

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 6 月 23 日 (23.06.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/127401 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/867* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/127505

(22) 国际申请日: 2021 年 10 月 29 日 (29.10.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202011498660.9 2020 年 12 月 16 日 (16.12.2020) CN

(71) 申请人: 北京艺妙神州医药科技有限公司(BEIJING IMMUNOCHINA PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区杏石口路 80 号益园文化创意产业基地 B 区 1 号楼 3 层 316 号, Beijing 100195 (CN)。 山东金赛生物科技有限公司(SHANDONG JINSAI CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省烟台市招远市金岭镇泽远路 1 号, Shandong 265400 (CN)。

(72) 发明人: 何霆(HE, Ting); 中国北京市海淀区杏石口路 80 号益园文化创意产业基地 B 区 1 号楼 3 层 316 号, Beijing 100195 (CN)。 齐菲菲(QI, Feifei); 中国山东省烟台市招远市金岭镇泽远路 1 号, Shandong 265400 (CN)。 鲁薪安(LU, Xin-An); 中国北京市海淀区杏石口路 80 号益园文化创意产业基地 B 区 1 号楼 3 层 316 号, Beijing 100195 (CN)。 丁艳萍(DING, Yanping); 中国北京市海淀区杏石口路 80 号益园文化创意产业基地 B 区 1 号楼 3 层 316 号, Beijing 100195 (CN)。 梁梦梦(LIANG, Mengmeng); 中国北京市海淀区

杏石口路 80 号益园文化创意产业基地 B 区 1 号楼 3 层 316 号, Beijing 100195 (CN)。

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路 30 号科大天工大厦 B 座 16 层 01 室, Beijing 100083 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR TARGETING CD123 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向 CD123 的嵌合抗原受体及其用途

(57) Abstract: Provided in the present invention is a single-chain antibody scFv that specifically binds to CD123, including an amino acid sequence selected from SEQ ID NOs: 56, 57, 58, 59, 60 and 61. Also provided is a chimeric antigen receptor targeting CD123, including an amino acid sequence selected from SEQ ID NOs: 65, 66, 67, 68, 69 and 70. Further provided are a nucleic acid molecule encoding the scFv or chimeric antigen receptor, a vector and cell containing the nucleic acid molecule, and the use of the antibody, chimeric antigen receptor, nucleic acid molecule, vector or cell in the preparation of a drug for treating tumors expressing CD123.

(57) 摘要: 本发明提供了特异性结合 CD123 的单链抗体 scFv, 其包含选自 SEQ ID NO: 56、57、58、59、60 和 61 的氨基酸序列。还提供了靶向 CD123 的嵌合抗原受体, 其包含选自 SEQ ID NO: 65、66、67、68、69 和 70 的氨基酸序列。还提供了编码所述 scFv 或嵌合抗原受体的核酸分子, 包含所述核酸分子的载体和细胞, 以及所述抗体、嵌合抗原受体、核酸分子、载体或细胞用于制备治疗表达 CD123 的肿瘤的药物的用途。

WO 2022/127401 A1

靶向 CD123 的嵌合抗原受体及其用途

技术领域

5 本发明涉及具有不同抗原识别域的靶向 CD123 的 scFv 序列，基于这些 scFv 序列设计的嵌合抗原受体 (CAR) 和 CAR-T 细胞，以及其用于治疗表达 CD123 的肿瘤、特别是急性髓系白血病的用途。

背景技术

10 急性髓系白血病(AML)是一种发病率不断上升的恶性肿瘤，主要影响中位年龄为 66 岁的老年人。美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute)估计, 2018 年的新病例将达到 19520 例, 而其中可能会有 10670 人死于这种疾病[1]。尽管 65-74 岁的患者在过去连续三十年中, 12 个月生存率从 20% 提高到 30%, 但目前 AML 的治疗效果仍不令人满意, 这些患者的 5 年生存率 <5%[2]。对于较年轻的 AML 患者, 主要的治疗方法是强化化疗, 对于复发风险较高的患者(治愈率 35-40%), 采用异基因造血细胞移植(AHCT), 而老年患者的预后仍然很差[2]。复发的 AML 患者获得第二次缓解的几率小于 50%, 而在第二次抢救性化疗后, 只有 16% 的患者能实现病情控制[3]。自 20 世纪 70 年代引入蒽环类和阿糖胞苷类联合化疗以来, 它一直是主要的治疗方法[4,5]。因此, 对于此疾病, 需要新的治疗策略。

嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞) 的概念首先提出于 20 世纪 80 年代后期, 其结合了抗体特异性和 T 细胞杀伤效应, 形成过继性免疫效应[6,7]。嵌合抗原受体 (CAR) 分子结构主要包括抗体单链可变片段 (scFv)、胞内信号域及连接 scFv 与胞内信号域的铰链区和跨膜区。近年来, 利用抗 CD19 和抗 CD20 嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)治疗淋巴样恶性肿瘤 (B 细胞急性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤) 取得了良好的效果[8]。目前, 针对 AML 治疗的 CAR-T 靶点, 有 CD123、CD33、CLL1、FLT3 等; 其中, 靶向 CD123 的 CAR-T 研究最多。

30 CD123 是 IL-3 受体 α 链 (IL-3Ra)。CD123 与 CD131 一起组成高亲和力的 IL-3 受体, 与 IL-3 结合后, 能够促进细胞增殖分化, 同时抑制造血细胞凋亡[9,10]。CD123 的高表达与信号转导及转录激活因子 5 (STAT5) 信号通路的活化相关。STAT5 激活通路参与在多种恶性血液病中[11]。CD123 主要在造血系统中表达, CD123 在正常 CD34⁺CD38⁻细胞中低表达或不表达[12]。此外, 正常情况下在髓系祖细胞、B 淋巴祖细胞中 CD123 有较高表达, 而红系祖细胞和多向分化潜能祖细胞中低

表达或不表达[13,14]。CD123 在 60%-90%以上的 AML 原始细胞中高表达[15-18]。Bras AE 等人[19]检测了 455 例 AML 患者，其中约 55%的患者 AML 细胞表达 CD123，且阳性率达 80%以上。

虽然，CAR-T 细胞在肿瘤细胞治疗中已取得了较好效果，但是 CAR-T 的疗效和安全性依然存在较大问题，主要有脱靶效应、细胞因子风暴、神经毒性等[20]。CAR-T 细胞的最佳疗效和安全性，取决于多方面因素，其中 CAR-T 细胞的有效活化具有重要作用。CAR-T 细胞的活化程度受 CAR 分子 scFv 的亲合力、铰链区长度、共刺激信号域、靶细胞表面抗原密度等多种因素影响。CAR 分子的 scFv 作为与靶细胞表面抗原直接结合的区域，其亲合力对整体 CAR-T 细胞的活化意义重大。CAR 分子 scFv 亲合力较低时，CAR-T 细胞不能得到足够的抗原识别，从而无法达到最佳激活状态；CAR 分子 scFv 亲合力较高时，CAR-T 细胞可能会在识别肿瘤细胞的同时也能够识别抗原密度相对较低的正常细胞，产生严重脱靶效应。

因此，为了进一步提高 CAR-T 细胞的安全性和有效性，保证 CAR-T 细胞的有效活化，避免脱靶效应，仍需要筛选针对靶点具有适中亲和力的 scFv。

发明内容

第一方面，本发明提供了一种特异性结合 CD123 的抗体，其包括重链可变结构域 VH 和轻链可变结构域 VL，所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:1 (GYX₁X₂X₃X₄(D)YX₅X₆X₇) 的 VH-CDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO:2 (X₈X₉X₁₀(X₁₁)X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈NX₁₉X₂₀X₂₁KX₂₂X₂₃X₂₄) 的 VH-CDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO:3

(AX₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁(YD)X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀) 的 VH-CDR3 氨基酸序列；其中 X₁ 选自 S、T；X₂ 选自 F、I；X₃ 选自 T、S、M；X₄ 选自 S、D、T、G；X₅ 选自 W、Y、V、A、N；X₆ 选自 M、V、I、W；X₇ 选自 N、H；X₈ 选自 Y、R；X₉ 选自 I、C；X₁₀ 选自 D、N、Y、S；X₁₁ 选自 P、C；X₁₂ 选自 Y、G；X₁₃ 选自 D、N、S；X₁₄ 选自 S、N、D、G；X₁₅ 选自 E、A、G、S；X₁₆ 选自 T、I、S；X₁₇ 选自 H、S、N；X₁₈ 选自 Y、S；X₁₉ 选自 Q、E、P；X₂₀ 选自 K、N、S；X₂₁ 选自 F、L；X₂₂ 选自 D、G、S；X₂₃ 选自 K、R；X₂₄ 选自 A、I；X₂₅ 选自 R、G；X₂₆ 选自 G、S、E；X₂₇ 选自 E、P、R；X₂₈ 选自 G、S；X₂₉ 选自 N、Y、L、W；X₃₀ 选自 W、Y、L；X₃₁ 选自 G、D；X₃₂ 选自 R、E；X₃₃ 选自 Y、S、T；X₃₄ 选自 D、Y、G；X₃₅ 选自 G、Y；X₃₆ 选自 Y、L；X₃₇ 选自 A、

G、P；X₃₈选自M、L；X₃₉选自D、A；X₄₀选自Y、C；所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:4

(X₄₁SX₄₂X₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉(QK)X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃W)的VL-CDR1氨基酸序列，SEQ ID NO:5 (X₅₄SX₅₅X₅₆X₅₇X₅₈X₅₉)的VL-CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:6 (X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄(P)X₆₅TF)的VL-CDR3氨基酸序列；其中X₄₁选自A、S；X₄₂选自Q、K、S；X₄₃选自S、D；X₄₄选自I、V、L；X₄₅选自S、N、D、L；X₄₆选自K、Y、S、D、N；X₄₇选自D、S；X₄₈选自G、S；X₄₉选自D、N；X₅₀选自S、N；X₅₁选自D、Y；X₅₂选自L、I、M；X₅₃选自A、N、H；X₅₄选自G、T、A；X₅₅选自T、N、Q；X₅₆选自L、S、R；X₅₇选自Q、E、A、I、D；X₅₈选自S、P；X₅₉选自G、E；X₆₀选自Q、N；X₆₁选自H、Y、S、F、G；X₆₂选自N、D、H、Y；X₆₃选自K、L、E、R、S；X₆₄选自Y、L、D、S、F、T；X₆₅选自Y、R、W；优选地，所述抗体是scFv。

第二方面，本发明提供了一种靶向CD123的嵌合抗原受体，其包含：第一方面所述的抗体；铰链区；跨膜结构域；共刺激结构域；和CD3ζ胞内信号转导结构域。

第三方面，本发明提供了一种核酸分子，其包含编码第一方面的抗体或第二方面的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

第四方面，本发明提供了一种载体，其包含第三方面的核酸分子。

第五方面，本发明提供了一种细胞，其经第四方面的载体转染，从而包含第三方面的核酸分子或第四方面的载体。

第六方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含第一方面的抗体、第二方面的嵌合抗原受体、第三方面的核酸分子、第四方面的载体或第五方面的细胞，以及可药用载体。

第七方面，本发明提供了第一方面的抗体、第二方面的嵌合抗原受体、第三方面的核酸分子、第四方面的载体或第五方面的细胞用于制备治疗表达CD123的肿瘤的药物的用途。

本发明通过对靶点CD123的CAR分子的scFv进行亲和力筛选以及CAR-T细胞杀伤效应比较，以获得靶点CD123的最佳scFv序列，使得CAR-T细胞具有更优的安全性和有效性。与现有技术相比，本发明能有效提高靶向CD123的CAR-T细胞对肿瘤细胞系及原代肿瘤细胞的杀伤效率，提高细胞增殖能力。

附图说明

图1表示不同scFv的CD123 CAR分子在T细胞中的转导效率。

图 2 表示 CD123 CAR-T 在培养过程中的总细胞增殖情况。

图 3 表示靶细胞 AML 原代细胞和 THP-1 细胞分别刺激下,对 CD123 CAR-T 细胞分化的影响。

图 4 表示 CD123 CAR-T 对 CD123 阳性细胞系 (THP-1) 及 CD123 阴性细胞系 (K562) 的杀伤效率。

图 5 表示 CD123 CAR-T 对 AML 原代细胞的杀伤效率。

图 6 表示 CD123 CAR-T 在 AML 原代细胞刺激 5 小时后的细胞因子表达。

10 具体实施方式

本发明提供了一种特异性结合 CD123 的抗体,其包括重链可变结构域 VH 和轻链可变结构域 VL,所述重链可变结构域包含 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3,所述轻链可变结构域包含 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3。

在一个具体实施方案中,所述 VH-CDR1 选自由 SEQ ID NO: 8、9、10、11、12 组成的组中的氨基酸序列;所述 VH-CDR2 选自由 SEQ ID NO: 14、15、16、17、18 组成的组中的氨基酸序列;所述 VH-CDR3 选自由 SEQ ID NO: 20、21、22、23、24 组成的组中的氨基酸序列;所述 VL-CDR1 选自由 SEQ ID NO: 26、27、28、29、30 组成的组中的氨基酸序列;所述 VL-CDR2 选自由 SEQ ID NO: 32、33、34、35、36 组成的组中的氨基酸序列;所述 VL-CDR3 选自由 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42 组成的组中的氨基酸序列。

特别地,本发明的特异性结合 CD123 的抗体包括:

1) 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:14 所示的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:20 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域;和包含如 SEQ ID NO:26 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:32 所示的 VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:38 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域;和/或

2) 包含如 SEQ ID NO:9 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:15 所示的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:21 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域;和包含如 SEQ ID NO:27 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:33 所示的 VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:39 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域;和/或

3) 包含如 SEQ ID NO:10 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:16 所示的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:22 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域;

和包含如 SEQ ID NO:28 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:34 所示的 VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:40 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域；和/或

4) 包含如 SEQ ID NO:11 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:17 所示的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:23 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域；和包含如 SEQ ID NO:29 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:35 所示的 VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:41 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域；和/或

5) 包含如 SEQ ID NO:12 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:18 所示的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:24 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域；和包含如 SEQ ID NO:30 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:36 所示的 VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:42 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域。

在另一个具体实施方案中，本发明的抗体中的所述重链可变结构域包含选自由 SEQ ID NO:44、45、46、47 和 48 组成的组中的氨基酸序列，或包含与其具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的氨基酸序列；和/或所述轻链可变结构域包含选自由 SEQ ID NO:50、51、52、53 和 54 组成的组中的氨基酸序列，或包含与其具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的氨基酸序列。

特别地，本发明提供了一种特异性结合 CD123 的抗体，其包含：

1) 如 SEQ ID NO:44 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变结构域；和/或

2) 如 SEQ ID NO:45 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变结构域；和/或

3) 如 SEQ ID NO:46 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变结构域；和/或

4) 如 SEQ ID NO:47 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变结构域；和/或

5) 如 SEQ ID NO:48 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:54 所示的轻链可变结构域；

在另一个具体实施方案中，本发明提供了一种特异性结合 CD123 的抗体，其包含：选自由 SEQ ID NO: 56、57、58、59、60 和 61 组成的组中的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的氨基酸序列。

优选地，本发明所述抗体为单链抗体 scFv；更优选地，所述单链抗体 scFv 的重链可变结构域和轻链可变结构域由富含甘氨酸和丝氨酸的

接头肽链相连，并且重链可变结构域和轻链可变结构域的顺序可互换。

本发明还提供了一种靶向 CD123 的嵌合抗原受体，其包含：本发明所述的抗体；铰链区；跨膜结构域；共刺激结构域；和 CD3 ζ 胞内信号转导结构域。

5 在具体实施方案中，所述共刺激结构域选自 CD27、CD28、4-1BB、OX-40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD-2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3 或其任意组合；优选地，所述共刺激结构域选自 4-1BB 或 CD28，所述 4-1BB 包含如 SEQ ID NO: 62 所述的氨基酸序列。

10 在一个具体实施方案中，所述 CD3 ζ 胞内信号转导结构域包含如 SEQ ID NO: 63 所述的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，所述铰链区和跨膜结构域选自 IgG1、IgG4、CD8 α 、CD28、IL-2 受体、IL-7 受体、IL-11 受体、PD-1 或 CD34 的铰链区和跨膜结构域。

15 优选地，所述的嵌合抗原受体包含选自由 SEQ ID NO: 65、66、67、68、69 和 70 组成的组中的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的氨基酸序列。

本发明还提供了一种核酸分子，其包含编码本发明的抗体或嵌合抗原受体的核苷酸序列。

20 本发明还提供了一种载体，其包含本发明的核酸分子；优选地，所述载体是病毒载体；更优选地，所述载体是慢病毒载体。

本发明还提供了一种细胞，其经本发明的载体转染，从而包含本发明的核酸分子或载体；优选地，所述细胞是 T 细胞。

25 本发明还提供了本发明的抗体、嵌合抗原受体、核酸分子、载体或细胞用于制备治疗表达 CD123 的肿瘤的药物的用途；优选地，所述表达 CD123 的肿瘤是急性髓系白血病(AML)。

除非特别指明，本文所述技术方案可以任意组合。

本发明进一步通过以下实施例来说明。

实施例 1: CD123 CAR 分子设计及 CAR-T 制备

30 本实施例以设计具有不同抗原识别域的 CD123 CAR 分子，及 CAR-T 细胞制备为例。

35 抗原识别域设计原则：CAR-T-1 为对照组，其 CD123 的 scFv 序列来自宾夕法尼亚大学报道[21]，在本文中命名为 scFv-01。CAR-T-2~7 为改造组，其 scFv 来源于小鼠免疫 CD123 胞外区融合蛋白所得单克隆抗体序列，在本文中命名为 scFv-02-07。

将不同抗原识别域的 CD123 scFv 的核苷酸序列通过基因合成的方法合成，然后通过同源重组方法与 CD8 α 铰链区、CD8 α 跨膜区、4-1BB 和 CD3 ζ 胞内区序列连接形成完整的 CAR 分子，即 CAR 1-7。将此 CAR 核酸片段通过限制性内切酶酶切和连接酶连接的方式，构建到慢病毒转移质粒 pLenti6.3/V5 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 中。将慢病毒包装质粒 pLP/VSVG, pLP1/MDK, pLP2/RSK (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 与上述获得的转移质粒，用 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 转染至 HEK293T 细胞，48 小时后收集培养基，300 g 离心去除细胞碎片后，用超速离心机 25000 rpm 离心 3 小时。将沉淀用 1 mL 生理盐水溶解，即为所需的慢病毒载体。

从健康志愿者的外周血单个核细胞中，使用 CD3/CD28 beads (Thermo Fisher, Cat#40203D)，分离出 T 细胞。将分离纯化后的 T 细胞以 1.0×10^6 个细胞/mL，接入含有 500 IU/mL IL-2 (山东金泰生物工程有限公司，中国) 的 X-VIVO 15 培养基 (Lonza, Switzerland) 中培养。在培养 48 小时后，用带有 CD123 CAR 分子的慢病毒载体以 MOI=0.5 感染 T 细胞，以获得 CAR-T-1-7。慢病毒感染 24 小时后，进行细胞换液，并接入新鲜培养体系 X-VIVO 15 加 500 IU/mL IL-2 中继续培养。在慢病毒感染 5 天后，使用移液枪反复吹打培养体系中的细胞并收集至离心管，置于磁力架上去除 CD3/CD28 beads。T 细胞离心并计数，取部分细胞使用流式细胞仪 (NovoCyte 2060R, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) 检测各组细胞的 CAR 分子转导效率。

图 1 所示为 T 细胞感染慢病毒 5 天、7 天、9 天、12 天后，各组细胞的 CAR 分子转导效率。与对照组 CAR-T-1 相比，CAR-T-2、CAR-T-3、CAR-T-7 组的 CAR 分子转导效率与其接近，CAR-T-4、CAR-T-5、CAR-T-6 组明显高于对照组，说明各组 CAR-T 细胞的 CAR 蛋白表达情况均较好。

实施例 2：改造后 CD123 CAR-T 的体外增殖能力

本实施例以检测具有不同抗原识别域的 CD123 CAR-T 的增殖能力为例。

在 CD123 CAR-T 细胞培养过程中，以慢病毒感染 T 细胞为培养第二天，之后每隔 2 至 3 天，收集 CAR-T 细胞并离心，加 1-2 毫升的培养体系重悬，取 10 微升的细胞稀释一定倍数后，用台盼蓝 (Solarbio, Cat# C0040) 进行染色，倒置显微镜 (Ts2-FL, Nikon, 日本) 下分别计活细胞总数与死细胞总数，计算出各组细胞的增殖情况。

图2显示,与对照组CAR-T-1相比,具有不同抗原识别域的CAR-T-2和CAR-T-7的总细胞增殖有明显提高。说明CAR-T-2和CAR-T-7的scFv设计能够改善CD123 CAR-T细胞增殖能力。

5 实施例3:改造后CD123 CAR-T在靶细胞刺激下的细胞分化情况

本实施例以检测具有不同抗原识别域的CD123 CAR-T,分别在两种靶细胞AML原代细胞或THP-1细胞(均表达CD123)的刺激下,其T细胞分化情况为例。

CAR-T细胞培养至第5天时,各组分别取两份 5×10^5 个细胞于12孔板中,以效靶比(E:T)=5:1分别加入靶细胞AML原代细胞或THP-1细胞。在靶细胞刺激6天后,即CAR-T细胞培养至第11天时,各组分别取 1×10^6 个细胞并离心,100微升DPBS(HyClone, CAT# SH30028.02)重悬;然后每组CAR-T细胞分别加T细胞分化相关荧光抗体进行标记,使用全光谱流式细胞仪(N7-00008-0A, Cytex Biosciences, Inc. Fremont)进行检测。

图3的结果中,CD45RA⁺CD62L⁺细胞群表示初始T细胞群和干性记忆T细胞群的组合,CD45RA⁺CD62L⁻细胞群为效应T细胞群。具有不同抗原识别域的CAR-T-2和CAR-T-7的CD45RA⁺CD62L⁺细胞群占比高于对照组CAR-T-1,且CD45RA⁺CD62L⁻细胞群占比低于对照组CAR-T-1。说明改造后的CD123抗原识别域具有更好的CAR-T细胞持久性。

实施例4:改造后CD123 CAR-T在体外对细胞系的杀伤效率

本实施例以检测具有不同抗原识别域的CD123 CAR-T对表达CD123和不表达CD123的肿瘤细胞系的杀伤效率为例。

分别收集并离心表达CD123的细胞系THP-1,以及不表达CD123的细胞系K562,用1毫升生理盐水(河北天成药业有限公司,中国)重悬,加5微升Calcein-AM(浓度1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Cat#C3100MP, ThermoFisher, USA),轻轻混匀,置于37℃培养箱中孵育30分钟,以标记靶细胞。孵育结束后,使用生理盐水清洗2次,加X-VIVO 15重悬并计数。向48孔细胞培养板(Corning Incorporated, Corning, NY, USA)中,每孔加入 1×10^5 个上述标记的靶细胞,并以E:T=10:1的比例加入各组CAR-T细胞,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育5小时。孵育完成后,加2%浓度的Triton-X-100(Cat#T8787-100ML, Sigma, Germany)裂解阳性对照组,即 1×10^5 个上述标记的靶细胞;每孔分别取100微升杀伤体系上

清于酶标板中,使用多功能酶标仪(Varioscan Lux, ThermoFisher)检测荧光值(激发波长:495nm,发射波长:515nm)。

图4显示,对于CD123阳性细胞系THP-1,具有不同抗原识别域的CD123 CAR-T中CAR-T-3和CAR-T-5的杀伤效率,较对照组CAR-T-1显著升高。同时,各组改造后CD123 CAR-T和对照组CAR-T-1,对不表达CD123的K562细胞系的杀伤效率,与T细胞组一致。说明各组CD123 CAR-T细胞对靶细胞均有一定杀伤效应,并有较好的特异性,且CAR-T-3和CAR-T-5的scFv设计更有利于CAR-T杀伤肿瘤细胞。

10 实施例5:改造后CD123 CAR-T在体外对AML原代细胞的杀伤效率

本实施例以检测具有不同抗原识别域的CD123 CAR-T对AML原代细胞的杀伤效率为例。

取3个分别为高抗原密度(即AML 1#, CD123表达率为99.87%, MFI为13298)、中抗原密度(即AML 2#, CD123表达率为75.4%, MFI为7518)、低抗原密度(即AML 3#, CD123表达率为94.58%, MFI为5252)的CD123阳性AML患者骨髓血样(抗原密度水平定义如下,高抗原密度:中位荧光强度(Median Fluorescence Intensity, MFI)大于10000;中抗原密度:MFI大于6000小于10000;低抗原密度:MFI小于6000),将AML患者的骨髓血样本分离单个核细胞,并使用CD34 MicroBeads (Cat#130-100-453, 美天旎, 德国)分选出CD34阳性AML原代细胞,用1毫升生理盐水重悬,加10微升Calcein-AM(浓度1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ThermoFisher, USA),轻轻混匀,置于37℃培养箱中孵育30分钟,以标记AML原代细胞。孵育结束后,使用生理盐水清洗2次,加X-VIVO 15重悬并计数。向48孔细胞培养板(Corning Incorporated, Corning, NY, USA)中,每孔加入 1×10^5 个上述标记的AML原代细胞,并以E:T=10:1的比例,分别加入CD123 CAR-T细胞,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育5小时。孵育完成后,加2%浓度的Triton-X-100裂解阳性对照组,即 1×10^5 个上述标记的AML原代细胞;每孔分别取100微升杀伤体系上清于酶标板中,使用多功能酶标仪(Varioscan Lux, ThermoFisher)检测荧光值(激发波长:495nm,发射波长:515nm)。

图5显示,与对照组CAR-T-1相比,具有不同抗原识别域的CAR-T-3对3个高(即AML 1#)、中(即AML 2#)、低(即AML 3#)抗原密度的CD123阳性AML患者的原代细胞均具有显著增强的杀伤效率。说明具有CAR-T-3 scFv的CD123 CAR-T细胞,能够有效提高对原代细胞的杀伤效率。

实施例 6: 改造后 CD123 CAR-T 在靶细胞刺激下的细胞因子表达
本实施例以检测具有不同抗原识别域的 CD123 CAR-T 在靶细胞
AML 原代细胞刺激下的细胞因子表达水平为例。

- 5 向 48 孔细胞培养板 (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) 中,
每孔加入 1×10^5 个靶细胞 AML 原代细胞, 此 AML 原代细胞的 CD123
表达率为 99.87%、MFI 为 13298, 并以 E:T=10:1 的比例加入各组 CAR-T
细胞, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 5 小时。取细胞上清, 使用 CBA
试剂盒 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 和流式细胞仪 (NovoCyte
10 2060R, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) 检测各种细胞因子的
表达水平。

图 6 显示, 与对照组 CAR-T-1 相比, 具有不同抗原识别域的 CAR-T-6
组, 在靶细胞刺激下, IL-2、TNF、IFN- γ 的表达水平明显提高; 其余各
组 CAR-T 细胞的细胞因子表达, 与对照组 CAR-T-1 相近。说明 CAR-T-6
15 的 scFv 设计有利于 CD123 CAR-T 细胞因子的表达。

以下表 1 和表 2 中为本发明中涉及的具体氨基酸序列。

表 1 示例性抗体的 CDR 和 scFv 序列

克隆 ID.	SEQ ID NO	氨基酸序列
scFv-01	VH-CDR1	7 GYTFTSYWMN
	VH-CDR2	13 RIDPYDSETHYNQKFKDKA
	VH-CDR3	19 ARGNWDDY
	VL-CDR1	25 ASKSISKDLAW
	VL-CDR2	31 GSTLQSG
	VL-CDR3	37 QHINKYPYTF
	VH	43 QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWWKQRPDQGLEWIGRIDPY DSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQG TTLTVSS
	VL	49 DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKGPKGNKLLIYSGSTLQSG IPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYCQQHINKYPYTFGGGGTKLEIK
scFv-02	scFv	55 QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWWKQRPDQGLEWIGRIDPY DSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQG TTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGDVGITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAW YQEKGPKGNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYCQQHN KYPYTFGGGGTKLEIK
	VH-CDR1	8 GYSFTDYYVH
	VH-CDR2	14 YISCYNGATNYPKFKGKA
	VH-CDR3	20 AGGEGYYGYDGYAMDY
	VL-CDR1	26 ASQDINKYIAW
	VL-CDR2	32 TSTLQPG
	VL-CDR3	38 QYDDLTYTF
	VH	44 QVQLKQSGPELVKTGASVKMSCKASGYSTFDYVHWVRQSHGKSLEWIGYISCY NGATNYPKFKGKATFTVDTSSSTAYMQFKSLTSEDSAVYYCAGGEGYYGYDGYA MDYWGGGTSVTVSS
scFv-02	VL	50 DIQLTQSPSSLSASLGGKVITITCKASQDINKYIAWYQHKPGKPRLLIHYTSTLQPGI PSRFSGSGSGGDYFSSINLEPEDIATYYCLQYDDLTYTFGGGGTKLEIK
	scFv	56 QVQLKQSGPELVKTGASVKMSCKASGYSTFDYVHWVRQSHGKSLEWIGYISCY NGATNYPKFKGKATFTVDTSSSTAYMQFKSLTSEDSAVYYCAGGEGYYGYDGYA MDYWGGGTSVTVSSGGGGSGGGSGGGSGDIQLTQSPSSLSASLGGKVITITCKAS

			QDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGGDYSPFISINLEPEDIA TYYCLQYDDLYTFGGGTKEIK
scFv-03	VH-CDR1	9	GYTFMTYVIH
	VH-CDR2	15	YCNPNYNDGINYNEKFKGKA
	VH-CDR3	21	ARSPSYGRSYYYGMDY
	VL-CDR1	27	ASQSVDYDGD SYMNW
	VL-CDR2	33	ASNLESG
	VL-CDR3	39	QSNEDPYTF
	VH	45	QVQLKQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFMTYVIHWWVKQKPGQGLEWFGYCNP YNDGINYNEKFKGKATLTSKSSSTVYMESSLTSEDSAVYYCARSPSYGRSYYY GMDYWGQGTSTVTVSS
	VL	51	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKVLIAAS NLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKEIK
	scFv	57	QVQLKQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFMTYVIHWWVKQKPGQGLEWFGYCNP YNDGINYNEKFKGKATLTSKSSSTVYMESSLTSEDSAVYYCARSPSYGRSYYY GMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKA SQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKVLIAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKEIK
scFv-04	VH-CDR1	10	GYSITSDYAWN
	VH-CDR2	16	YISYSGSSSNPSLKSRI
	VH-CDR3	22	ARGMDY
	VL-CDR1	28	ASSSVSSSYLHW
	VL-CDR2	34	TSNLAGS
	VL-CDR3	40	QFHRSPTF
	VH	46	DVKLQESGPGVLKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIWQFPGNKLEWMGYISYSG SSNSNPSLKSRI SITRDTSKNOFFLQLNSVTTEDTATYYCARGMDYWGQGTSTVTVSS
	VL	52	DIVLTQSPAIMSVFLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLAS GVPARFSGSGSGTYSLTSSMEAEADAATYYCHQFHRSPRTFGGGTKEIK
	scFv	58	DVKLQESGPGVLKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIWQFPGNKLEWMGYISYSG SSNSNPSLKSRI SITRDTSKNOFFLQLNSVTTEDTATYYCARGMDYWGQGTSTVTVS SGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPAIMSVFLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQ KPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTYSLTSSMEAEADAATYYCHQFHRSP RTFGGGTKEIK
scFv-05	VH-CDR1	11	GYTFSSYNMH
	VH-CDR2	17	YIYPGNGGTNYNQKFKGKA
	VH-CDR3	23	ARERGLYDYDETGYYAMDY
	VL-CDR1	29	ASQSISDYLHW
	VL-CDR2	35	ASQSISE
	VL-CDR3	41	NGHSFPYTF
	VH	47	QVQLKQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFSSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPG NGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISLTSEDSAVYFCARERGLYDYDETG YAMDYWGQGTSTVTVSS
	VL	53	DIQLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISE IPSRFSGSGSGSDFTLINSVPEDEVGVYFCQNGHSFPYTFGGGTKEIK
	scFv	59	QVQLKQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFSSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPG NGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISLTSEDSAVYFCARERGLYDYDETG YAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPATLSVTPGDRVSLSCR ASQSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISEIPSRFSGSGSGSDFTLINSVPEDEV GVYFCQNGHSFPYTFGGGTKEIK
scFv-06	VH-CDR1	12	GYSFTGYMH
	VH-CDR2	18	RINPYNNATSYNQNFKDKA
	VH-CDR3	24	ARGEWLLPLAC
	VL-CDR1	30	SSQSLNSSNQKNYLAW
	VL-CDR2	36	ASTRDSG
	VL-CDR3	42	QHYSTPWTF
	VH	48	QVQLKQSGPELVKSGASVKISCKASGYSTGYMHVVKQSHVKSLEWIGRINPYN NATSYNQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARGEGWLLPLACW GQGTLTVSA
	VL	54	DIVMTQSPSSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLV YFASTRDSGVPDRFIGSGSGTDFTLTSSVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGTKL EIK
	scFv	60	QVQLKQSGPELVKSGASVKISCKASGYSTGYMHVVKQSHVKSLEWIGRINPYN NATSYNQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARGEGWLLPLACW GQGTLTVSAAGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSL LNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRDSGVPDRFIGSGSGTDFTLTSSVQ

			AEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGKLEIK
	VH-CDR1	8	GYSFTDYYVH
	VH-CDR2	14	YISCYNGATNYPKFKGKA
	VH-CDR3	20	AGGEGYYGYDGYAMDY
	VL-CDR1	26	ASQDINKYIAW
	VL-CDR2	32	TSTLQPG
	VL-CDR3	38	QYDDLTYF
scFv-07	VH	44	QVQLKQSGPELVKTGASVKMSCKASGYSTFDYYVHWVRQSHGKSLEWIGYISCY NGATNYPKFKGKATFTVDTSSSTAYMQFKSLTSEDSAVYYCAGGEGYYGYDGYA MDYWGGQTSVTVSS
	VL	50	DIQLTQSPSSLSASLGGKVITITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGI PSRFGSGSGGDYSFISINLEPEDIATYYCLQYDDLTYFGGGKLEIK
	scFv	61	DIQLTQSPSSLSASLGGKVITITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGI PSRFGSGSGGDYSFISINLEPEDIATYYCLQYDDLTYFGGGKLEIKGGGSGGGG SGGGGSQVQLKQSGPELVKTGASVKMSCKASGYSTFDYYVHWVRQSHGKSLEWI GYISCYNGATNYPKFKGKATFTVDTSSSTAYMQFKSLTSEDSAVYYCAGGEGYY GYDGYAMDYWGQTSVTVSS

表 2 示例性嵌合抗原受体序列

克隆 ID	SEQ ID NO	氨基酸序列
4-1BB	62	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
CD3ζ	63	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR-1	64	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWSHPQFEKGGGSGGGGSQVQLQQ PGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWKQRPDQGLEWIGRID PYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGN WDDYWGGQTTLTVSSGGGSGGGSGGGGSDVQITQSPSYLAASPG ETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSG SGTDFTLTISSELPEDFAMYYCQHNKYPYTFGGGKLEIKTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR-2	65	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWSHPQFEKGGGSGGGGSQVQLKQS GPELVKTGASVKMSCKASGYSTFDYYVHWVRQSHGKSLEWIGYISCY NGATNYPKFKGKATFTVDTSSSTAYMQFKSLTSEDSAVYYCAGGEGY YGYDGYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLS SASLGGKVITITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSR FSGSGSGGDYSFISINLEPEDIATYYCLQYDDLTYFGGGKLEIKTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR-3	66	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWSHPQFEKGGGSGGGGSQVQLKQSG PELVKPGASVKMSCKASGYTFMTYVIHVVVKQKPGQGLEWFGYCNPNY DGINYNEKFKGKATLTSDKSSSTVYMESSLTSEDSAVYYCARSPSYGR

		SYYYGMDYWGGQTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPASLAVS LGQRATISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKVLIAASNLESGIP ARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQSNEDPYTFGGGTCLDIKTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR-4	67	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWSHPQFEKGGGGSGGGGSDVKLOESGPG LVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKLEWMGYISYSGSSNSNP SLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARGMDYWGGQTSVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAIMSVFLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQ QKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQ FHRSPRTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE YDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR-5	68	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWSHPQFEKGGGGSGGGGSGVQLKQSGAEL VRSGASVKMSCKASGYTFSSYNMHWVKQTPGQGLEWIGIYYPNGGNTYN QKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARERGLYDYDETTYAMD YWGQTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRAS QSIDYLHWYQKSHESPRLLIKYASQSISEIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPED VGVYFCQNGHSFPYTFGGGTLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR-6	69	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWSHPQFEKGGGGSGGGGSGVQLKQSGPELV KSGASVKISCKASGYSFTGYMHWVKQSHVKSLEWIGRINPYNNTSYNQNF KDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARGEGWLLPLACWGQGLVT VSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMCKSSQSLLNSSN QKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRDSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAE LADYFCQQHYSTPWTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN GRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR-7	70	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWSHPQFEKGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSAS LGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGG DYSFISISNLEPEDIATYYCLQYDDLYTFGGGTLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGV QLKQSGPELVKTGASVKMSCKASGYSFTDYYVHWVRQSHGKSLEWIGYISCYN GATNYPKFKGKATFTVDTSSSTAYMQFKSLTSEDSAVYYCAGGEGYYGYDGY AMDYWGGQTSVTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG L

		DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRR GRPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
--	--	--

参考文献:

- [1] Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Research Data (1973–2015), National Cancer Institute, Dccps, Surveillance Research Program, Released April 2018, Based on the November 2017 Submission. 2019. (www.seer.cancer.gov).
- [2] Thein MS, Ershler WB, Jemal A, Yates JW, Baer MR. Outcome of older patients with acute myeloid leukemia: an analysis of SEER data over 3 decades. *Cancer* 2013;119(15):2720–7.
- [3] Kantarjian HM, DiNardo CD, Nogueras-Gonzalez GM, Kadia TM, Jabbour E, Bueso-Ramos CE, et al. Results of second salvage therapy in 673 adults with acute myelogenous leukemia treated at a single institution since 2000. *Cancer* 2018;124(12):2534–40.
- [4] Jang J, Lee J, Jang JH, Jung CW, Park S. Anti-leukemic effects of simvastatin on NRAS(G12D) mutant acute myeloid leukemia cells. *Mol Biol Rep.* 2019;46:5859–66.
- [5] Roboz GJ. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:43–50.
- [6] Benmeharek, M.R.; Karches, C.H.; Cadilha, B.L.; Lesch, S.; Endres, S.; Kobold, S. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1283.
- [7] Gross, G.; Waks, T.; Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 10024–10028.
- [8] Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13(6):394.
- [9] Muñoz L, Nomdedéu JF, López O, et al. Interleukin-3 receptor α chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica.* 2001;86:1261–9.
- [10] Blalock WL, Weinstein-Oppenheim C, Chang F, et al. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia* Aug. 1999;13:1109–66.
- [11] Testa U, Riccioni R, Mili S, et al. Elevated expression of IL-3R α in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood.* 2002;100:2980–8.
- [12] Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor α chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem

cells. *Leukemia*, 2000,14(10), 1777–1784.

[13] Wognum AW, De Jong MO, Wagemaker G. Differential Expression of Receptors for Hemopoietic Growth Factors on Subsets of CD34+Hemopoietic Cells. *Leukemia & Lymphoma*,1996, 24(1-2), 11–25.

5 [14] Huang S, Chen Z, Yu JF, et al. Correlation Between IL - 3 Receptor Expression and Growth Potential of Human CD34+Hematopoietic Cells from Different Tissues. *Stem Cells*, 1999,17(5), 265–272.

[15] Munoz L, Nomdedeu JF, Lopez O, et al. Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies.

10 *Haematologica*, 2001 86: 1261-1269

[16] Xie LH, Biondo M, Busfield SJ, et al. CD123 target validation and preclinical evaluation of ADCC activity of anti-CD123 antibody CSL362 in combination with NKs from AML patients in remission. *Blood Cancer Journal*, 2017,7(6), e567.

15 [17] Baroni ML, Sanchez Martinez D, Gutierrez Aguera F, et al. (2020). 41BB-based and CD28-based CD123-redirected T-cells ablate human normal hematopoiesis in vivo. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2020,8(1), e000845.

20 [18] Testa U, Pelosi E, Frankel A. CD123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomarker Research*,2014, 2(1), 4.

[19] Bras AE, de Haas V, van Stigt A, et al. CD123 expression levels in 846 acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*.2018.

25 [20] Gauthier J, Turtle CJ. Insights into cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19-specific CAR-T cell therapy. *Curr Res Transl Med* 2018;66(2):50–2.

[21] Cummins K, Frey N, Nelson A, Schmidt A, Luger S, Hexner E, et al. Treating Relapsed/Refractory. (RR) AML With Biodegradable Anti-CD123 CAR Modified T Cells (2017) Atlanta, GA: Blood ASH.

30

权利要求书

1. 一种特异性结合 CD123 的抗体，其包括重链可变结构域 VH 和轻链可变结构域 VL，所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:1

5 (GYX₁X₂X₃X₄(D)YX₅X₆X₇) 的 VH-CDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO:2 (X₈X₉X₁₀(X₁₁)X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈NX₁₉X₂₀X₂₁KX₂₂X₂₃X₂₄) 的 VH-CDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO:3

(AX₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁(YD)X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀) 的 VH-CDR3 氨基酸序列；其中 X₁ 选自 S、T；X₂ 选自 F、I；X₃ 选自 T、S、M；X₄ 选自 S、D、T、G；X₅ 选自 W、Y、V、A、N；X₆ 选自 M、V、I、W；X₇ 选自 N、H；X₈ 选自 Y、R；X₉ 选自 I、C；X₁₀ 选自 D、N、Y、S；X₁₁ 选自 P、C；X₁₂ 选自 Y、G；X₁₃ 选自 D、N、S；X₁₄ 选自 S、N、D、G；X₁₅ 选自 E、A、G、S；X₁₆ 选自 T、I、S；X₁₇ 选自 H、S、N；X₁₈ 选自 Y、S；X₁₉ 选自 Q、E、P；X₂₀ 选自 K、N、S；X₂₁ 选自 F、L；X₂₂ 选自 D、G、S；X₂₃ 选自 K、R；X₂₄ 选自 A、I；X₂₅ 选自 R、G；X₂₆ 选自 G、S、E；X₂₇ 选自 E、P、R；X₂₈ 选自 G、S；X₂₉ 选自 N、Y、L、W；X₃₀ 选自 W、Y、L；X₃₁ 选自 G、D；X₃₂ 选自 R、E；X₃₃ 选自 Y、S、T；X₃₄ 选自 D、Y、G；X₃₅ 选自 G、Y；X₃₆ 选自 Y、L；X₃₇ 选自 A、G、P；X₃₈ 选自 M、L；X₃₉ 选自 D、A；X₄₀ 选自 Y、C；所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4

(X₄₁SX₄₂X₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉(QK)X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃W) 的 VL-CDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO:5 (X₅₄SX₅₅X₅₆X₅₇X₅₈X₅₉) 的 VL-CDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO:6 (X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄(P)X₆₅TF) 的 VL-CDR3 氨基酸序列；其中 X₄₁ 选自 A、S；X₄₂ 选自 Q、K、S；X₄₃ 选自 S、D；X₄₄ 选自 I、V、L；X₄₅ 选自 S、N、D、L；X₄₆ 选自 K、Y、S、D、N；X₄₇ 选自 D、S；X₄₈ 选自 G、S；X₄₉ 选自 D、N；X₅₀ 选自 S、N；X₅₁ 选自

D、Y；X₅₂选自L、I、M；X₅₃选自A、N、H；X₅₄选自G、T、A；
 X₅₅选自T、N、Q；X₅₆选自L、S、R；X₅₇选自Q、E、A、I、D；X₅₈
 选自S、P；X₅₉选自G、E；X₆₀选自Q、N；X₆₁选自H、Y、S、F、G；
 X₆₂选自N、D、H、Y；X₆₃选自K、L、E、R、S；X₆₄选自Y、L、D、
 5 S、F、T；X₆₅选自Y、R、W；

优选地，所述 VH-CDR1 选自由 SEQ ID NO: 8、9、10、11、12 组成的组中的氨基酸序列；所述 VH-CDR2 选自由 SEQ ID NO: 14、15、16、17、18 组成的组中的氨基酸序列；所述 VH-CDR3 选自由 SEQ ID NO: 20、21、22、23、24 组成的组中的氨基酸序列；所述 VL-CDR1
 10 选自由 SEQ ID NO: 26、27、28、29、30 组成的组中的氨基酸序列；所述 VL-CDR2 选自由 SEQ ID NO: 32、33、34、35、36 组成的组中的氨基酸序列；所述 VL-CDR3 选自由 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42 组成的组中的氨基酸序列；

更优选地，所述抗体包括：

15 1)包含如 SEQ ID NO:8 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:14 所示的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:20 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域；和包含如 SEQ ID NO:26 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:32 所示的 VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:38 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域；和/或

20 2)包含如 SEQ ID NO:9 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:15 所示的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:21 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域；和包含如 SEQ ID NO:27 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:33 所示的 VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:39 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域；和/或

25 3)包含如 SEQ ID NO:10 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:16 所示

的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:22 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域；
和包含如 SEQ ID NO:28 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:34 所示的
VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:40 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域；和
/或

5 4)包含如 SEQ ID NO:11 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:17 所示
的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:23 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域；
和包含如 SEQ ID NO:29 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:35 所示的
VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:41 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域；和
/或

10 5)包含如 SEQ ID NO:12 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO:18 所示
的 VH-CDR2 和如 SEQ ID NO:24 所示的 VH-CDR3 的重链可变结构域；
和包含如 SEQ ID NO:30 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO:36 所示的
VL-CDR2 和如 SEQ ID NO:42 所示的 VL-CDR3 的轻链可变结构域。

2. 权利要求 1 所述的抗体，其中所述重链可变结构域包含选自由
15 SEQ ID NO:44、45、46、47 和 48 组成的组中的氨基酸序列，或包含
与其具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%同一性的氨基酸
序列；和/或所述轻链可变结构域包含选自由 SEQ ID NO:50、51、52、
53 和 54 组成的组中的氨基酸序列，或包含与其具有至少 85%、至少
90%、至少 95%、至少 99%同一性的氨基酸序列；

20 优选地，所述抗体包含：

1) 如 SEQ ID NO:44 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:50 所
示的轻链可变结构域；和/或

2) 如 SEQ ID NO:45 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:51 所
示的轻链可变结构域；和/或

25 3) 如 SEQ ID NO:46 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:52 所

示的轻链可变结构域；和/或

4) 如 SEQ ID NO:47 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变结构域；和/或

5) 如 SEQ ID NO:48 所示的重链可变结构域和如 SEQ ID NO:54 所示的轻链可变结构域；

更优选地，所述抗体包含：选自由 SEQ ID NO: 56、57、58、59、60 和 61 组成的组中的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗体，其中所述抗体为单链抗体 scFv；
更优选地，所述单链抗体 scFv 的重链可变结构域和轻链可变结构域由富含甘氨酸和丝氨酸的接头肽链相连，并且重链可变结构域和轻链可变结构域的顺序可互换。

4. 一种靶向 CD123 的嵌合抗原受体，其包含：权利要求 1-3 中任一项所述的抗体；铰链区；跨膜结构域；共刺激结构域；和 CD3 ζ 胞内信号转导结构域；

优选地，所述共刺激结构域选自 CD27、CD28、4-1BB、OX-40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD-2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3 或其任意组合；更优选地，所述共刺激结构域选自 4-1BB 或 CD28，所述 4-1BB 包含如 SEQ ID NO: 62 所述的氨基酸序列；

优选地，所述 CD3 ζ 胞内信号转导结构域包含如 SEQ ID NO: 63 所述的氨基酸序列；

优选地，所述铰链区和跨膜结构域选自 IgG1、IgG4、CD8 α 、CD28、IL-2 受体、IL-7 受体、IL-11 受体、PD-1 或 CD34 的铰链区和跨膜结构域。

5. 权利要求 4 所述的嵌合抗原受体，所述的嵌合抗原受体包含选

自由 SEQ ID NO: 65、66、67、68、69 和 70 组成的组中的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的氨基酸序列。

5 6. 一种核酸分子，其包含编码权利要求 1-3 中任一项所述的抗体或权利要求 4-5 中任一项所述的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

7. 一种载体，其包含权利要求 6 所述的核酸分子；优选地，所述载体是病毒载体；更优选地，所述载体是慢病毒载体。

8. 一种细胞，其经权利要求 7 所述的载体转染，从而包含权利要求 6 所述的核酸分子或权利要求 7 所述的载体；优选地，所述细胞为 T
10 细胞。

9. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-3 中任一项所述的抗体、权利要求 4-5 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体或权利要求 8 所述的细胞，以及可药用载体。

15 10. 权利要求 1-3 中任一项所述的抗体、权利要求 4-5 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体或权利要求 8 所述的细胞用于制备治疗表达 CD123 的肿瘤的药物
的用途；优选地，所述表达 CD123 的肿瘤是急性髓系白血病(AML)。

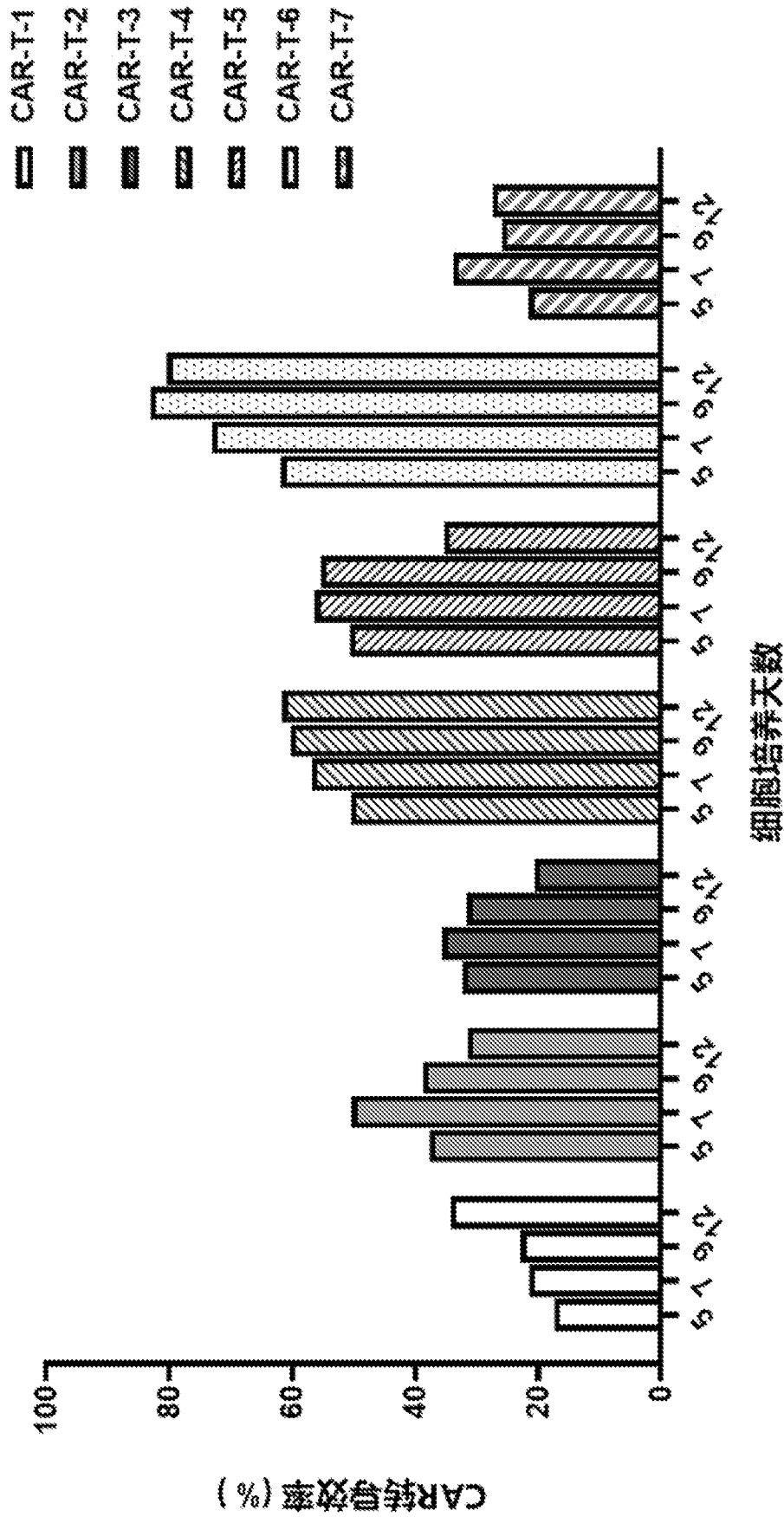


图 1

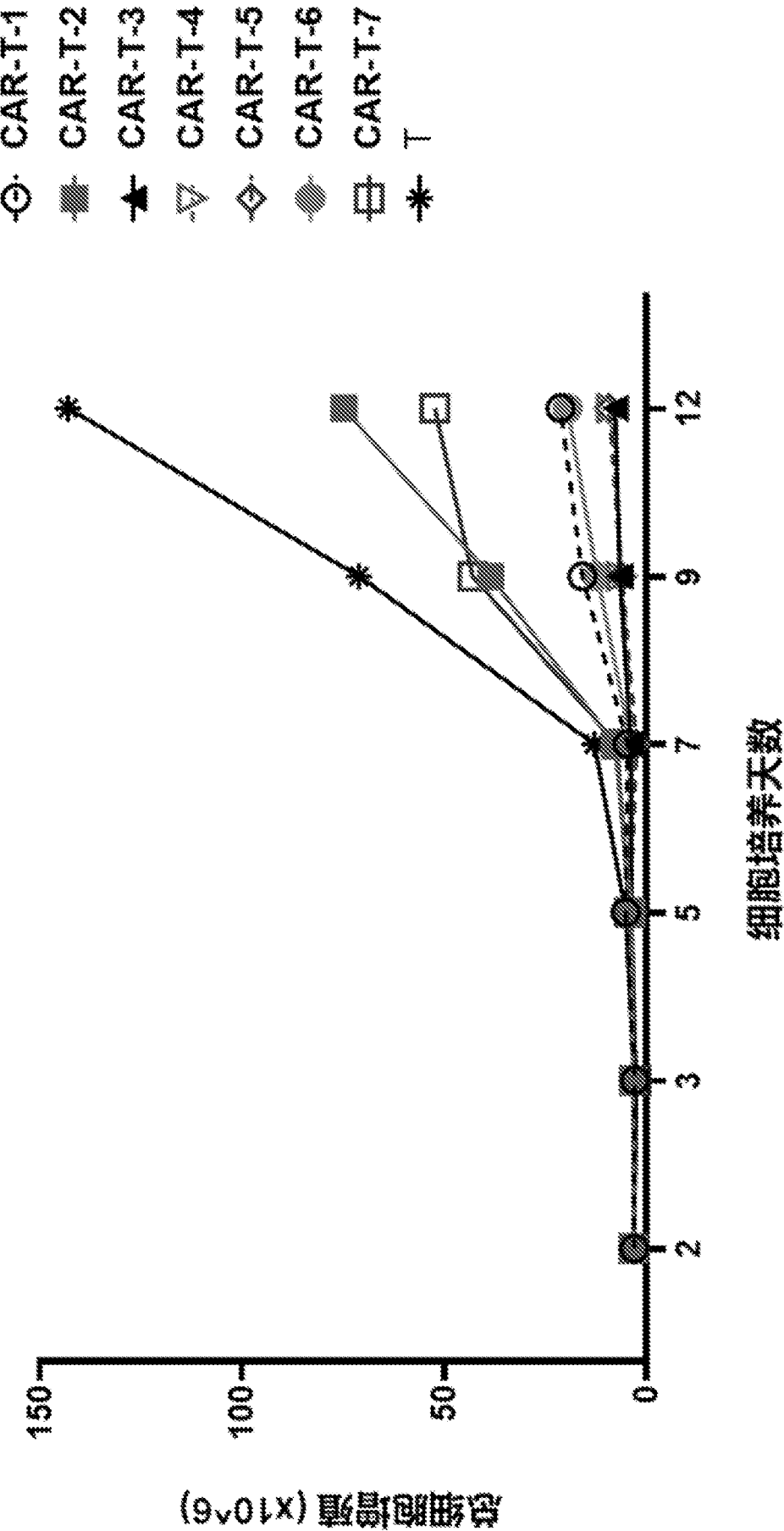


图 2

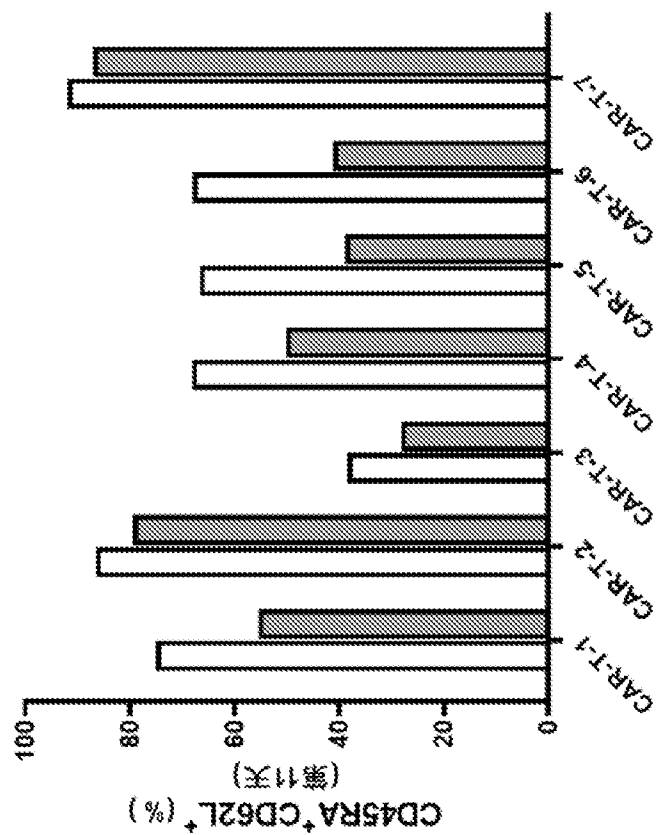
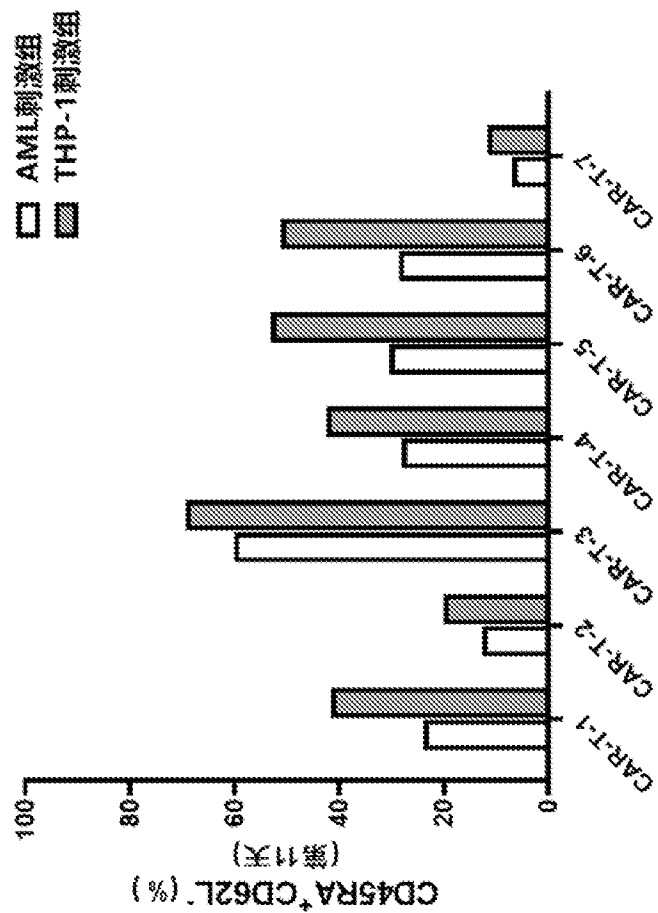


图 3

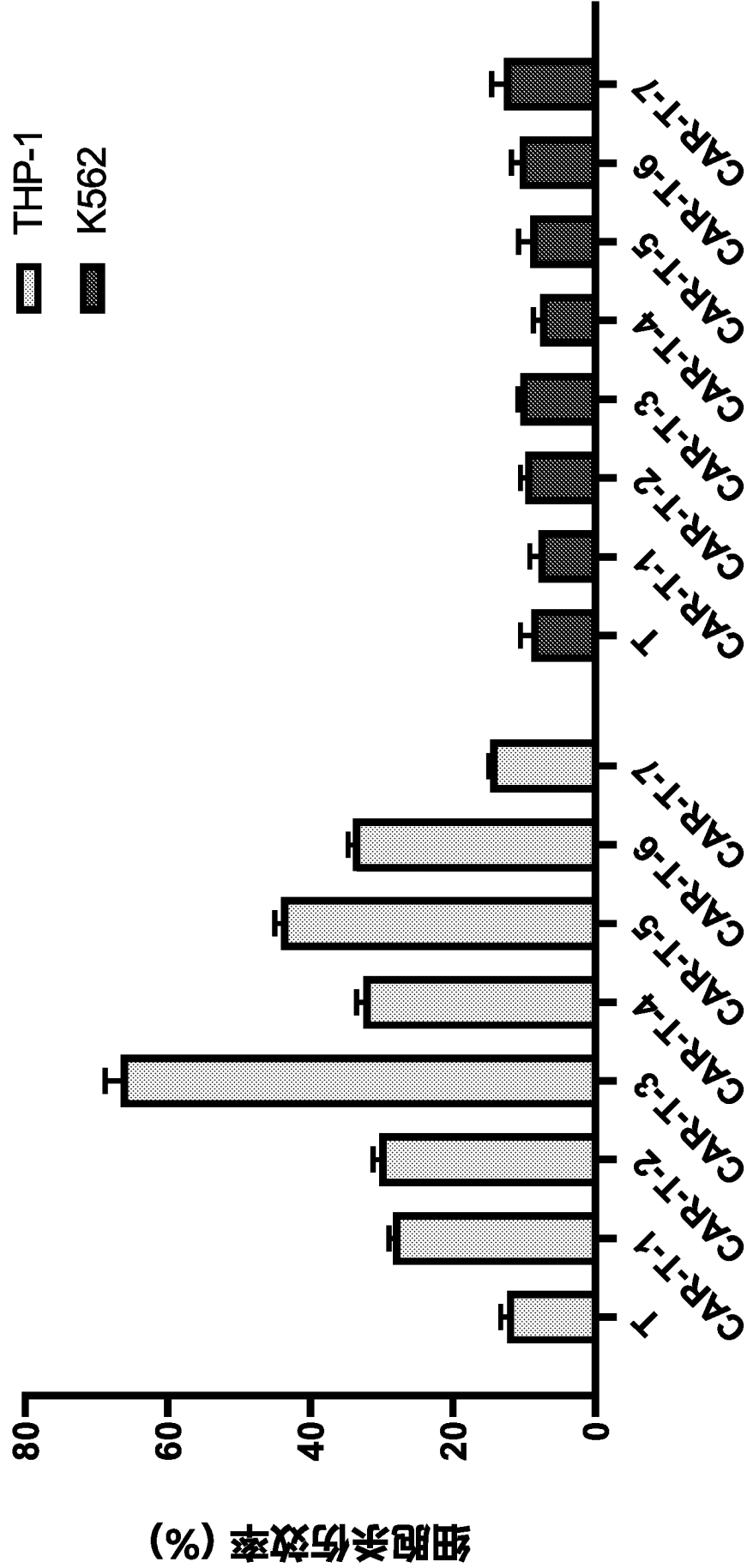


图 4

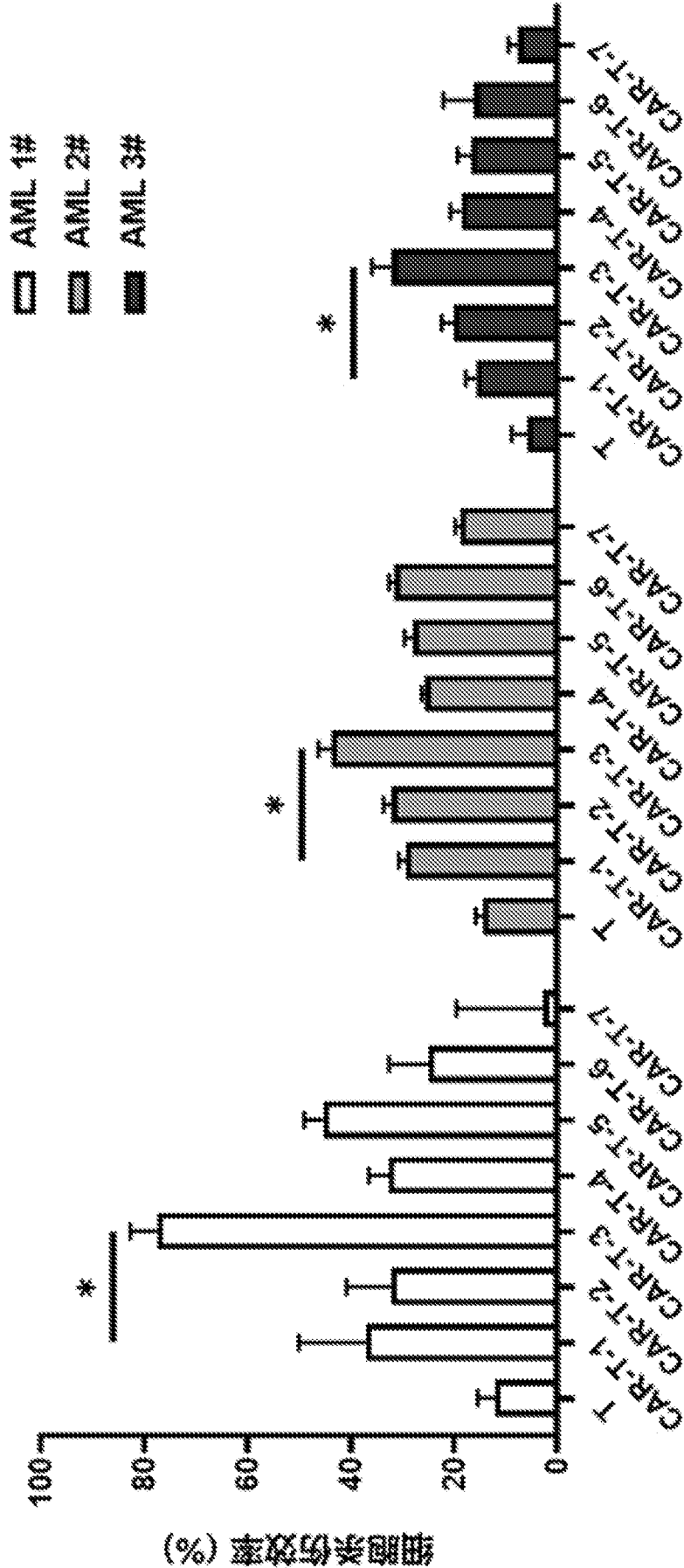


图 5

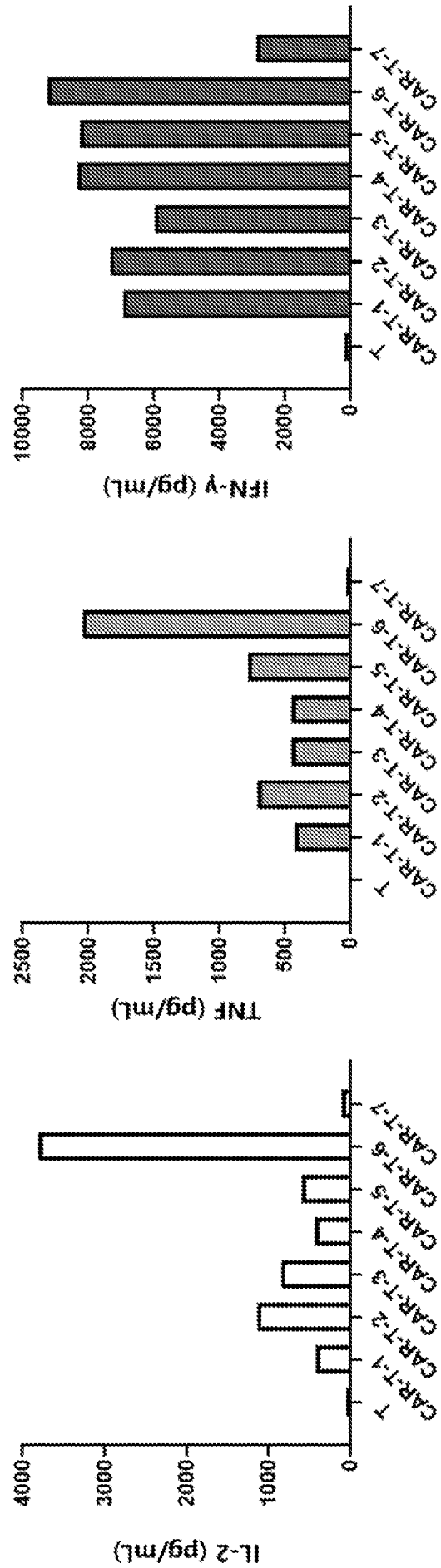


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/127505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i;
C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, Pubmed, ISI_Web of Science: CD123, 抗体, antibody, 嵌合抗原受体, CAR, chimeric antigen receptor, 等; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列; Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System and searched sequences: SEQ ID NO: 8-54

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112646033 A (BEIJING IMMUNOCHINA PHARMACEUTICAL CO., LTD.; SHANDONG JINSAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 13 April 2021 (2021-04-13) claims 1-10	1-10
X	WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 19 December 2019 (2019-12-19) claims 1-20, and description, p. 6, paragraph 2, and embodiment 4	1-3, 6-10
Y	WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 19 December 2019 (2019-12-19) claims 1-20, and description, p. 6, paragraph 2, and embodiment 4	4, 5
Y	CN 112079927 A (XI'AN SUNNYCELL BIOMEDICINE CO., LTD.) 15 December 2020 (2020-12-15) claims 1-16	4, 5
Y	CN 110950965 A (CHONGQING PRECISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 April 2020 (2020-04-03) claims 1-11	4, 5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2022

Date of mailing of the international search report

07 February 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/127505**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106103490 A (CELLECTIS) 09 November 2016 (2016-11-09) claims 1-35	4, 5
A	CN 111349163 A (BEIJING ZHIREN MEIBO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; GENRIX (SHANGHAI) BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 30 June 2020 (2020-06-30) claims 1-10	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/127505

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1-10 (in part), relating to an antibody that specifically binds to CD123, comprising: a heavy chain variable structure domain containing VH-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 8, VH-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 14, and VH-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 20; and a light chain variable structure domain containing VL-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 26, VL-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 32, and VL-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 38; a related chimeric antigen receptor targeting CD123, a nucleic acid molecule, a vector, a cell, a pharmaceutical composition, and a use;
- [2] Invention 2: claims 1-10 (in part), relating to an antibody that specifically binds to CD123, comprising: a heavy chain variable structure domain containing VH-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 9, VH-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 15, and VH-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 21; and a light chain variable structure domain containing VL-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 27, VL-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 33, and VL-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 39; a related chimeric antigen receptor targeting CD123, a nucleic acid molecule, a vector, a cell, a pharmaceutical composition, and a use;
- [3] Invention 3: claims 1-10 (in part), relating to an antibody that specifically binds to CD123, comprising: a heavy chain variable structure domain containing VH-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 10, VH-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 16, and VH-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 22; and a light chain variable structure domain containing VL-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 28, VL-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 34, and VL-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 40; a related chimeric antigen receptor targeting CD123, a nucleic acid molecule, a vector, a cell, a pharmaceutical composition, and a use;
- [4] Invention 4: claims 1-10 (in part), relating to an antibody that specifically binds to CD123, comprising: a heavy chain variable structure domain containing VH-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 11, VH-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 17, and VH-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 23; and a light chain variable structure domain containing VL-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 29, VL-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 35, and VL-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 41; a related chimeric antigen receptor targeting CD123, a nucleic acid molecule, a vector, a cell, a pharmaceutical composition, and a use;
- [5] Invention 5: claims 1-10 (in part), relating to an antibody that specifically binds to CD123, comprising: a heavy chain variable structure domain containing VH-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 12, VH-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 18, and VH-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 24; and a light chain variable structure domain containing VL-CDR1 as shown in SEQ ID NO: 30, VL-CDR2 as shown in SEQ ID NO: 36, and VL-CDR3 as shown in SEQ ID NO: 42; a related chimeric antigen receptor targeting CD123, a nucleic acid molecule, a vector, a cell, a pharmaceutical composition, and a use;
- [6] It is known in the art that the binding specificity and related activity of antibodies depend on the six CDRs of the light and heavy chains together, and therefore, it is generally considered that the combination of six CDRs is the smallest unit that determines the performance of an antibody, i.e., the combination of the six CDRs of the light and heavy chains constitute the significant structural unit of the antibody. Although the CDRs of the light chain and heavy chain of the above five inventions share common amino acid residues at a small number of positions, these few common amino acid residues are not sufficient to determine the binding specificity of the antibody, and thus cannot constitute a significant structural unit. The same or corresponding technical feature between the five inventions is an "anti-CD123 antibody", which is disclosed in the prior art document (see, for example, CN112079927A (15 December 2020) that discloses a CD123 binding protein comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region and a chimeric antigen receptor containing the binding protein). Therefore, the same or corresponding technical feature makes no contribution over the prior art, and cannot be considered to be the special technical feature as defined in PCT Rule 13.2. Therefore, the present application does not comply with the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/127505**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/127505

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112646033	A	13 April 2021	None			
WO	2019237350	A1	19 December 2019	CN	111542537	A	14 August 2020
CN	112079927	A	15 December 2020	None			
CN	110950965	A	03 April 2020	None			
CN	106103490	A	09 November 2016	US	2017183413	A1	29 June 2017
				ES	2740903	T3	07 February 2020
				RU	2016140855	A	20 April 2018
				WO	2015140268	A1	24 September 2015
				RU	2727290	C2	21 July 2020
				MX	370272	B	09 December 2019
				EP	3569619	A1	20 November 2019
				KR	20170002389	A	06 January 2017
				US	10988541	B2	27 April 2021
				PT	3119807	T	04 September 2019
				MX	2019012244	A	19 December 2019
				US	2019002573	A1	03 January 2019
				CN	106103490	B	03 March 2020
				DK	3569619	T3	14 June 2021
				CA	2943008	A1	24 September 2015
				PL	3119807	T3	30 September 2019
				US	2021163612	A1	03 June 2021
				TR	201910814	T4	21 August 2019
				DK	3119807	T3	15 July 2019
				BR	112016019643	A2	24 October 2017
				EP	3119807	B1	24 April 2019
				AU	2015233461	A1	25 August 2016
				IL	247172	D0	29 September 2016
				HU	E045480	T2	30 December 2019
				MX	2016011240	A	11 January 2017
				JP	2017509342	A	06 April 2017
				KR	102157411	B1	18 September 2020
				AU	2015233461	B2	19 March 2020
				EP	3569619	B1	26 May 2021
				RU	2016140855	A3	16 November 2018
				US	9944709	B2	17 April 2018
				EP	3119807	A1	25 January 2017
				JP	6689202	B2	28 April 2020
				JP	2020156482	A	01 October 2020
				CA	2943008	C	30 March 2021
CN	111349163	A	30 June 2020	CN	111171155	B	19 February 2021
				CN	111171155	A	19 May 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/127505

A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, Pubmed, ISI_Web of Science和关键词: CD123, 抗体, antibody, 嵌合抗原受体, CAR, chimeric antigen receptor, 等; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 8-54																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 112646033 A (北京艺妙神州医药科技有限公司 山东金赛生物科技有限公司) 2021年4月13日 (2021 - 04 - 13) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 2019年12月19日 (2019 - 12 - 19) 权利要求1-20, 说明书第6页第2段, 实施例4</td> <td>1-3, 6-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 2019年12月19日 (2019 - 12 - 19) 权利要求1-20, 说明书第6页第2段, 实施例4</td> <td>4, 5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112079927 A (西安桑尼赛尔生物医药有限公司) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 权利要求1-16</td> <td>4, 5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110950965 A (重庆精准生物技术有限公司) 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03) 权利要求1-11</td> <td>4, 5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106103490 A (塞勒克提斯公司) 2016年11月9日 (2016 - 11 - 09) 权利要求1-35</td> <td>4, 5</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 112646033 A (北京艺妙神州医药科技有限公司 山东金赛生物科技有限公司) 2021年4月13日 (2021 - 04 - 13) 权利要求1-10	1-10	X	WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 2019年12月19日 (2019 - 12 - 19) 权利要求1-20, 说明书第6页第2段, 实施例4	1-3, 6-10	Y	WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 2019年12月19日 (2019 - 12 - 19) 权利要求1-20, 说明书第6页第2段, 实施例4	4, 5	Y	CN 112079927 A (西安桑尼赛尔生物医药有限公司) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 权利要求1-16	4, 5	Y	CN 110950965 A (重庆精准生物技术有限公司) 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03) 权利要求1-11	4, 5	Y	CN 106103490 A (塞勒克提斯公司) 2016年11月9日 (2016 - 11 - 09) 权利要求1-35	4, 5
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 112646033 A (北京艺妙神州医药科技有限公司 山东金赛生物科技有限公司) 2021年4月13日 (2021 - 04 - 13) 权利要求1-10	1-10																					
X	WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 2019年12月19日 (2019 - 12 - 19) 权利要求1-20, 说明书第6页第2段, 实施例4	1-3, 6-10																					
Y	WO 2019237350 A1 (KYINNO BIOTECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 2019年12月19日 (2019 - 12 - 19) 权利要求1-20, 说明书第6页第2段, 实施例4	4, 5																					
Y	CN 112079927 A (西安桑尼赛尔生物医药有限公司) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 权利要求1-16	4, 5																					
Y	CN 110950965 A (重庆精准生物技术有限公司) 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03) 权利要求1-11	4, 5																					
Y	CN 106103490 A (塞勒克提斯公司) 2016年11月9日 (2016 - 11 - 09) 权利要求1-35	4, 5																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																							
国际检索实际完成的日期 2022年1月19日		国际检索报告邮寄日期 2022年2月7日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 杨振宇 电话号码 86-(10)-62412204																					

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/127505

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 111349163 A（北京智仁美博生物科技有限公司 智翔上海医药科技有限公司）2020年6月30日（2020 - 06 - 30） 权利要求1-10	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第III栏

缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 发明1：权利要求1-10（部分），涉及一种特异性结合CD123的抗体，其包括包含如SEQ ID NO：8所示的VH-CDR1、如SEQ ID NO：14所示的VH-CDR2和如SEQ ID NO：20所示的VH-CDR3的重链可变结构域；和包含如SEQ ID NO：26所示的VL-CDR1、如SEQ ID NO：32所示的VL-CDR2和如SEQ ID NO：38所示的VL-CDR3的轻链可变结构域；相关的靶向CD123的嵌合抗原受体，核酸分子，载体，细胞，药物组合物和用途；
- [2] 发明2：权利要求1-10（部分），涉及一种特异性结合CD123的抗体，其包括包含如SEQ ID NO：9所示的VH-CDR1、如SEQ ID NO：15所示的VH-CDR2和如SEQ ID NO：21所示的VH-CDR3的重链可变结构域；和包含如SEQ ID NO：27所示的VL-CDR1、如SEQ ID NO：33所示的VL-CDR2和如SEQ ID NO：39所示的VL-CDR3的轻链可变结构域；相关的靶向CD123的嵌合抗原受体，核酸分子，载体，细胞，药物组合物和用途；
- [3] 发明3：权利要求1-10（部分），涉及一种特异性结合CD123的抗体，其包括包含如SEQ ID NO：10所示的VH-CDR1、如SEQ ID NO：16所示的VH-CDR2和如SEQ ID NO：22所示的VH-CDR3的重链可变结构域；和包含如SEQ ID NO：28所示的VL-CDR1、如SEQ ID NO：34所示的VL-CDR2和如SEQ ID NO：40所示的VL-CDR3的轻链可变结构域；相关的靶向CD123的嵌合抗原受体，核酸分子，载体，细胞，药物组合物和用途；
- [4] 发明4：权利要求1-10（部分），涉及一种特异性结合CD123的抗体，其包括包含如SEQ ID NO：11所示的VH-CDR1、如SEQ ID NO：17所示的VH-CDR2和如SEQ ID NO：23所示的VH-CDR3的重链可变结构域；和包含如SEQ ID NO：29所示的VL-CDR1、如SEQ ID NO：35所示的VL-CDR2和如SEQ ID NO：41所示的VL-CDR3的轻链可变结构域；相关的靶向CD123的嵌合抗原受体，核酸分子，载体，细胞，药物组合物和用途；
- [5] 发明5：权利要求1-10（部分），涉及一种特异性结合CD123的抗体，其包括包含如SEQ ID NO：12所示的VH-CDR1、如SEQ ID NO：18所示的VH-CDR2和如SEQ ID NO：24所示的VH-CDR3的重链可变结构域；和包含如SEQ ID NO：30所示的VL-CDR1、如SEQ ID NO：36所示的VL-CDR2和如SEQ ID NO：42所示的VL-CDR3的轻链可变结构域；相关的靶向CD123的嵌合抗原受体，核酸分子，载体，细胞，药物组合物和用途；
- [6] 由于本领域公知抗体的结合特异性和相关活性由轻链和重链的六个CDR共同决定，因而通常认为六个CDR的组合是决定抗体性能的最小单位，即，轻链和重链的六个CDR的组合构成了抗体的具有重要意义结构单元。虽然上述5项发明的轻链和重链CDR之间的少量位置上具有共同的氨基酸残基，但这几个共同氨基酸残基并不足以决定抗体的结合特异性，从而不能构成具有重要意义结构单元。这5项发明的相同或相应的技术特征为“抗CD123抗体”，这一技术特征已被现有技术公开（参见，例如，CN112 079927A(15.12.2020)，其公开了包括重链可变区和轻链可变区的CD123结合蛋白以及含有该结合蛋白的嵌合抗原受体）。因此发明1-5之间相同或相应的技术特征没有对现有技术作出贡献，不能被认为是PCT细则13.2意义上的特定技术特征。因此，本申请不满足PCT细则13.1中规定的发明单一性的要求。

第III栏

缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1. ☒ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☒ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/127505

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112646033	A	2021年4月13日	无			
WO	2019237350	A1	2019年12月19日	CN	111542537	A	2020年8月14日
CN	112079927	A	2020年12月15日	无			
CN	110950965	A	2020年4月3日	无			
CN	106103490	A	2016年11月9日	US	2017183413	A1	2017年6月29日
				ES	2740903	T3	2020年2月7日
				RU	2016140855	A	2018年4月20日
				WO	2015140268	A1	2015年9月24日
				RU	2727290	C2	2020年7月21日
				MX	370272	B	2019年12月9日
				EP	3569619	A1	2019年11月20日
				KR	20170002389	A	2017年1月6日
				US	10988541	B2	2021年4月27日
				PT	3119807	T	2019年9月4日
				MX	2019012244	A	2019年12月19日
				US	2019002573	A1	2019年1月3日
				CN	106103490	B	2020年3月3日
				DK	3569619	T3	2021年6月14日
				CA	2943008	A1	2015年9月24日
				PL	3119807	T3	2019年9月30日
				US	2021163612	A1	2021年6月3日
				TR	201910814	T4	2019年8月21日
				DK	3119807	T3	2019年7月15日
				BR	112016019643	A2	2017年10月24日
				EP	3119807	B1	2019年4月24日
				AU	2015233461	A1	2016年8月25日
				IL	247172	D0	2016年9月29日
				HU	E045480	T2	2019年12月30日
				MX	2016011240	A	2017年1月11日
				JP	2017509342	A	2017年4月6日
				KR	102157411	B1	2020年9月18日
				AU	2015233461	B2	2020年3月19日
				EP	3569619	B1	2021年5月26日
				RU	2016140855	A3	2018年11月16日
				US	9944709	B2	2018年4月17日
				EP	3119807	A1	2017年1月25日
				JP	6689202	B2	2020年4月28日
				JP	2020156482	A	2020年10月1日
				CA	2943008	C	2021年3月30日
CN	111349163	A	2020年6月30日	CN	111171155	B	2021年2月19日
				CN	111171155	A	2020年5月19日