图8A为例,FR序列(FR1-FR4)用下划线标出,CDR1用着重号(.)标出,CDR2用波浪线(波浪线)标出,CDR3用线段(线段)标出。图8B-8K用类似方式表示。

[0579] 实施例15 FLT3-CAR载体构建

[0580] 用上述开发的5个流式结果较好的FLT3纳米抗体序列(即C-F21-1,C-A5-11,C-2-D8,C-2-A5,C-2-A3)分别构建5个含有ICOS和41BB共刺激因子的三代CAR载体(即PA0135EF-CAR,PA0135GH-CAR,PA0135KL-CAR,PA0135MN-CAR,PA0135PQ-CAR),结构如图9所示。

[0581] 实施例16不同克隆FLT3纳米抗体序列构建的CAR慢病毒滴度比较

[0582] 利用悬浮293T慢病毒包装系统对5种FLT3-CAR进行慢病毒包装,检测各CAR病毒原液滴度值。

[0583] 如图10结果显示原液滴度值均在 $1 \times 10^7$ TU/mL以上,其中PA0135EF、PA0135GH、PA0135MN三个克隆的CAR慢病毒原液滴度较高。

[0584] 实施例17不同克隆FLT3纳米抗体序列构建的CAR-T细胞对FLT3阳性靶细胞毒性作用

[0585] 首先通过流式细胞术检测不同肿瘤细胞系表面抗原CD135(FLT3)的表达情况。

[0586] 结果如图11所示,Raji和MEG01不表达FLT3,AML3,MOLM-13,MV4-11三株AML细胞株(急性髓系白血病细胞株)高表达FLT3。

[0587] 选用FLT3阴性靶细胞Raji作为靶细胞进行靶细胞杀伤实验,比较本发明的CAR-T细胞与对照T细胞对阴性靶细胞毒性作用的差异。

[0588] 结果如图12所示,与对照T细胞相比,PA0135EF-CAR-T、PA0135GH-CAR-T、PA0135MN-CAR-T对抗原阴性的靶细胞无明显特异性杀伤,说明本发明的CAR-T细胞对阴性靶细胞的毒性非常小,安全性高。

[0589] 选取三株FLT3抗原阳性的细胞株(MV-4-11,MOLM-13,AML3)作为靶细胞进行靶细胞杀伤实验,比较PA0135EF-CAR-T、PA0135GH-CAR-T、PA0135MN-CAR-T对靶细胞的毒性作用差异。

[0590] 由图13数据可知,三种CAR-T细胞对FLT3阳性细胞株都具有显著的特异性杀伤,而且PA0135MN-CAR-T对FLT3阳性肿瘤细胞的细胞毒性要优于PA0135EF-CAR-T和PA0135GH-

CAR-T。

[0591] 收集上述杀伤实验的上清液,进一步检测了上清中细胞因子Granzyme-B的分泌情况。

[0592] 结果如图14所示,三种CAR-T细胞与靶细胞孵育后都有明显的特异性细胞因子的释放。同时,PA0135MN-CAR-T细胞具有更强的细胞因子释放能力。因此,结合PA0135EF-CAR-T、PA0135GH-CAR-T、PA0135MN-CAR-T对FLT3阳性肿瘤细胞的细胞毒性及细胞因子释放结果,三者中PA0135MN-CAR-T对阳性靶细胞具有更强的细胞毒性,杀伤效果更好。

[0593] 实施例18不同克隆FLT3纳米抗体序列构建的CAR-T细胞对FLT3阳性肿瘤细胞株的持续杀伤能力比较

[0594] 选取FLT3阳性肿瘤细胞株MV-4-11作为靶细胞,比较不同克隆的FLT3-CAR-T细胞对靶细胞的持续杀伤能力,效靶比为1:1和1:5,每隔24小时或48小时补加一次肿瘤细胞。

[0595] 由图15结果可知,与PA0135EF-CAR-T和PA0135GH-CAR-T相比,PA0135MN-CAR-T对MV-4-11肿瘤细胞具有更强及更持久的杀伤能力。

[0596] 实施例19不同克隆FLT3纳米抗体序列构建的CAR-T细胞对正常造血干细胞的细胞毒性

[0597] 首先通过流式细胞术检测了购买的商业化人造血干细胞(HSPC)表面FLT3和CD33的表达情况。

[0598] 如图16结果显示人造血干细胞表面高表达FLT3(阳性率是81.77%)和CD33(阳性率是74.47%)。

[0599] 随后检测了购买的人CD34+HSPC细胞分别与3种FLT3-CAR-T细胞(CD33-CAR-T细胞为对照组)孵育后细胞因子(Granzyme-B, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )的释放情况。

[0600] 结果如图17所示,CD33-CAR-T(PA033AC-CAR-T)与人CD34+造血干细胞孵育后有明显的特异性细胞因子的产生,说明CD33-CAR-T可以激活正常造血干细胞,对正常造血干细胞可能会产生细胞毒性,而3种FLT3-CAR-T与造血干细胞孵育后基本都没有特异性细胞因子的产生,说明FLT3-CAR-T细胞不会被正常造血干细胞激活,也就不会对正常造血干细胞产生特异性杀伤。尤其是PA0135MN克隆的FLT3-CAR-T细胞,细胞因子释放量最低。

[0601] 最后进一步将3种FLT3-CAR-T及CD33-CAR-T细胞分别与人造血干细胞孵育后,检测造血干细胞的克隆形成情况。

[0602] 结果如图18所示,与对照T细胞组相比,与CD33-CAR-T(PA033AC-CAR-T)孵育后的造血干细胞的克隆数量明显降低,说明CD33-CAR-T影响了造血干细胞正常克隆的形成,CD33-CAR-T细胞对正常造血干细胞产生了一定的细胞毒性;而3种FLT3-CAR-T细胞没有影响造血干细胞的克隆形成,说明FLT3-CAR-T细胞对正常造血干细胞没有显著的细胞毒性。

[0603] 实施例20 PA0135MN-CAR-T细胞对AML细胞株OCI-AML3的体内抗肿瘤作用

[0604] 如图19所示,选用荧光素酶标记的OCI-AML3细胞构建小鼠肿瘤建模,选择15只雌性NCG小鼠,每只尾静脉接种 $1 \times 10^6$ 个肿瘤细胞,在肿瘤细胞接种后第3天,进行尾静脉给药,给药剂量 $2 \times 10^7$ 的PA0135MN-CAR-T(TAA05-CAR-T)。每周监测不同给药组小鼠体内肿瘤细胞的生长情况。

[0605] 如图20所示,与对照组(PBS组和Mock T组)相比,PA0135MN-CAR-T(TAA05-CAR-T)细胞可以显著抑制小鼠体内OCI-AML3肿瘤细胞的增殖和生长。

[0606] 对小鼠的体重检测及生存期曲线如图21所示,结果也显示:与对照组相比,TAA05-CAR-T细胞对小鼠的体重不会产生明显的影响,TAA05-CAR-T细胞可以显著延长OCI-AML3荷瘤小鼠的生存期,具有显著的体内抗肿瘤作用。

[0607] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 序列表

<110> 博生吉医药科技(苏州)有限公司

<120> 一种新型靶向人FLT3的嵌合抗原受体修饰的T细胞的构建及应用

<130> P2021-2598

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 579

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合抗原受体PA0135-MN-CAR氨基酸序列

<400> 1

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1           5           10           15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
           20           25           30
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Asn Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly
           35           40           45
Val Ile Phe Ser Met Leu Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
           50           55           60
Gln Glu Arg Glu Leu Phe Ala Ala Val Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser
65           70           75           80
Tyr Ile Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp
           85           90           95
Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Pro Glu Asp Thr
           100          105          110
Gly Val Tyr Tyr Cys Asn Arg Asp Pro Val Arg Ser Ser Asp Asn Trp
           115          120          125
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
           130          135          140
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
145          150          155          160
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
           165          170          175
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
           180          185          190
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

```

195	200	205
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
210	215	220
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
225	230	235
240		245
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
245	250	255
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
260	265	270
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
275	280	285
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
290	295	300
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
305	310	315
320		325
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
325	330	335
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
340	345	350
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Trp		
355	360	365
Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys		
370	375	380
Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His		
385	390	395
400		405
Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys		
405	410	415
Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu		
420	425	430
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln		
435	440	445
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly		
450	455	460
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
465	470	475
480		485
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
485	490	495
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
500	505	510

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu  
 515 520 525  
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys  
 530 535 540  
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu  
 545 550 555 560  
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu  
 565 570 575

Pro Pro Arg

<210> 2

<211> 1740

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合抗原受体PA0135-MN-CAR核苷酸序列

<400> 2

```

atgctgctgc tggtagacctc tctgctgctc tgcgaactgc ctcaccacgc ctttctgctg 60
atccccaag tgcaacttgt ggaatcagga ggaggacttg tgcaacctgg aggatcactt 120
aacctttcat gcgaagtgtc aggagtgatc ttctccatgc ttggaatggg atggtacaga 180
caagcacctg gacaagaaag agaattattc gccgctgtga catcaggagg atttacatca 240
tacatcgaat cagttagagg aagatttaca atctcaagag ataacgataa gcgctcggtg 300
taccttcaaa tgaacaacgt gaaacctgaa gatacaggag tgtactactg caacagagat 360
cctgtgagat catcagataa ctgggggcag ggaacacaag tgacagtgtc atcagagagc 420
aaatacggcc ctcttgccc tccttgccc gcccagaat ttgaggagg acctagcgtg 480
ttcctgttcc ctccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc agaagtcacc 540
tgcgtggtgg tggacgtgtc tcaggaagac cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac 600
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagttcca gagcacctac 660
agagtgggtg ccgtgctgac cgtgctgcat caggattggc tgaacggcaa ggagtacaag 720
tgcaagggtg ccaacaaggg cctgcctagc agcatcgaga agaccatcag caaggccaag 780
ggccagccta gagagcctca ggtgtacaca ctgccccctt ctcaggagga gatgaccaag 840
aaccagggtg ccctgacttg cctcgtgaag ggcttctacc ccagcgatat tgccgtggag 900
tgggagtcta acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggatagc 960
gacggctctt tcttctgta cagccggctg acagtggaca aaagtcgctg gcaggagggc 1020
aacgtgttca gttgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagagc 1080
ctgtctctgt ctctcgcaa gtggetccct atcggttgcg ccgcctttgt cgtcgtctgt 1140
atcctcggtt gcatectcat ctgttggtc accaagaaga agtacagcag cagcgtgcac 1200
gacccaacg gcgagtacat gttcatgcgg gccgtcaaca ccgccaagaa gagcagactg 1260
accgacgtga ccctgaagag aggcaggaag aagctgctgt acatcttcaa gcagcccttc 1320
atgctggccag tgcagacaac ccaggaggaa gacggctgct cttgcagatt ccccgaggaa 1380

```

gaagagggcg gttgcgagct gcgcgtgaaa ttcagccgca gcgcagatgc tccagcctac 1440  
 aagcaggggc agaaccagct ctacaacgaa ctcaatcttg gtcggagaga ggagtacgac 1500  
 gtgctggaca agcggagagg acgggaccca gaaatgggcg ggaagccgcg cagaaagaat 1560  
 cccaagagg gcctgtacaa cgagctccaa aaggataaga tggcagaagc ctatagcgag 1620  
 attggtatga aaggggaacg cagaagaggc aaaggccacg acggactgta ccagggactc 1680  
 agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgct cttcacatgc aggcctgcc gcctcggtga 1740

<210> 3

<211> 579

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合抗原受体PA0135-EF-CAR氨基酸序列

<400> 3

Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro
1				5						10				15	
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
				20				25					30		
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly
				35				40					45		
Met	Ile	Phe	Ser	Met	Phe	Gly	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
				50			55					60			
Gln	Glu	Arg	Glu	Leu	Ile	Ala	Ala	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Thr	Ser
65					70					75				80	
Tyr	Val	Glu	Ser	Val	Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
					85					90				95	
Lys	Arg	Ser	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
					100					105				110	
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Gln	Asp	Pro	Val	Arg	Ser	Ser	Asp	Val	Trp
					115					120				125	
Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Gly	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
														130	
														135	
														140	
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
145					150					155				160	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
														165	
														170	
														175	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
														180	
														185	
														190	
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
														195	
														200	
														205	

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 210 215 220  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 225 230 235 240  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 245 250 255  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 260 265 270  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 275 280 285  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 290 295 300  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 325 330 335  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 340 345 350  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Trp  
 355 360 365  
 Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys  
 370 375 380  
 Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu  
 420 425 430  
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln  
 435 440 445  
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly  
 450 455 460  
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
 465 470 475 480  
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 485 490 495  
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
 500 505 510  
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu

515	520	525
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
530	535	540
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
545	550	555
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
565	570	575
Pro Pro Arg		
<210> 4		
<211> 579		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 嵌合抗原受体PA0135-GH-CAR氨基酸序列		
<400> 4		
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro		
1 5 10 15		
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly		
20 25 30		
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly		
35 40 45		
Thr Ile Phe Ser Met Phe Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly		
50 55 60		
His Glu Arg Glu Leu Ile Ala Ala Ile Thr Ser Gly His Phe Thr Ser		
65 70 75 80		
Tyr Val Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
85 90 95		
Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Gly Val Lys Pro Glu Asp Thr		
100 105 110		
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Arg Asp Pro Ile Gln Ser Ser Asp Val Trp		
115 120 125		
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
130 135 140		
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val		
145 150 155 160		
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
165 170 175		
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
180 185 190		

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 195 200 205  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 210 215 220  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 225 230 235 240  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 245 250 255  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 260 265 270  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 275 280 285  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 290 295 300  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 325 330 335  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 340 345 350  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Trp  
 355 360 365  
 Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys  
 370 375 380  
 Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu  
 420 425 430  
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln  
 435 440 445  
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly  
 450 455 460  
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
 465 470 475 480  
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 485 490 495  
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

	500		505		510
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu					
	515		520		525
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys					
	530		535		540
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu					
545		550		555	560
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu					
	565		570		575
Pro Pro Arg					
<210> 5					
<211> 579					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> 嵌合抗原受体PA0135-KL-CAR氨基酸序列					
<400> 5					
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro					
1	5		10		15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly					
	20		25		30
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Asn Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly					
	35		40		45
Thr Ile Phe Ser Met Leu Gly Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly					
	50		55		60
Gln Glu Arg Glu Leu Phe Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Asp Ser					
65		70		75	80
Tyr Val Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Asp					
	85		90		95
Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr					
	100		105		110
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Gln Asp Pro Ile Arg Phe Ser Asp Val Trp					
	115		120		125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro					
	130		135		140
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val					
145		150		155	160
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr					
	165		170		175

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 180 185 190  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 195 200 205  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 210 215 220  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 225 230 235 240  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 245 250 255  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 260 265 270  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 275 280 285  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 290 295 300  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 325 330 335  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 340 345 350  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Trp  
 355 360 365  
 Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys  
 370 375 380  
 Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu  
 420 425 430  
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln  
 435 440 445  
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly  
 450 455 460  
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
 465 470 475 480  
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

	485		490		495
Glu	Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met				
	500		505		510
Gly	Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu				
	515		520		525
Leu	Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys				
	530		535		540
Gly	Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu				
545		550		555	560
Ser	Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu				
	565		570		575
Pro	Pro Arg				
<210>	6				
<211>	579				
<212>	PRT				
<213>	人工序列(Artificial Sequence)				
<220>					
<223>	嵌合抗原受体PA0135-PQ-CAR氨基酸序列				
<400>	6				
Met	Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro				
1	5		10		15
Ala	Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly				
	20		25		30
Leu	Val Leu Pro Gly Gly Ser Leu Asn Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly				
	35		40		45
Thr	Ile Phe Ser Met Leu Gly Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly				
	50		55		60
Gln	Glu Arg Glu Leu Phe Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser				
65	70		75		80
Tyr	Ile Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp				
	85		90		95
Lys	Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Pro Glu Asp Thr				
	100		105		110
Ala	Val Tyr Tyr Cys Asn Arg Asp Pro Leu Arg Ser Ser Asp Val Trp				
	115		120		125
Gly	Gln Gly Thr Gln Ile Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro				
	130		135		140
Pro	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val				
145	150		155		160

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 165 170 175  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 180 185 190  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 195 200 205  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 210 215 220  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 225 230 235 240  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 245 250 255  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 260 265 270  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 275 280 285  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 290 295 300  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 325 330 335  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 340 345 350  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Trp  
 355 360 365  
 Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys  
 370 375 380  
 Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu  
 420 425 430  
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln  
 435 440 445  
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly  
 450 455 460  
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

465	470	475	480
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
	485	490	495
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met			
	500	505	510
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu			
	515	520	525
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys			
	530	535	540
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu			
545	550	555	560
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu			
	565	570	575
Pro Pro Arg			
<210> 7			
<211> 116			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-F15-10氨基酸序列			
<400> 7			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Thr Ile Phe Ser Met Leu			
	20	25	30
Gly Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Val			
	35	40	45
Ala Ala Ile Thr Ser Gly His Phe Thr Ser Tyr Ile Glu Ser Val Lys			
	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Val Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn			
	85	90	95
Arg Asp Pro Val Arg Ser Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Gly			
	115		
<210> 8			
<211> 116			

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-F21-1氨基酸序列

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Met Ile Phe Ser Met Phe  
                   20                   25                   30  
 Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Ile  
                   35                   40                   45  
 Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Val Glu Ser Val Arg  
                   50                   55                   60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
                   85                   90                   95  
 Gln Asp Pro Val Arg Ser Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
                   100                   105                   110  
 Thr Val Ser Gly  
                   115

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-A5-11氨基酸序列

<400> 9

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

	85	90	95
Arg Asp Pro Ile Gln Ser Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 10			
<211> 124			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-1-D3氨基酸序列			
<400> 10			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Met Ile Phe Ser Met Phe			
	20	25	30
Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Ile			
	35	40	45
Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Asp Ser Tyr Val Glu Ser Val Arg			
	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Arg Ser Val Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn			
	85	90	95
Ala Asp Val Ile Arg Arg Val Gly Ser Glu His Arg Gly Pro Arg Thr			
	100	105	110
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 11			
<211> 116			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-1-G3氨基酸序列			
<400> 11			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Met Ile Phe Ser Met Phe			
	20	25	30

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Ile  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Val Glu Ser Val Arg  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Asn Ile Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95  
 Gly Asp Arg Leu Ala Arg Arg Gly Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-2-C2氨基酸序列

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Met Ile Phe Ser Met Phe  
 20 25 30  
 Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu His Ile  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Val Glu Ser Val Arg  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ile  
 85 90 95  
 Arg Glu Asn Tyr Asn Asn Asp Arg Lys Asp Gly Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 13

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)



	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 15			
<211> 116			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-2-A5氨基酸序列			
<400> 15			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Asn Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Val Ile Phe Ser Met Leu			
	20	25	30
Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Phe			
	35	40	45
Ala Ala Val Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Ile Glu Ser Val Arg			
	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Arg Ser Val Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Asn Val Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Asn			
	85	90	95
Arg Asp Pro Val Arg Ser Ser Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 16			
<211> 116			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-2-A3氨基酸序列			
<400> 16			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Asn Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Thr Ile Phe Ser Met Leu			
	20	25	30
Gly Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Phe			
	35	40	45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Ile Glu Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Arg Ser Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Asn Val Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95  
 Arg Asp Pro Leu Arg Ser Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Ile  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-2-C4氨基酸序列

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Asn Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Thr Ile Phe Ser Met Leu  
 20 25 30  
 Gly Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Phe  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Ile Glu Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
 85 90 95  
 Gln Asp Pro Val Arg Ser Ser Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-F15-10的CDR1

<400> 18  
Gly Thr Ile Phe Ser Met Leu Gly  
1                   5

<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-F15-10、C-A5-11的CDR2

<400> 19  
Ile Thr Ser Gly His Phe Thr  
1                   5

<210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-F15-10的CDR3

<400> 20  
Asn Arg Asp Pro Val Arg Ser Ser Asp Val  
1                   5                   10

<210> 21  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-F21-1、C-1-D3、C-1-G3、C-2-C2、C-1-E6的CDR1

<400> 21  
Gly Met Ile Phe Ser Met Phe Gly  
1                   5

<210> 22  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-F21-1、C-1-G3、C-2-C2、C-1-E6、C-2-A3、C-2-C4的CDR2

<400> 22  
Ile Thr Ser Gly Gly Phe Thr  
1                   5

<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-F21-1的CDR3  
<400> 23  
Asn Gln Asp Pro Val Arg Ser Ser Asp Val  
1                   5                   10  
<210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-A5-11的CDR1  
<400> 24  
Gly Thr Ile Phe Ser Met Phe Gly  
1                   5  
<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-A5-11的CDR3  
<400> 25  
Asn Arg Asp Pro Ile Gln Ser Ser Asp Val  
1                   5                   10  
<210> 26  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-1-D3、C-2-D8的CDR2  
<400> 26  
Ile Thr Ser Gly Gly Phe Asp  
1                   5  
<210> 27  
<211> 18  
<212> PRT



<220>  
<223> 纳米抗体C-2-D8、C-2-A3、C-2-C4的CDR1  
<400> 31  
Gly Thr Ile Phe Ser Met Leu Gly Met Gly  
1                    5                    10  
<210> 32  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-2-D8的CDR3  
<400> 32  
Asn Gln Asp Pro Ile Arg Phe Ser Asp Val  
1                    5                    10  
<210> 33  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-2-A5的CDR1  
<400> 33  
Gly Val Ile Phe Ser Met Leu Gly Met Gly  
1                    5                    10  
<210> 34  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-2-A5的CDR2  
<400> 34  
Val Thr Ser Gly Gly Phe Thr  
1                    5  
<210> 35  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 纳米抗体C-2-A5的CDR3  
<400> 35





<220>

<223> 纳米抗体C-F21-1、C-1-D3、C-1-E6的FR2

<400> 43

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Ile Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ala

<210> 44

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-F21-1、C-2-C2的FR3

<400> 44

Ser Tyr Val Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp  
                   20                    25                    30  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   35

<210> 45

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-A5-11的FR1

<400> 45

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser  
                   20                    25

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-A5-11的FR2

<400> 46

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Arg Glu Leu Ile Ala  
 1                    5                    10                    15





<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-2-C2的FR2  
 <400> 54  
 Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu His Ile Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ala  
 <210> 55  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-2-C2的FR4  
 <400> 55  
 Asp Gly Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 56  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-1-E6的FR1  
 <400> 56  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser  
                   20                   25  
 <210> 57  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-1-E6的FR3  
 <400> 57  
 Ser Tyr Val Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu His Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp

	20	25	30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	35		
<210> 58			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-1-E6的FR4			
<400> 58			
Trp Gly Gly Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
1	5	10	
<210> 59			
<211> 25			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-2-D8的FR1			
<400> 59			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Asn Leu Thr Cys Lys Val Ser			
	20	25	
<210> 60			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-2-D8、C-2-A3、C-2-C4的FR2			
<400> 60			
Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Phe Ala Ala			
1	5	10	15
<210> 61			
<211> 38			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 纳米抗体C-2-D8的FR3			
<400> 61			

Ser Tyr Val Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp  
                   20                   25                   30  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   35

<210> 62

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-2-A5、C-2-C4的FR1

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Asn Leu Ser Cys Glu Val Ser  
                   20                   25

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-2-A5的FR2

<400> 63

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu Phe Ala Ala  
 1                   5                   10                   15

<210> 64

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 纳米抗体C-2-A5的FR3

<400> 64

Ser Tyr Ile Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Pro Glu Asp  
                   20                   25                   30  
 Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
                   35

<210> 65  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-2-A3的FR1  
 <400> 65  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Asn Leu Ser Cys Glu Val Ser  
                   20                   25  
  
 <210> 66  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-2-A3的FR3  
 <400> 66  
 Ser Tyr Ile Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Pro Glu Asp  
                   20                   25                   30  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   35  
  
 <210> 67  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-2-A3的FR4  
 <400> 67  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Ile Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
  
 <210> 68  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 纳米抗体C-2-C4的FR3

<400> 68

Ser Tyr Ile Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1                    5                    10                    15

Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp

20                    25                    30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

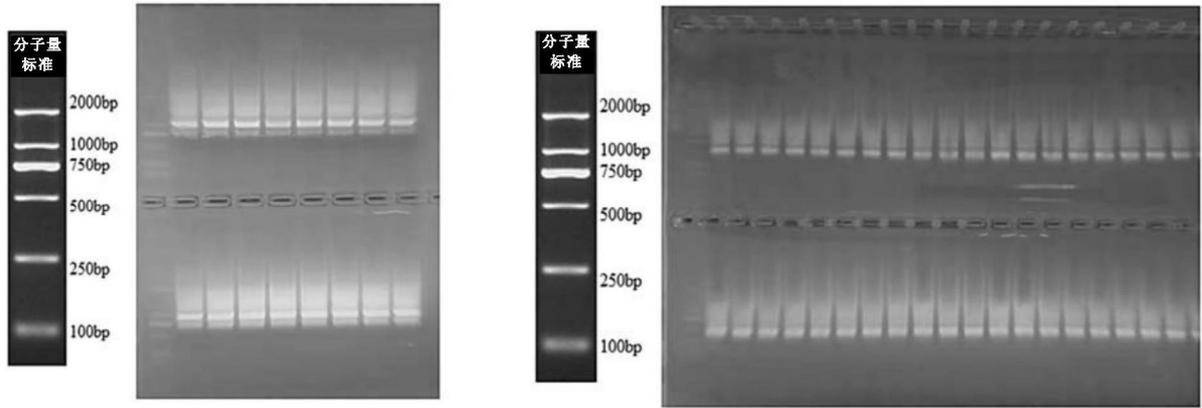


图1

```

.LLSCIASGA--VGAIIRMGWYRQVPGQRVLVASITSD-----VATYADSVQGRFIIISRDNAKNTVYVLQMNLSLKSEDTAVYYCN---KNPP-----AWFWGQGTQVTVS-
.LRLSCAPSLN--VENINDMAWYRQAPGKQRELVARITK-----SGVTNYADSVKGRFTIISRDNAKMNVYVLQMNLSLKPEDTAVYYCN-----LFTYWGQGTQVTVS-
.LSLSCAASGT--IESIGNMGWYRQAPGKQRELVASITKNFTIIVGDGYTNYQDSVKGRTIISTDFAKSEVYVLQMNLSLKPEDTAVYYCHN-----HLWETDYGSSHDIYWGQGTQVTVS-
.LRLSCAASGF--IESNVMMIIVRQAPGKGLWVSEING-----GGIITRYIDSVKGRFTIISRDNKNTIYVLQMNLSLKSGDTAVYYCAK-----GGNRYWYWGQGTQVTVS-
.LRLSCAASGFRLEDDYAIWFRQAPGKREGVSCISSGG-----YTNYAASVKGRFTIISRDNAAINTVYVLQANSLKPEDTAVYYCAAVGITPPQSSDYMCVPPHASFQMNGQGTQVTVS-
.LRLSCAASGF--REDNYAIWFRQAPGKREGVACISG-----EDGGRYADSVRGRFTIISRDNAKNTVYVLEMNLSLKPEDTAVYYCAARDITYLSG---TYVVPASALERNTYDYGQGTQVTVS-
.LRLSCAASGP--TENSVMGWFRQAPGKAHEFVAGITWN-----DHIISYGDVSVKGRFAISRDDAKEVYVLQMNLSLKSEDTAVYHCAAATVPLRTL--SR-----NRGYWPGTQVTVS-
.LRLSCAGSGR--IESRYMGMWFRQATGKEREVVALDWD-----GRTRYIDFVKGRFTIISRDRANLMLYQLMNSLKILEDTAVYYCAAEYG-----AFDVLRAYSEADFKFWGKGTQVTVS-
.LRLSCKSSGR--SESSYSLAWFRQAPGKEREVAGLDWN-----IRDARYADSVKGRFTIISRDNAAKTVYVLQMNLSKYEYDTAVYFCRAALFLRSTV--WTF-----SHDYHYWGQGTQVTVS-
.LRLSCKLSGR--SEGDYSLAWFRQAPGKEREVAGLDWN-----IRDARYADSVKGRFTIISRDNAAKTVYVLEMNLSLKQEDTAVYFCRAALFLRSTV--FTP-----SHDYHYWGQGTQVTVS-
.LRLSCTGSGR--AESASGMGWFRQVPGKEREVVAITN-----ITERYYSDSVKGRFTIISRDNASTVYVLQMNLSLKPEDTAVYYCAAKRSP-----GAGVSTWSRDDAYWGQGTQVTVS-
.LRLSCAASGN--INIIRSMGWYRQAPGKQRE--EVAGTITGN-----MVNYADSVKGRFTIISRDNASKNTVYVLEQMSLKPEDTAVYFCKATRFLAQT-----YWGQGTQVTVS-
.LRLSCVSGSD--RLIYAMGWFRQAPGRDREGVSCIT-----SSGSTNYADSVKGRFTISSGDNAAINTVYVLEMNLSLKPEDTAVYYCAALEILD-----YGLSCP--TASEYDYGQGTQVTVS-
.LRLSCAASGF--IERSYAMHWYRQVFGKDFEWVSRIN-----SDGSTIYPDSVKGRFTIISRDNAAKMLYVLQMNLSLKPEDTALYYCAR-----GPENSKRLGQGTQVTVS-
'QPLEAFVNEARAGSARLQGRSVSL-QLLAGMLPHTMQTF--RADSPSPETIPRRRCICK-TA-NLRTRPSTIVMQRFSCTTATM-----RRMTAGARGPRSE
.LRLSCTVSGF--NVDDYSMHWYRQAPGKEREVACIGR-----RGGSTNHADSVKGRFTIISRDKDMVYVLEMNLSLKPEDTAVYCAADLAAY-----GSTCVPAGPRGLEVRGQGTQVTVS-

```

图2

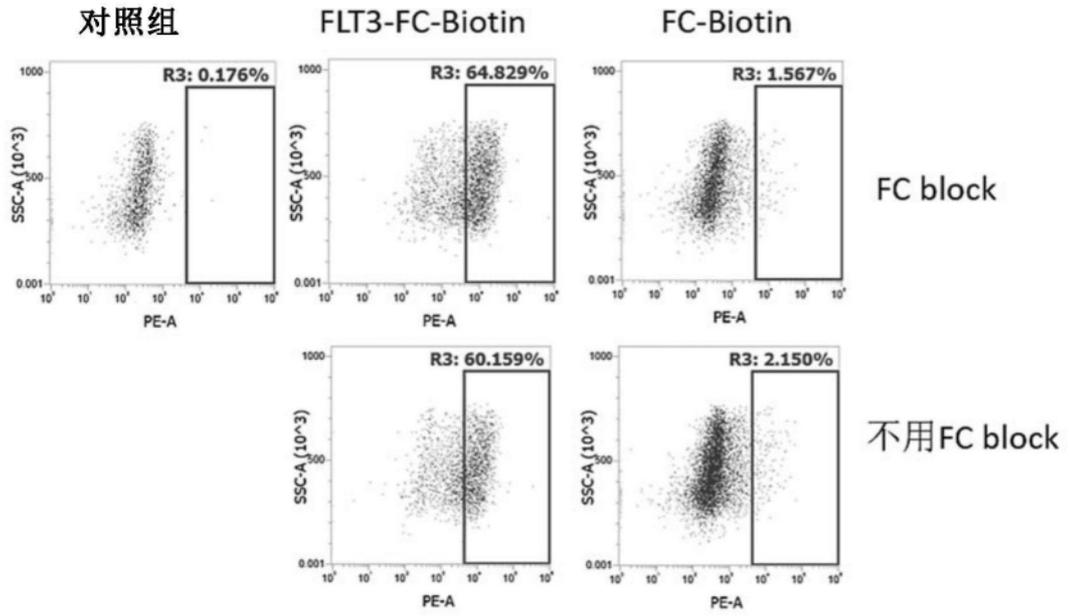


图3

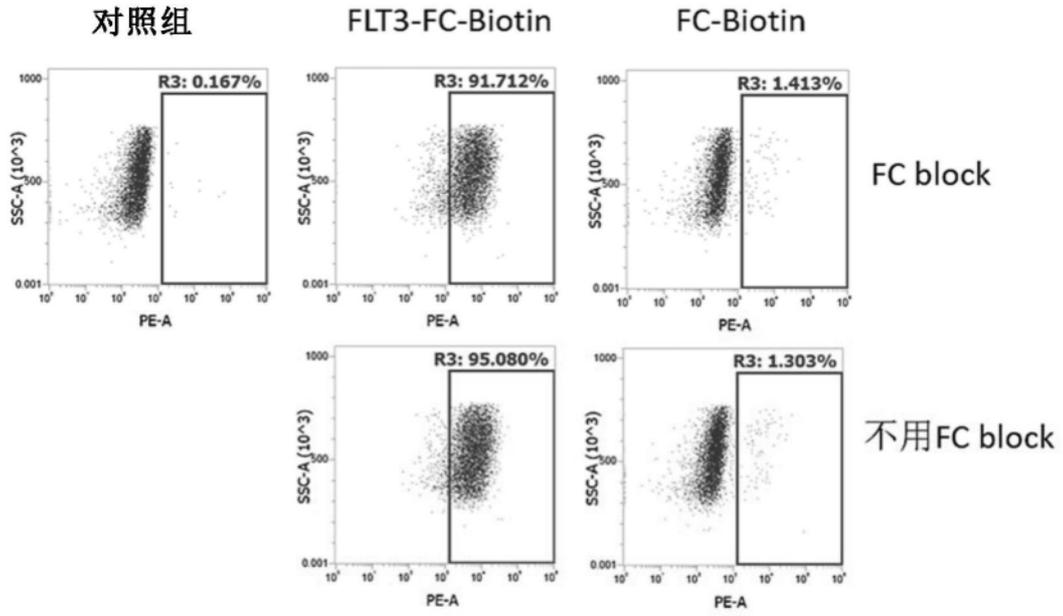


图4

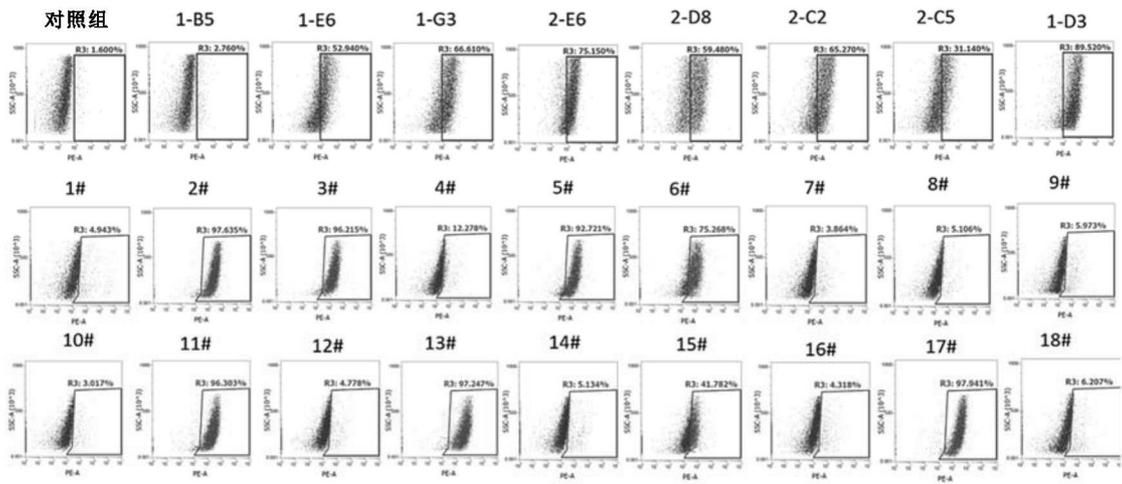


图5

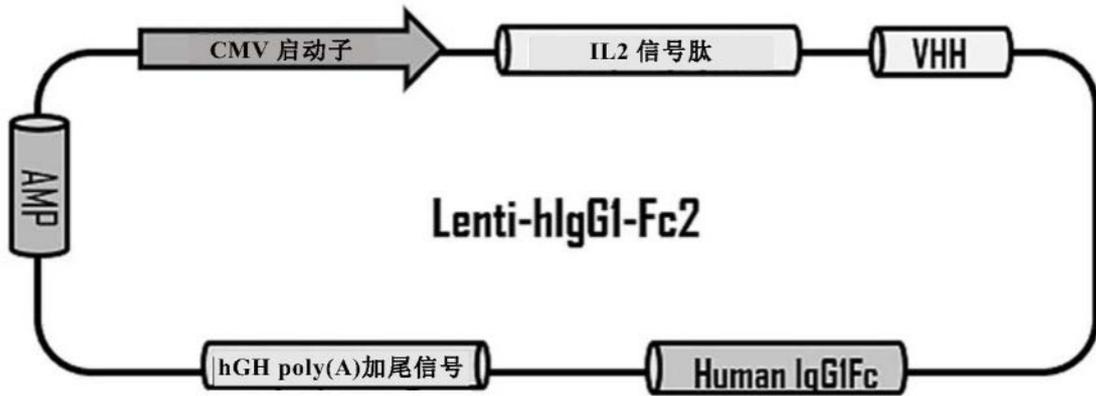


图6

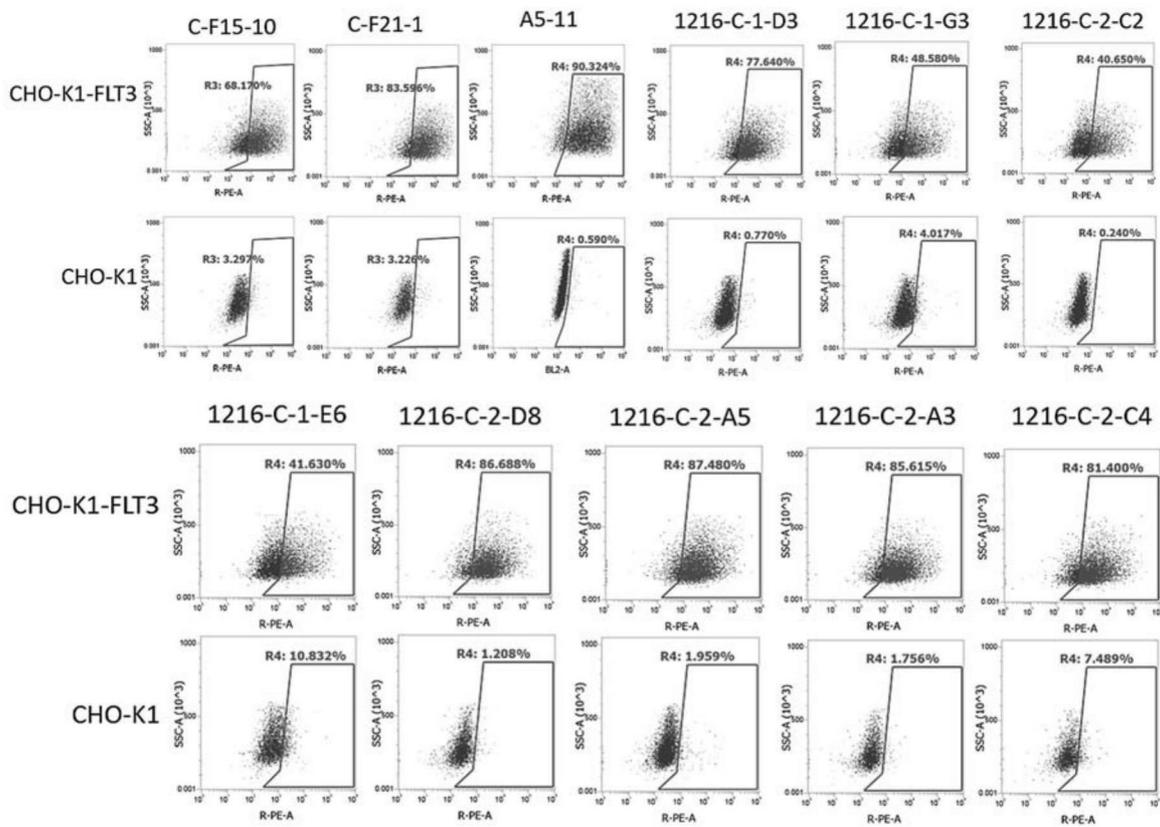


图7

> LAB1901216-C-F15-10

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGTIFSM<sub>1</sub>LM<sub>2</sub>GMGWYRRAPGQERELVAAITSGHF<sub>1</sub>TSYIE  
SVKGRFTISRDNAKRSVY<sub>1</sub>LQMNSVKPEDTAVYYCNRDPV<sub>1</sub>RSSDV<sub>1</sub>WGQGTQVTVSG

FR1-FR4

CDR<sub>1</sub>

CDR<sub>2</sub>

CDR<sub>3</sub>

图8A

> LAB1901216-C-F21-1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSM<sub>1</sub>FM<sub>2</sub>GMGWYRQAPGQERELIAAITSGGF<sub>1</sub>TSYV  
ESVRGRFTISRDNAKRSVY<sub>1</sub>LQMNNLKPEDTAVYYCNQDPV<sub>1</sub>RSSDV<sub>1</sub>WGQGTQVTVSG

FR1-FR4

CDR<sub>1</sub>

CDR<sub>2</sub>

CDR<sub>3</sub>

图8B

> LAB1901216-C-A5-11

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS<sub>1</sub>GTIFSM<sub>1</sub>FM<sub>2</sub>GMGWYRQAPGHERELIAAITSGHF<sub>1</sub>TSYVE  
SVRGRFTISRDNAKRSVY<sub>1</sub>LQMNGVKPEDTAVYYCNRDP<sub>1</sub>IQSSDV<sub>1</sub>WGQGTQVTVSS

FR1-FR4

CDR<sub>1</sub>

CDR<sub>2</sub>

CDR<sub>3</sub>

图8C

>LAB1901216-C-1-D3

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMGWYRQAPGQERELIAAITSGGFDSYV  
ESVRGRFTISRDNDRSVYLMNMLKPEDTAVYYCNADVIRRVGSEHRGPRTIWGQGLV  
TVSS

FR1-FR4

CDR1

CDR2

CDR3

图8D

>LAB1901216-C-1-G3

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMGWYRQTPGQERELIAAITSGGFDSYV  
ESVRGRFTISRDNKNTLYLQMNMLKPEDTAVYYCNGDRLARRGIWGPGLVTVSS

FR1-FR4

CDR1

CDR2

CDR3

图8E

>LAB1901216-C-2-C2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMGWYRQAPGQEREHIAAITSGGFDSYV  
ESVRGRFTISRDNKRSVYLMNMLKPEDTAVYYCIRENYNNDKDKGGTQVTVSS

FR1-FR4

CDR1

CDR2

CDR3

图8F

>LAB1901216-C-1-E6  
QVQLVESGGGLVLRPGGSLRLSCKVSGMIFSMFGMGWYRQAPGQERELIAAITSGGFTSYV  
ESVRGRFTISRDNKNTVYLHMNDLKPEDTAVYYCAADLWGDGTKWDRANEYDYWGG  
GTQVTVSS

FR1-FR4  
CDR1  
CDR2  
CDR3

图8G

>LAB1901216-C-2-D8  
QVQLVESGGGLVQPGGSLNLTCKVSGTIFSMGLGMGWYRRAPGQERELFAAITSGGFDSYV  
ESVRGRFIISRDNDRSVYLMNMLKPEDTAVYYCNQDPIRFSQDVWGQGLTVTVSS

FR1-FR4  
CDR1  
CDR2  
CDR3

图8H

>LAB1901216-C-2-A5  
QVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCEVSGVIFSMGLGMGWYRQAPGQERELFAAVTSGGFTSYI  
ESVRGRFTISRDNDRSVYLMNNVKPEDTGVYYCNRDPVRSNDNWGQGTQVTVSS

FR1-FR4  
CDR1  
CDR2  
CDR3

图8I

>LAB1901216-C-2-A3  
QVQLVESGGGLVLRPGGSLNLSCEVSGTIFSMGLGMGWYRRAPGQERELFAAITSGGFTSYIE  
SVKGRFTISRDNDRSVYLMNNVKPEDTAVYYCNRDPLRSSDVWGQGTQITVSS

FR1-FR4  
CDR1  
CDR2  
CDR3

图8J

>LAB1901216-C-2-C4

QVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCEVSGTIFSM<sup>1</sup>LG<sup>2</sup>MGWYRRAPGQERELFAAITSGGFTSYIE  
SVKGRFTISRDNAKRSVY<sup>3</sup>LQMNNLKPEDTAVYYC<sup>4</sup>NQDPVRS<sup>5</sup>SDN<sup>6</sup>WGOGTQVTVSS

FR1-FR4

CDR1

CDR2

CDR3

图8K

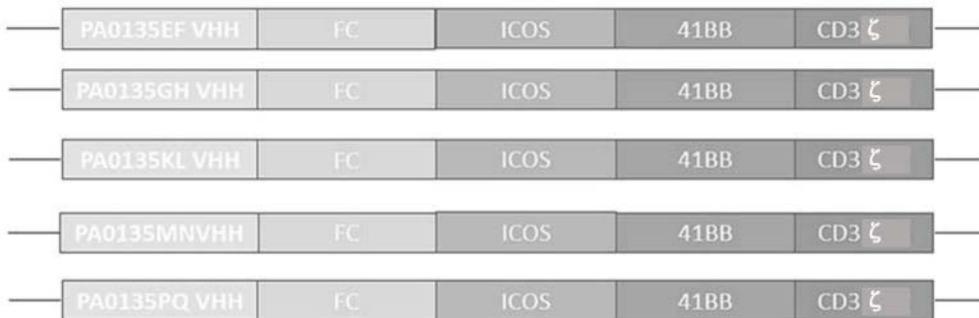


图9

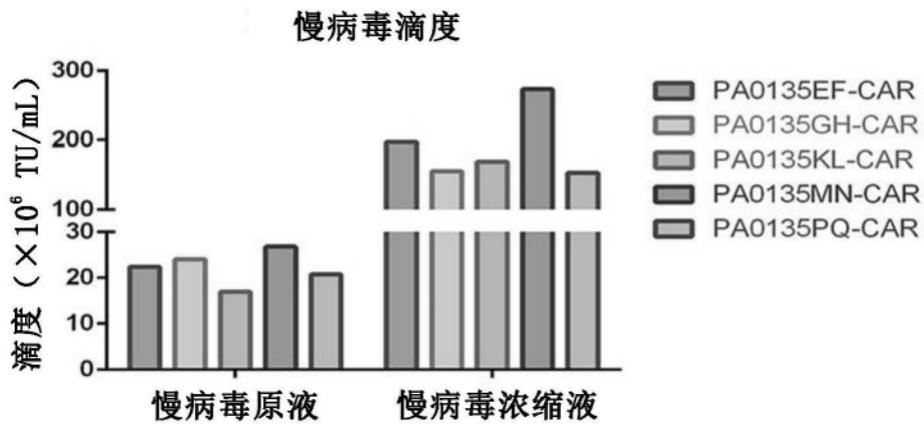


图10

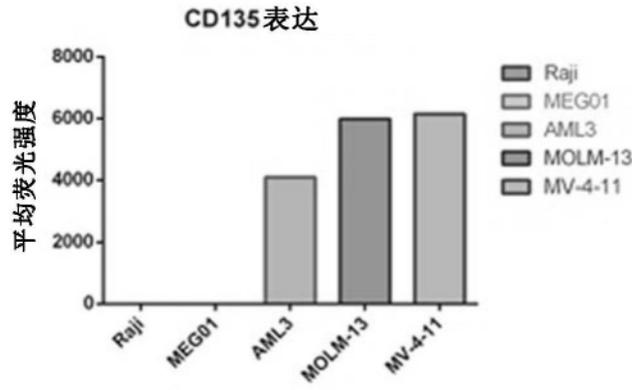


图11

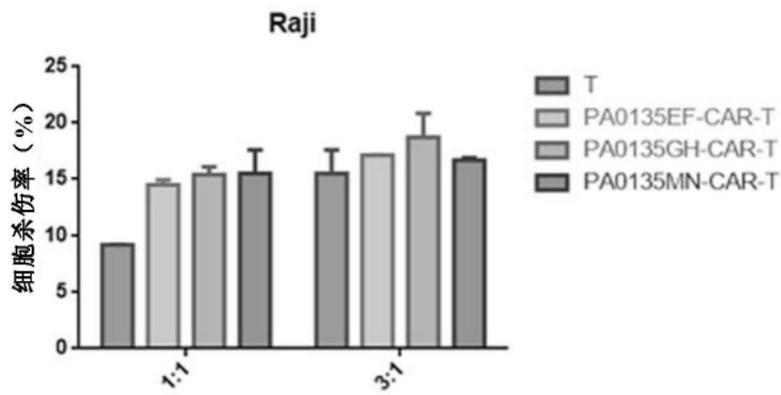


图12

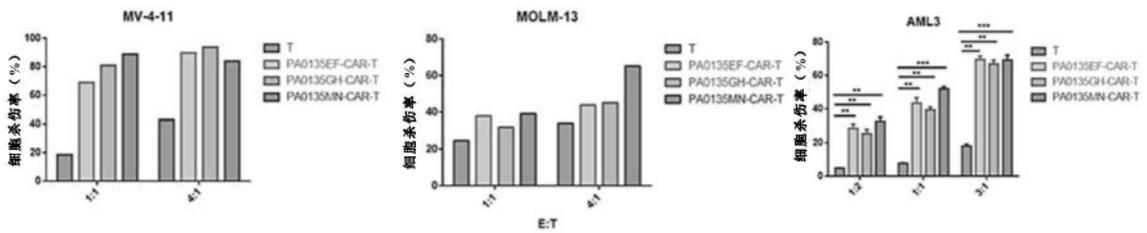


图13

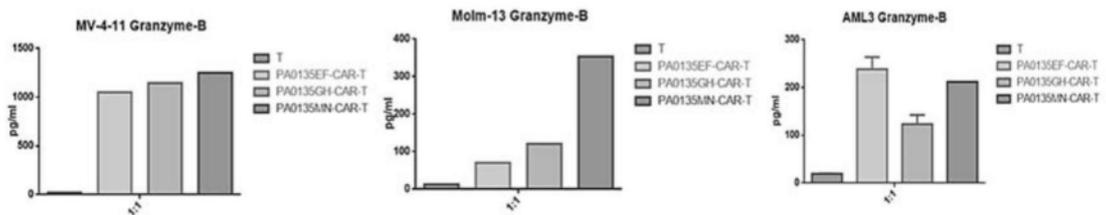


图14

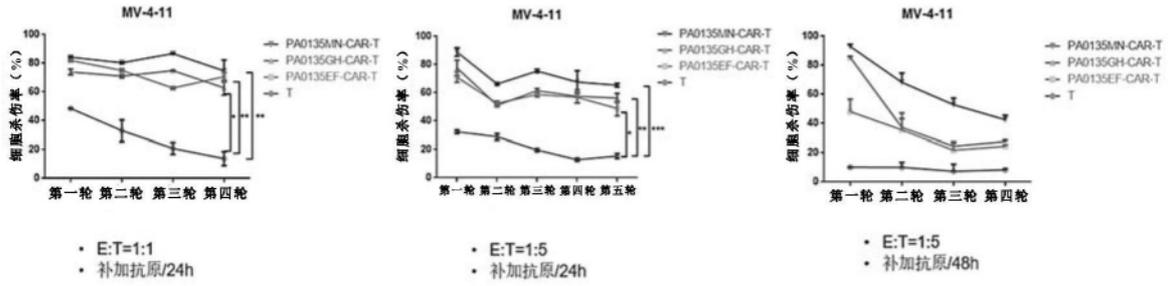


图15

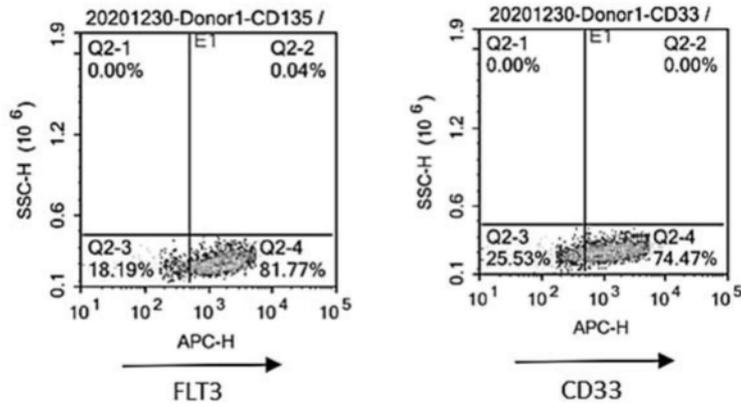


图16

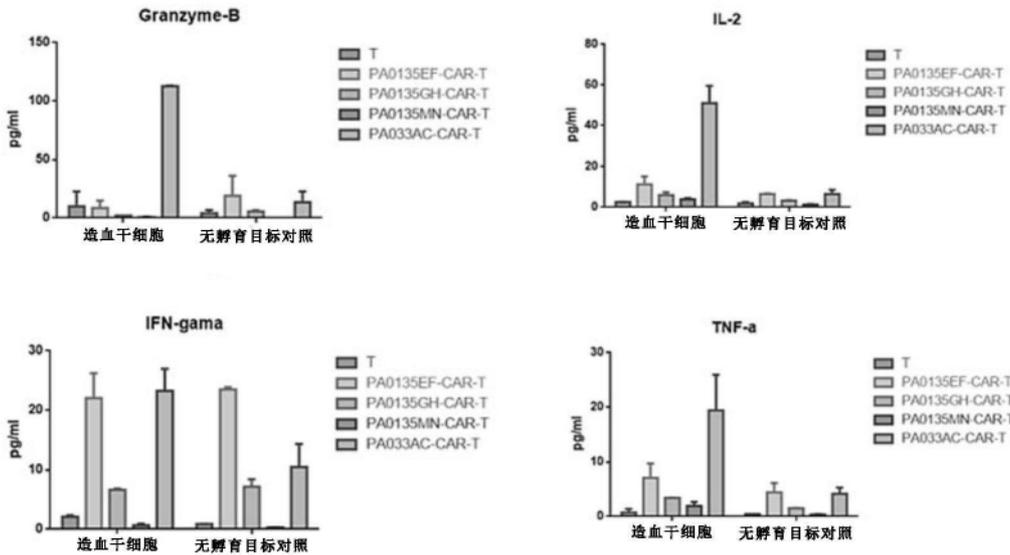


图17

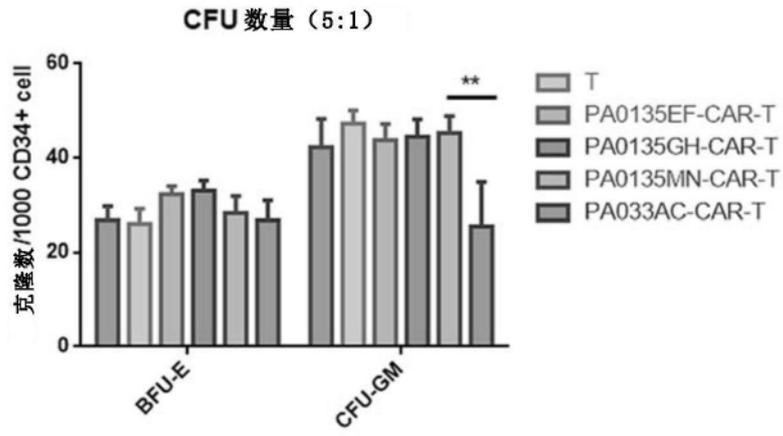


图18

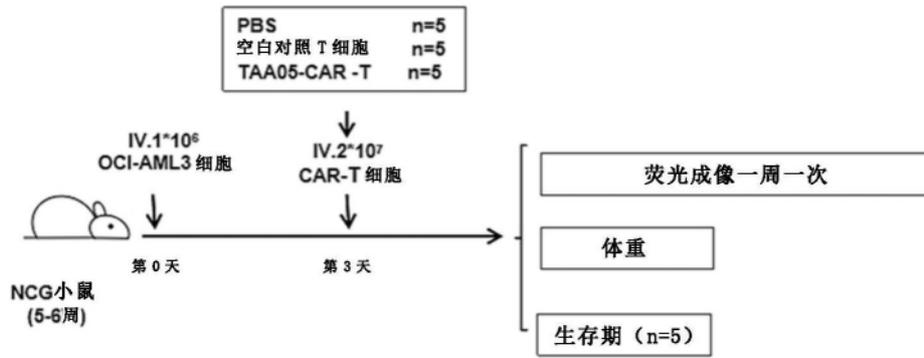


图19

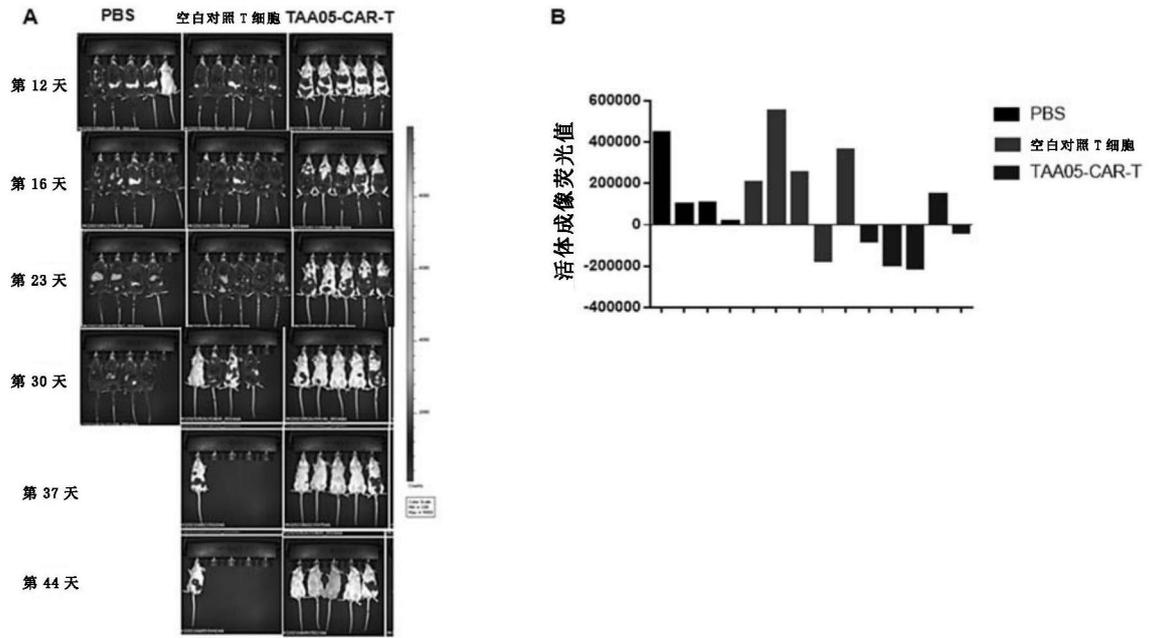


图20

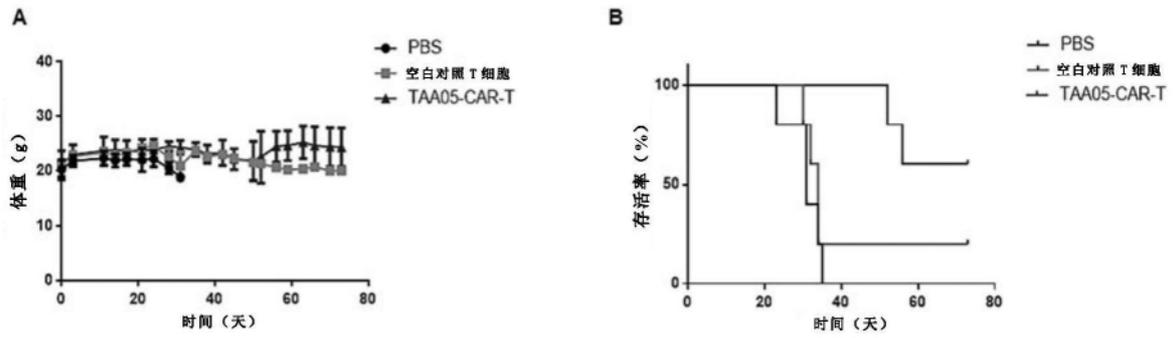


图21