



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113735973 A

(43) 申请公布日 2021. 12. 03

(21) 申请号 202010471993.6

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.28

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 中国科学院微生物研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院3号

(72) 发明人 严景华 毕晓珊 史瑞 谭曙光 高福

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 高丽娜 张莹

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G12P 21/02 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

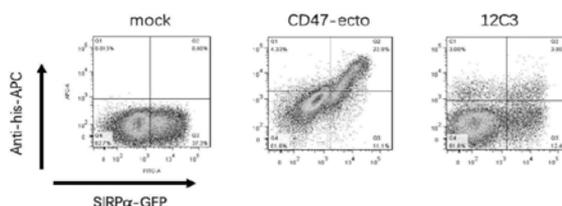
权利要求书2页 说明书12页
序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

一种抗SIRP α 抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段特异性识别SIRP α ,利用抗体特异性阻断CD47与SIRP α 的相互作用,能够活化处于抑制状态的TAMs,使得TAMs的免疫杀伤功能得到释放,恢复TAMs的功能,从而达到利用机体免疫系统杀伤肿瘤细胞进而进行肿瘤治疗的作用。



1. 抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的重链CDR;以及SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的轻链CDR。

2. 根据权利要求1所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:1,或与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的重链可变区和SEQ ID NO:2,或与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的轻链可变区;或包含SEQ ID NO:9,或与SEQ ID NO:9所示的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的重链可变区和SEQ ID NO:10,或与SEQ ID NO:10所示的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的轻链可变区。

3. 根据权利要求1或2所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗SIRP α 抗体包含SEQ ID NO:11所示的重链和SEQ ID NO:12所示的轻链。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗SIRP α 抗体为鼠源或人源化抗SIRP α 单克隆抗体,其中所述人源化抗SIRP α 单克隆抗体包含SIRP α 人Fc区,更优选包含人IgG4的Fc区。

5. 根据权利要求1或2所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、双抗体和包含CDR的肽。

6. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1-5中任一项所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

7. 多肽,其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的重链可变区。

8. 多肽,其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的轻链可变区。

9. 多肽,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的重链可变区。

10. 多肽,其包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的轻链可变区。

11. 分离的多核苷酸,其编码权利要求7所述的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:15所示的序列。

12. 分离的多核苷酸,其编码权利要求8所述的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:16所示的序列。

13. 分离的多核苷酸,其编码权利要求9所述的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:13所示的序列。

14. 分离的多核苷酸,其编码权利要求10所述的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:14所示的序列。

15. 表达载体,其包含权利要求11-14中任一项所述的分离的多核苷酸。

16. 宿主细胞,其包含权利要求11-14中任一项所述的分离的多核苷酸或权利要求15所述的表达载体。

17. 制备抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括培养权利要求16所述的宿主细胞以表达所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

18. 组合物或缀合物,其含有权利要求1-5中任一项所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,优选地,所述缀合物进一步包含直接或通过间隔物与所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段缀合的另外的分子,优选所述另外的分子选自放射性同位素或放射性核素、毒素或细胞毒性基团,标记基团,所述标记基团优选荧光基团、酶基团、化学发光基团、生物素基团、金属颗粒。

19. 权利要求1-5中任一项所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段在制备用于提高巨噬细胞杀伤水平的药物中的用途,优选地,所述药物用于治疗肿瘤,优选用于治疗癌症,优选地,所述癌症包括血液肿瘤和实体肿瘤,优选地,所述癌症为淋巴瘤。

一种抗SIRP α 抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段特异性识别信号调节蛋白 α (SIRP α),能够作为免疫活化物刺激机体的免疫反应,从而产生抗肿瘤等疾病的效果。

背景技术

[0002] 肿瘤是全球第二大导致人类死亡的病因。无论在发达国家还是在发展中国家,肿瘤导致的癌症都是死亡率最高的疾病,并且其死亡率和发病率仍不断增高。全球癌症疾病报告显示:过去十年里,全球癌症发病率升高了33%。仅2015年,就有1520万人被诊断为癌症,并有880万人因此死亡;发展中国家的癌症死亡率高于发达国家,患病人数占到全球的57%,死亡人数高达全球的65%,因此抗肿瘤药物市场的潜力十分巨大。

[0003] 免疫疗法已经成为目前治疗肿瘤的重要手段之一,根据不同机理疗法应用的时间先后排序,主要包括非特异性免疫刺激、免疫检验点单抗、过继细胞回输、单克隆T细胞受体疗法、肿瘤疫苗等。

[0004] 在20世纪80年代早期,Allison及其他研究者确定了在T细胞表面负责识别抗原的 $\alpha\beta$ T细胞受体(TCR)的基因结构。80年代后期,Boone、Rosenberg、Old等人研究分别发现,不同肿瘤病人体内均存在一些肿瘤特异性抗原,能够被T细胞所识别并特异性杀伤肿瘤细胞,使得肿瘤免疫治疗的希望重新燃起,大量研究致力于肿瘤治疗性疫苗的研究和开发。然而, Schwartz等人研究发现,仅有TCR信号并不足以激活抗原特异性T细胞,T细胞的激活还需要其他分子的参与,也就是所谓第二信号“共刺激分子”的协同作用。同时研究发现,只有特定的抗原递呈细胞(APCs)才能够表达共刺激分子,而大多数细胞,包括肿瘤细胞,并不能够提供共刺激分子信号。在20世纪90年代早期,Allison等发现了CD28分子,能够提供T细胞激活所需要的第二信号。之后Linsle等人研究发现表达在APCs细胞表面的B7分子是CD28分子的配体,而Allison等通过小鼠模型研究,经过改造后能够表达B7分子的肿瘤细胞能够被小鼠免疫系统迅速清除。因此,肿瘤细胞B7分子表达的缺失可能是机体不能够有效激发T细胞免疫的重要因素。

[0005] 在20世纪90年代的研究均表明,细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4,CTLA-4)在体内发挥着与CD28完全相反的功能,如果把CD28这一类分子比作是一部汽车的“油门”,那么CTLA-4这一类分子发挥的是“刹车”的功能。当机体T细胞活化之后,这类分子会“检查”免疫细胞激活程度,在激活的细胞中表达上调并发挥免疫抑制功能,从而使得机体的T细胞不至于过度增殖和活化而损伤正常细胞,因此这类分子又被称为“免疫检查点”分子。癌细胞利用这类分子的免疫抑制机制,逃避机体的免疫系统杀伤。研究表明,利用CTLA-4特异性单克隆抗体来阻断CTLA-4的信号,能够显著提高T细胞活性,并且在多种肿瘤的小鼠模型研究中发现,单克隆抗体阻断CTLA-4后能够大大提高小鼠对肿瘤的抑制能力。除了CTLA-4之外,免疫检查点分子还包括PD-1、PD-L1、TIM-3、LAG-3、TIGIT等B7超家族和CD28超家族分子。通过特异性单克隆抗体阻断这些“抑制”信

号,能够重新释放T细胞的活性,从而使得这些T细胞能够发挥抗肿瘤作用。肿瘤免疫检查点疗法对抗肿瘤策略的贡献在于:一方面,免疫检查点疗法并不直接靶向肿瘤细胞,而是作用于病人的免疫系统,通过解除限制T细胞发挥功能的信号从而释放T细胞活性;另一方面,这种对T细胞的激活并不具有抗原特异性,而是对整个免疫系统的重新激活,因此能够适用于多种不同肿瘤的治疗,可以作为肿瘤的通用疗法。不仅如此,CTLA-4抗体阻断疗法的成功,开创了免疫抑制相关分子阻断在肿瘤治疗中的开发和应用,基于PD-1和PD-L1等为代表的免疫抑制分子开发的阻断性抗体同样取得了重大突破,到2017年底,美国FDA批准了两项PD-1阻断性抗体,nivolumab和pembrolizumab,三项PD-L1抗体,avelumab,durvalumab和atezolizumab,已经在包括黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤及非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤中广泛应用。

[0006] 人体内的健康细胞都会携带一种蛋白-CD47,CD47作为“别吃我”信号,它通过与巨噬细胞表面的SIRP α 相互结合发挥作用。当CD47与SIRP α 结合后,其胞内ITIM发生磷酸化后发生聚集反应,被与其自身相连的细胞溶质性蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP)激活,SHP通过近端底物的去磷酸化,裂解免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的磷酸基团,抑制吞噬信号和肌球蛋白轻链的骨架重排,进而导致吞噬细胞失去吞噬功能。

[0007] 几乎所有肿瘤细胞都具有通过提高自身CD47蛋白表达,不但使其周围多种免疫细胞正常免疫杀伤功能受到抑制,而且表现出促进肿瘤组织扩增和转移的特性,这种特性能够导致患者病情进一步恶化。相关研究表明,肿瘤细胞表面CD47主要与巨噬细胞表面SIRP α 结合,发出“别吃我”信号,从而抑制巨噬细胞正常吞噬功能。通过阻断肿瘤细胞CD47-SIRP α 相关的信号通路,能够解除肿瘤细胞对巨噬细胞的抑制作用,从而激活肿瘤微环境中巨噬细胞的杀伤功能,杀伤肿瘤细胞;活化的巨噬细胞通过吞噬靶细胞,发挥其抗原提呈的功能,特异性的活化T细胞,通过活化的T细胞发挥的细胞毒作用,进一步杀伤肿瘤细胞。

[0008] 利用抗体结合细胞表面蛋白靶点治疗多种肿瘤和类风湿等免疫疾病已取得显著的效果;截至目前,经FDA批准上市的相关药物已超过60种。现有抗CTLA-4及PD-1/PD-L1抗体药物的临床有效率仍相对有限,在非霍奇金淋巴瘤中可以达到80%以上有效率,但对于非肺癌、头颈癌等多种肿瘤有效率仅有20-40%,开发其他免疫相关靶点的抗体药物对于提高肿瘤细胞免疫治疗的应用范围,提高免疫治疗响应率具有重要意义。

发明内容

[0009] 本发明的一个方面提供抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的重链CDR;以及SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示的轻链CDR,所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段阻断CD47与SIRP α 的结合。

[0010] 在本发明的一些实施方案中,所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:1,或与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的重链可变区和SEQ ID NO:2,或与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的轻链可变区;或包含SEQ ID NO:9,或与SEQ ID NO:9所示的序列

具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的重链可变区和SEQ ID NO:10,或与SEQ ID NO:10所示的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列的轻链可变区。

[0011] 在本发明的一些实施方案中,所述抗SIRP α 抗体包含SEQ ID NO:11所示的重链和SEQ ID NO:12所示的轻链。

[0012] 在本发明的一些实施方案中,所述抗SIRP α 抗体为鼠源或人源化抗SIRP α 单克隆抗体,其中所述人源化抗SIRP α 单克隆抗体包含SIRP α 人Fc区,更优选包含人IgG4的Fc区。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、双抗体和包含CDR的肽。

[0014] 本发明的另一个方面提供分离的多核苷酸,其编码所述的抗SIRP α 抗体或其抗原片段。

[0015] 本发明的另一个方面提供多肽,其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的重链可变区。

[0016] 在本发明的一些优选的实施方案中,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0017] 本发明的另一个方面提供多肽,其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的轻链可变区。

[0018] 在本发明的一些优选的实施方案中,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0019] 本发明的另一个方面提供多肽,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的重链可变区。

[0020] 在本发明的一些优选的实施方案中,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0021] 本发明的另一个方面提供多肽,其包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,其中所述多肽组成特异性结合SIRP α 的抗体的轻链可变区。

[0022] 在本发明的一些优选的实施方案中,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0023] 本发明的另一个方面提供分离的多核苷酸,其编码包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:15所示的序列。

[0024] 本发明的另一个方面提供分离的多核苷酸,其编码包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:16所示的序列。

[0025] 本发明的另一个方面提供分离的多核苷酸,其编码包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:13所示的序列。

[0026] 本发明的另一个方面提供分离的多核苷酸,其编码包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的多肽,优选地所述分离的多核苷酸包含如SEQ ID NO:14所示的序列。

[0027] 本发明的另一个方面提供表达载体,其包含上述的分离的多核苷酸。

[0028] 本发明的另一个方面提供宿主细胞,其包含上述的分离的多核苷酸或所述的表达载体。

[0029] 本发明的另一个方面提供制备抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括培养所述的宿主细胞以表达所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

[0030] 本发明的另一个方面提供组合物或缀合物,其含有所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段,优选地,所述缀合物进一步包含直接或通过间隔物与所述抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段缀合的另外的分子,优选所述另外的分子选自放射性同位素或放射性核素、毒素或细胞毒性基团,标记基团,所述标记基团优选荧光基团、酶基团、化学发光基团、生物素基团、金属颗粒。

[0031] 本发明的另一个方面提供所述的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段在制备用于提高巨噬细胞杀伤水平的药物中的用途,优选地,所述药物用于治疗肿瘤,优选用于治疗癌症,优选地,所述癌症包括血液肿瘤和实体肿瘤,优选地,所述癌症为淋巴瘤。

[0032] 利用抗SIRP α 单克隆抗体,在体内特异性结合巨噬细胞表面表达的SIRP α 蛋白,能够有效解除肿瘤细胞对巨噬细胞的抑制作用,重新恢复机体免疫细胞功能,达到抑制肿瘤生长的效果。

[0033] 本发明的原理:利用重组技术表达SIRP α 蛋白抗原,将抗原免疫小鼠,经筛选后获得能够结合SIRP α 蛋白的杂交瘤细胞株;进而利用基因工程技术,获取杂交瘤细胞中抗体的可变区基因序列,构建能够表达上述抗体可变区和人源抗体恒定区蛋白的重组表达载体质粒;利用真核细胞表达系统制备抗体蛋白,确认抗体的质量后,进行一系列体内和体外实验,从中进一步筛选出具有结合SIRP α 蛋白功能和能够阻断SIRP α 蛋白的功能性单克隆抗体;通过鼠源抗体人源化技术,制备人源化SIRP α 阻断抗体,并重新验证其生物学功能,最终获得具有通过阻断CD47/SIRP α 相互作用,来发挥抑制肿瘤生长的治疗性抗体。

[0034] 本发明最终获得1株能够在体内和体外阻断SIRP α 蛋白的人源化抗体;通过这株抗体阻断SIRP α 蛋白进而能够有效激活免疫细胞,达到杀伤肿瘤细胞的效果。

[0035] 本发明提供的抗SIRP α 抗体或其抗原片段能够特异性结合SIRP α 分子,结合之后能够阻断CD47与SIRP α 的结合,并能够产生一系列生物学效应。这些生物学效应包括:能够激活肿瘤病例肿瘤浸润的巨噬细胞吞噬能力,特别是能够抑制小鼠体内肿瘤生长。

[0036] CD47作为“别吃我”信号,它通过与巨噬细胞表面的SIRP α 相互结合抑制巨噬细胞的吞噬作用。因为CD47-SIRP α 信号通路的存在,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)失去识别肿瘤细胞的功能,这一信号通路又被称为髓样细胞免疫检查点通路。当CD47与SIRP α 结合后,其胞内免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)发生磷酸化后发生聚集反应,被与其自身相连的细胞溶质性蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP)激活,SHP通过近端底物的去磷酸化,裂解免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的磷酸基团,抑制吞噬信号和肌球蛋白轻链的骨架重排,进而导致吞噬细胞失去吞噬功能。肿瘤利用上述机制,细胞通过高表达CD47逃避巨噬细胞对其进行攻击。

[0037] 而利用抗体特异性阻断CD47与SIRP α 的相互作用,能够活化处于抑制状态的TAMs,使得TAMs的免疫杀伤功能得到释放,恢复TAMs的功能,从而达到利用机体免疫系统杀伤肿瘤细胞进而进行肿瘤治疗的作用。

[0038] 本发明基于上述原理,发现的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段通过与SIRP α 分子特异结合,阻断CD47与SIRP α 的结合,从而使巨噬细胞活化,杀伤肿瘤细胞。

[0039] 本发明中,抗SIRP α 抗体包括与SIRP α 特异性结合的抗体或衍生物,也包括与原来的抗体显示实质上相同的抗原特异性的抗原结合片段。“抗原结合片段”是指抗体的抗原结合片段及抗体类似物,其通常包括至少部分母体抗体的抗原结合区或可变区,例如一个或多个CDR。抗原结合片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。抗原结合片段包括选自Fab、

Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、双抗体、包含CDR的肽等。

[0040] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1及可变区组成。

[0041] “Fc”区含有包含抗体的CH2和CH3结构域的两个重链片段。两个重链片段由两个或多个二硫键并通过CH3结构域的疏水作用保持在一起。

[0042] “Fab'片段”含有一条轻链和包含VH结构域和CH1结构域以及CHI和CH2结构域之间区域的一条重链的部分，两个Fab'片段的二条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab')₂分子。

[0043] “F(ab')₂片段”含有二条轻链和二条包含CH1和CH2结构域之间的恒定区的部分的重链，由此在二条重链间形成链间二硫键。因此，F(ab')₂片段由通过二条重链间的二硫键保持在一起的二个Fab'片段组成。

[0044] “Fv区”包含来自重链和轻链二者的可变区，但缺少恒定区。

[0045] “单链Fv抗体(scFv抗体)”是指包含抗体的VH和VL结构域的抗原结合片段，这些结构域存在于单个多肽链中。一般而言，Fv多肽另外在VH和VL结构域之间包含多肽接头，该接头使得scFv能形成用于抗原结合的所需结构。

[0046] “双特异性抗体”为具有二个抗原结合位点的小抗原结合片段。所述片段包含在相同的多肽链中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)(VH-VL或VL-VH)。通过使用短至不能在同一链的二个结构域之间配对的接头，使得所述结构域与另一条链的互补结构域配对并形成二个抗原结合位点。

[0047] 非人类(例如鼠)抗体的“人源化”形式为含有最小限度的来源于非人类免疫球蛋白序列的嵌合抗体。人源化抗体的大部分为人免疫球蛋白，其中受体抗体的高变区残基被具有所需特异性、亲和力和能力的非人类物种高变区的残基置换，非人类物种例如有小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类。在某些情况下，人免疫球蛋白的Fv构架区残基被相应的非人类残基取代。此外，人源化抗体可包含不在受体抗体或供体抗体中存在的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能。

[0048] 当提及配体/受体、抗体/抗原或其它结合对时，“特异性”结合是指在蛋白和/或其它生物试剂的异质群体中确定是否存在所述蛋白例如CD47的结合反应。因此，在所指定的条件下，特定的配体/抗原与特定的受体/抗体结合，并且并不以显著量与样品中存在的其它蛋白结合。

[0049] 本发明还提供含有本发明抗SIRPα抗体或其抗原结合片段的药物组合物。为了制备药物组合物，可以通过使抗体或其抗原结合片段与可药用载体或赋形剂混合，制备成各种所需的剂型。作为本发明的医药组合物的剂型的种类，例如可以列举作为口服剂的片剂、粉末剂、丸剂、散剂、颗粒剂、细粒剂、软/硬胶囊剂、薄膜包衣剂、小丸剂、舌下片、膏剂等，作为非口服剂，可以列举注射剂、栓剂、经皮剂、软膏剂、硬膏剂、外用液剂等，本领域的技术人员能够根据给药途径和给药对象等选择适当的剂型。

[0050] 本发明的药物组合物的有效成分的给药量，根据给药对象、对象脏器、症状、给药方法等不同而存在差异，可以考虑剂型的种类、给药方法、患者的年龄和体重、患者的症状等，根据医生的判断来确定。

[0051] 本发明药物组合物还可以含有其它药剂，包括但不限于细胞毒剂、细胞生长抑制剂、抗血管形成药物或抗代谢药物、靶向肿瘤药物、免疫刺激剂或免疫调节剂或与细胞毒

剂、细胞生长抑制剂或其它毒性药物结合的抗体。

附图说明

[0052] 下面将结合附图来说明本发明。

[0053] 图1是表示SIRP α -ecto蛋白纯度检测结果SDS-PAGE的图；

[0054] 图2是表示SIRP α -ecto蛋白分子筛纯化结果的图；

[0055] 图3是表示12C3抗体阻断实验的流式细胞图；

[0056] 图4是表示人源化12C3抗体蛋白纯度检测结果SDS-PAGE的图；

[0057] 图5是表示人源化12C3抗体蛋白分子筛纯化结果的图；

[0058] 图6是表示人源化12C3抗体SPR表面等离子共振检测亲和力的结果图；

[0059] 图7是表示人源化12C3抗体体外活化小鼠巨噬细胞吞噬Raji细胞的结果图；

[0060] 图8是表示人源化12C3抗体体外活化小鼠巨噬细胞吞噬的量化图；

[0061] 图9是表示KWAR23抗体蛋白分子筛纯化结果的图；

[0062] 图10是表示人源化12C3抗体在人源化小鼠体内抑制Raji细胞生长活体成像的图；

[0063] 图11是表示人源化12C3抗体在人源化小鼠体内抑制Raji细胞生长活体成像检测数据的图。

具体实施方式

[0064] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应当理解，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。实验所用到的试剂，如无特殊说明，均可试剂公司购买到。

[0065] 实施例1. SIRP α 阻断抗体筛选

[0066] 1. SIRP α -ecto重组表达质粒的构建

[0067] 以GenBank NM_001040022.1 361bp-808bp提供的序列为模板基因合成人SIRP α 胞外区Ig样V型结构域(Ig-like V type domain)编码DNA序列并且在3'端添加6×HIS标签序列，通过5'端HindIII和3'端BamHI双酶切位点克隆入表达载体pCAGGS(ADDGENE公司)，建立SIRP α 胞外Ig样V型结构域蛋白的重组真核表达质粒，即SIRP α -ecto重组质粒DNA。

[0068] 上游引物：CGGAATTCGCCGCCACCATGGAGCCC GCCGG，如SEQ ID NO:21所示；

[0069] 下游引物：CCGCTCGAGTTAGTGGTGATGGTGGTATGAGAGGGTTGGCGCG，如SEQ ID NO:22所示。

[0070] 2. SIRP α -ecto重组蛋白的表达与纯化

[0071] 1) 转染HEK293T细胞(ATCC:CRL-11268)：HEK293T细胞以1:3传至培养皿中继续培养；取7.5mL DMEM(GIBCO:11995500BT，无血清及抗生素)至50mL管中，加入300 μ L聚醚酰亚胺(PEI)(POLYCIENCE:23966)混匀；加入40 μ g SIRP α -ecto重组质粒DNA至混匀液中，混匀并静置30分钟；分别取515 μ L至各培养皿中于37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养。转染6小时后，更换无血清DMEM培养基；

[0072] 2) 收获上清：转染72小时后，收集细胞培养上清，4 $^{\circ}$ C离心，过滤；

[0073] 3) HisTrap亲和层析柱纯化：将上清以1mL/min速度上样HisTrap亲和层析柱，完成上样后，用5个柱体积的20mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH8.0平衡液冲洗层析柱；用5个柱体积的20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0-500mM咪唑pH8.0洗脱液冲洗层析柱，收集洗脱峰。纯化

后的SIRP α -ecto蛋白用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定,结果如图1所示。将HisTrap纯化后SIRP α -ecto蛋白进行分子筛纯化,结果如图2所示。

[0074] 3. 抗SIRP α 单克隆抗体的制备与筛选

[0075] 将上述纯化的SIRP α -ecto重组蛋白(以下简称为SIRP α 抗原)用于BALB/C小鼠(南京金斯瑞生物科技有限公司)免疫。具体方法如下:

[0076] 1) 动物免疫:经过纯化的SIRP α 抗原以完全弗氏佐剂乳化,采用皮下或腹腔注射方法免疫6-8周龄BALB/C小鼠,免疫剂量为50 μ g/只,间隔两周后进行第二次免疫,以不完全弗氏佐剂乳化,免疫剂量为50 μ g/只。免疫两次后取尾血以ELISA法梯度稀释测定血清效价;根据结果确定是否加强免疫,选取抗体效价最高的小鼠进行细胞融合;

[0077] 2) 细胞融合:骨髓瘤细胞采用BALB/C来源的sp2/0,融合时处于对数生长期;取已免疫小鼠脾脏,制成淋巴细胞单细胞悬液;小鼠脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞以1:5-1:10混合,滴加37 $^{\circ}$ C的50%PEG(pH8.0)1mL,加入不完全培养基CD Hybridoma(Gibco),离心弃上清后加入HAT培养基悬浮混匀,定容到50mL,分装到3.5cm培养皿中,放于湿盒中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温培养箱中进行培养;

[0078] 3) 筛选和克隆:融合7-10天内挑选细胞克隆,使用纯化的SIRP α -ecto重组蛋白进行ELISA测试,用pH7.4磷酸盐缓冲液4 $^{\circ}$ C过夜包被每孔100ngSIRP α -ecto重组蛋白,弃去包被液后用含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液洗ELISA板5次,每孔加入细胞克隆培养上清100 μ L,室温孵育1小时,弃去上清后用含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液洗ELISA板5次,每孔加入1:3000稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG抗体(中杉金桥)100 μ L,室温孵育1小时,弃去二抗后用含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液洗ELISA板5次,每孔加入50 μ L ELISA显色液(天根)显色15分钟,每孔加入50 μ L 2M H₂SO₄终止反应,酶标仪读取OD 450数值。标记阳性细胞株号。对阳性孔细胞进行有限稀释,每次有限稀释后5-6天测定ELISA值,挑取OD280阳性值较高的单克隆孔进行有限稀释,直至ELISA测定96孔板全板结果为阳性。挑取阳性值高的单克隆株,命名为细胞株12C3。

[0079] 4. 鼠源抗体的表达纯化

[0080] 将细胞株12C3用含15%血清的DMEM培养基培养于10cm培养皿中培养,扩培至约4 \times 10⁷个时,800rpm/min离心5min,弃上清并将细胞转移到2L转瓶中,加入无血清培养基,使细胞密度约为3 \times 10⁵个/mL。继续培养1-2周后,当细胞死亡率达到60%-70%时(此时细胞密度大概为1-2 \times 10⁶个/mL),收取细胞悬液6000rpm/min高速离心20min,取上清,针对细胞株12C3分泌出来的单克隆抗体(命名为12C3抗体)用亲和层析法进行上清纯化,根据单克隆抗体亚型选择相应柱料,2C3抗体的亚型为IgG1,采用Protein G进行纯化。纯化后的2C3抗体进行浓度测定,分装(100 μ L/管,浓度为1mg/mL),保存在4-8 $^{\circ}$ C。

[0081] 5. SIRP α 阻断单克隆抗体筛选

[0082] 将获得的单克隆抗体进行CD47与SIRP α 的阻断实验,以筛选能够特异性阻断CD47与SIRP α 相互作用的抗体。

[0083] 1) SIRP α 全长表达293T细胞制备

[0084] 在本实施例中,通过将SIRP α 全长(NM_001040022.1 361bp-1872bp)全基因合成到pEGFP-N1载体-GFP标签质粒(CLONTECH公司),获得带有GFP标签的SIRP α 质粒(SIRP α -GFP-p),并转染293T细胞(ATCC:CRL-11268),获得表达SIRP α 全长的293T细胞。转染前1天按照

0.5~2×10⁵细胞每孔接种于24孔培养板,并加入500μL不含抗生素的DMEM完全培养基(GIBCO公司),以保证转染时细胞汇合达70~80%。4μgSIRPα-GFP-p质粒稀释于50μL不含血清和抗生素的培养基中,轻轻混匀。将12μLPEI(1mg/mL)稀释于50μL不含血清和抗生素的培养基中,轻轻混匀。5分钟后,将50μL PEI稀释液滴加到50μL DNA稀释液中,轻轻混匀,室温孵育20分钟。将100μL PEI/DNA复合物滴加到每孔中并轻轻摇动使其与新鲜的培养基均匀混合。将细胞放入培养箱孵育4~6h后,更换含血清培养液去除复合物。将细胞放置在37℃,CO₂孵箱继续孵育24小时后,通过流式细胞分析仪(BD CALIBUR)检测GFP表达水平,评价SIRPα全长表达293T细胞的表达水平。

[0085] 2) 抗体阻断实验

[0086] 将12C3抗体以30μg/mL100μL体系加入到含2×10⁵的表达SIRPα全长的293T细胞中,置冰上孵育30分钟。之后PBS洗1次,加5μg/mL 50μL体系CD47-ecto抗原(制备过程参见CN 109265547A),置冰上孵育30分钟。之后PBS洗1次,加APC-anti-his(Biolegend)二抗室温孵育30分钟,之后PBS洗3次。设置小鼠无关同型IgG(中国科学院微生物研究所)抗体为阴性对照;最终用300mL PBS溶液重悬后进行流式细胞分析。结果如图3所示,结果表明,CD47-ecto能够显著结合到SIRPα全长表达的293T细胞上,而加入12C3抗体后能够抑制CD47与SIRPα的结合,从而使得CD47-ecto不能结合到293T细胞表面的SIRPα蛋白上。由此确定,12C3抗体能够在细胞水平显著抑制CD47与SIRPα的结合。

[0087] 实施例2.人源化12C3抗体表达和亲和力验证

[0088] 1.人源化12C3抗体表达纯化

[0089] 根据12C3抗体的序列同源性,在保留抗体轻链和重链两条链的CDR区基础之上,通过替换人源抗体骨架,获得人源化12C3抗体(h12C3)。

[0090] SEQ ID NO:1:12C3鼠源抗体VH链

[0091] SEQ ID NO:2:12C3鼠源抗体的VL链

[0092] SEQ ID NO:3:12C3 H链CDR1

[0093] SEQ ID NO:4:12C3 H链CDR2

[0094] SEQ ID NO:5:12C3 H链CDR3

[0095] SEQ ID NO:6:12C3 L链CDR1

[0096] SEQ ID NO:7:12C3 L链CDR2

[0097] SEQ ID NO:8:12C3 L链CDR3

[0098] SEQ ID NO:9:人源化12C3抗体的VH链

[0099] SEQ ID NO:10:人源化12C3抗体的VL链

[0100] SEQ ID NO:11:人源化12C3抗体的重链

[0101] SEQ ID NO:12:人源化12C3抗体的轻链

[0102] SEQ ID NO:13:鼠源12C3抗体的VH的编码序列

[0103] SEQ ID NO:14:鼠源12C3抗体的VL的编码序列

[0104] SEQ ID NO:15:人源化12C3抗体的VH的编码序列

[0105] SEQ ID NO:16:人源化12C3抗体的VL的编码序列

[0106] 人源化12C3抗体编码序列通过全基因合成方式(金斯瑞)获得,在重链和轻链的5'端和3'端添加同源臂序列,通过同源重组方法将人源化抗体编码区序列克隆入pCAGGS表达

载体(ADGENE公司),利用构建编码SEQ ID NO:11的多肽(编码其的多核苷酸为SEQ ID NO:17)和编码SEQ ID NO:12的多肽(编码其的多核苷酸为SEQ ID NO:18)的多核苷酸的pCAGGS表达载体共同转染293T细胞(重链上游引物:GTTTTGCTGCTGTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAAGTGCAACTGCAA,如SEQ ID NO:23所示,重链下游引物:GCCCTTGGTGCTAGCGCTGGACACGGTC,如SEQ ID NO:24所示;轻链上游引物:GTTTTGCTGCTGTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGACATCGTGTGACC,如SEQ ID NO:25所示,轻链下游引物:ATGGTGCAGCCACCGTACGCTTGATCTCCAGC,如SEQ ID NO:26所示),表达的抗体经ProteinA(GE公司)亲和柱层析纯化。

[0107] 具体包括:

[0108] 1) 在转染前的14-16h将细胞密度较大的细胞分盘(如一盘100%铺满细胞的10cm培养皿以1:4进行传代),14-16h后,细胞密度达到70%上即可进行转染;

[0109] 2) 以10cm培养皿转染贴壁293T细胞为例:转染所需的质粒的量为40 μ g/盘(轻链:重链=3:2,质量比),稀释到100 μ L/盘的HBS液中,混匀后静置;以PEI(μ L):质粒质量(μ g)=3:1的比例确定PEI(1mg/mL)的用量,稀释到100 μ L/盘的HBS液中,混匀后静置。上述两溶液分别单独静置混合5min,之后将二者混合继续静置20min,最后加入到要转染的细胞培养液中;

[0110] 3) 转染4-6h后,给转染的细胞换液,先用2-3mL的PBS润洗两遍后再换成新鲜的无血清的DMEM培养基(按1:1000加入了青链霉素,青霉素工作浓度100U/mL,链霉素工作浓度0.1mg/mL),在37 $^{\circ}$ C恒温、5%CO₂的培养箱中培养表达。

[0111] 将上述转染后的细胞培养液,在培养3天后收取上清,用DMEM培养基换液,再到第七天再收一次上清。将2次收集的上清混合,proteinA亲和层析纯化目的蛋白,将抗体蛋白进行SDS-PAGE鉴定,结果如图4所示。亲和层析后对抗体进行分子筛纯化,结果如图5所示。

[0112] 2. 人源化12C3抗体亲和力验证

[0113] (1) 捕获抗体:使用HBS缓冲液(10mM Hepes,150mMNaCl,pH7.4)将抗体稀释至4 μ g/mL,使用proteinA芯片捕获抗体,抗体捕获响应值为200-300RU。

[0114] (2) 进样:不同浓度抗原蛋白SIRP α -ecto(6.25nM,3.125nM,1.5625nM,0.78nM,0.39nM)以固定流速依次流过芯片,使抗原蛋白与芯片表面抗体蛋白结合,响应值产生变化。每流过一个浓度的抗原蛋白后切换为HBS缓冲液,抗原蛋白从抗体上解离,响应值变化。

[0115] (3) 再生:使用10mM甘氨酸pH1.5溶液对芯片进行再生。

[0116] (4) 使用Biacore 8K系统BIAevaluation软件拟合数据结果。结果如图6所示。

[0117] 实施例3. SIRP α 阻断抗体对巨噬细胞的体外活化能力

[0118] SIRP α 阻断抗体的重要应用是其抗肿瘤作用。本实施例利用人Burkitt淋巴瘤细胞Raji(ATCC:CCL-86)及如下制备的小鼠原代巨噬细胞作为模型,使用12C3抗体阻断Raji细胞表面CD47与SIRP α 人源化小鼠巨噬细胞表面的hSIRP α 受体结合,激活小鼠巨噬细胞的吞噬功能,进而吞噬Raji细胞,评价本发明筛选的SIRP α 阻断抗体体外细胞水平的抗肿瘤能力。

[0119] 1. 小鼠原代巨噬细胞制备

[0120] (1) 复温RPMI 1640(GIBCO公司)培养液(预添加M-CSF)至37摄氏度;

[0121] (2) 处死小鼠,喷洒70%乙醇溶液消毒。拉扯双侧后腿直至听到清脆响声(提示股骨从髌骨脱臼);

- [0122] (3) 使用干净的剪刀、镊子沿一侧大腿环形剪开皮肤,向爪子方向剥离皮肤;
- [0123] (4) 用镊子将腿部肌肉分开,露出股骨和胫骨(注意不要损伤骨头);
- [0124] (5) 切断股骨与髌骨间的韧带,切下膝关节以下的骨头。将股骨和胫骨至于冰冷的盐溶液中;
- [0125] (6) 同法处理另一只腿;
- [0126] (7) 用低绒纸巾小心剥除骨骼上附着的组织,将骨头置入70%乙醇溶液中;
- [0127] (8) 20mL无菌注射器吸满预热的培养液,装上27G针头。并准备好50mL离心管;
- [0128] (9) 从膝关节处分离股骨和胫骨,丢弃膝盖骨。一个无菌镊夹住股骨,用一把无菌剪刀剪掉股骨上端。将针头插入骨髓腔,用培养液反复冲洗,将骨髓冲入50mL离心管。冲洗过程中,上下移动针头刮扫骨髓腔。每根骨头使用大约5mL培养液。丢弃骨头;
- [0129] (10) 同法处理胫骨(剪掉上下两端);
- [0130] (11) 将细胞悬液离心(150g,5分钟)。丢弃上清,加入RPMI 1640(GIBCO公司)培养液(添加M-CSF)。混匀细胞悬液;
- [0131] (12) 每根骨头准备两个100mm培养皿。将细胞悬液打入培养皿,添加预热RPMI 1640(GIBCO公司)培养液(添加M-CSF)至10mL;
- [0132] (13) 置于37℃、5%二氧化碳培养箱内培养5天。
- [0133] (14) 第5天,使用室温盐溶液5mL冲洗培养皿(巨噬细胞为贴壁生长)。使用细胞刮刀刮下贴壁细胞,转移入离心管,150g离心5分钟。关于M-CSF的工作浓度:介于1ng/mL到1μg/mL之间。
- [0134] 2. Raji细胞CSFE标记
- [0135] (1) 用1mLCFDA SE细胞标记液(BEYOTIME:C0051)重悬100万至500万Raji(ATCC:CCL-86)细胞,置于15mL离心管内;
- [0136] (2) 用CFDA SE细胞标记液稀释CFDA SE储存液(Thermo)(1000×)至2×。例如取2微升CFDA SE储存液(1000×)至1mL CFDA SE细胞标记液中,混匀后即CFDA SE储存液(2×);
- [0137] (3) 把1mLCFDA SE储存液(2×)加入到步骤(1)中含有1mL待标记细胞的15mL离心管内,轻轻混匀;
- [0138] (4) 37℃孵育10分钟;
- [0139] (5) 立即在15mL离心管内加入约10mL完全细胞培养液(含10%血清),室温颠倒数下混匀;
- [0140] (6) 室温离心去上清,再用5-10mL完全细胞培养液洗涤一次;
- [0141] (7) 再加入5-10mL完全细胞培养液,37℃孵育5分钟,以促进CFDASE在细胞内的驻留及未反应的CFDA SE进入完全细胞培养液。离心去上清,完成最后一次洗涤;
- [0142] (8) 随后即可按照细胞的正常培养方法进行培养。可以在荧光显微镜下直接观察标记效果,也可以在培养适当时间后用流式细胞仪检测细胞增殖,或用于特定目的的细胞示踪。标记的细胞也可以用于活体动物的移植,并用荧光进行示踪。标记的细胞呈绿色荧光。
- [0143] 3. 巨噬细胞体外培养激活
- [0144] (1) 每孔巨噬细胞中加入10倍量CFDA SE标记的肿瘤细胞Raji,同时加入终浓度为

10 μ g/mL 12C3抗体或无关同型IgG抗体(中国科学院微生物研究所)阴性抗体,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育2小时;

[0145] (2)吸去上清,用PBS洗细胞3次,每孔细胞中加入EDTA溶液1mL,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育15分钟;

[0146] (3)吸去上清,用PBS洗细胞3次,每孔细胞中加入2.5%胰酶溶液1mL,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育15分钟;

[0147] (4)每孔细胞中加入2mL含10%血清的RPMI 1640培养基终止消化;

[0148] (5)1000rpm/min离心5分钟,弃去上清,用PBS洗涤细胞一次;

[0149] (6)每个细胞样品,加入1:100稀释APC anti-F4/80抗体(SUNGENE:M110F1),室温避光孵育30分钟;

[0150] (7)1000rpm/min离心5分钟,弃去上清,用PBS洗涤细胞三次;

[0151] (8)用200 μ L PBS重悬细胞,转移至流式管中;

[0152] (9)进行流式细胞术检测。

[0153] 4.结果分析

[0154] 图7中Q1象限代表小鼠原代巨噬细胞,Q2象限代表小鼠原代巨噬细胞吞噬CSFE标记Raji细胞后形成的双阳性细胞,Q3象限代表CSFE标记后的Raji细胞,Q4象限代表未染色的小鼠原代巨噬细胞和Raji细胞。通过对图7中Q2象限细胞数比较,阴性对照无关同型IgG抗体处理组样品中Q2象限双阳性细胞群明显低于12C3处理组;进一步将数据处理后的图8同样证明12C3抗体能够在体外培养条件下有效活化小鼠巨噬细胞的吞噬能力,进而吞噬Raji细胞。

[0155] 实施例4.人源化12C3抗体抑制肿瘤能力评价

[0156] 1.本实施例应用的对照KWAR23抗体制备

[0157] KWAR23抗体(一种人源化SIRP α 阻断抗体)氨基酸序列及应用来源于专利US20180037652A1和文献Nan Guo Ringa等Anti-SIRP α antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity,PNAS.2017 Nov 20 E10578-10585,通过全基因合成方式(金斯瑞)获得KWAR23抗体编码重链序列(SEQ ID NO:19)和轻链序列(SEQ ID NO:20),分别在重链和轻链的5'端EcoRI和3'端XhoI添加同源臂序列,重链上游引物:GTTTTGCTGCTGTTGGTCCAGGTTCCACTGGTGACGAGGTGCAGCTGCAGCAGTC,如SEQ ID NO:27所示;重链下游引物:GCCCTTGGTGCTGGCGGCAGACACTGTCACCAGGGT,如SEQ ID NO:28所示,轻链上游引物:GTTTTGCTGCTGTTGGTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGATCGTGCTGACCCAG,如SEQ ID NO:29所示;轻链下游引物:ATGGTGACCCACGGTCTTCAGCTCCAGCTTTGTG,如SEQ ID NO:30所示,通过同源重组将KWAR23抗体编码区序列克隆入pCAGGS表达载体(ADDGENE公司),通过瞬时转染293T细胞表达KWAR23抗体,通过Protein A凝胶柱(GE公司)对表达的抗体进行亲和层析。经Protein A柱子亲和层析后的抗体纯度达到95%以上(如图9)。本实施例应用SIRP α 人源化免疫缺陷小鼠(Jackson Lab)进行人源化12C3抗体体内抑制Raji肿瘤生长能力评价。Raji细胞为用luciferase试剂盒标记后的Raji-luciferase(中乔新舟)。

[0158] 2.Raji-luciferase细胞系在小鼠皮下成瘤;

[0159] a)接种Raji-luciferase细胞数量: 3×10^6 细胞/200 μ L/只;

[0160] b)接种部位:背部皮下;

[0161] 3. 分组及处理

[0162] KWAR23为一种人源化SIRP α 阻断抗体;Rituximab为罗氏制药销售的针对CD20靶点的肿瘤治疗抗体药物;根据Nan Guo Ringa等文献报道,联合使用以上两种抗体,能够有效抑制Raji细胞在SIRP α 人源化免疫缺陷小鼠体内生长;所以把这两种药物联合使用作为本实例的阳性对照。

[0163] 肿瘤细胞注射后约1周后,利用小动物活体成像IVIS对Raji-luciferase在人源化免疫缺陷小鼠皮下成瘤情况进行检测,根据成像情况分组,之后进行抗体腹腔注射。本实施例以无关同型IgG抗体(中国科学院微生物研究所)注射组为阴性对照,KWAR23(如上所述生产)和Rituximab抗体(ROCHE)联合给药作为阳性对照,12C3抗体为处理组进行平行实验,每组3只小鼠。

小鼠分组	抗体注射及剂量	小鼠数量
无关同型抗体	100 μ L	3
[0164] H12C3 抗体组	10 mg/kg, 100 μ L	3
KWAR23+	10 mg/kg, 100 μ L	3
Rituximab	10 mg/kg, 100 μ L	

[0165] 抗体注射:小鼠成瘤后(7天),每3天腹腔注射抗体,连续注射3周(均为200 μ g/只,阳性对照组为各200 μ g/只)。

[0166] 开始注射后,每7天进行一次活体成像检测,评价治疗效果。

[0167] 4. 治疗效果观察

[0168] 结果(如图10、11)表明,注射无关同型IgG抗体的对照组小鼠皮下肿瘤均快速生长;KWAR23和Rituximab抗体联合给药注射后肿瘤生长控制良好,肿瘤体积明显减小;12C3抗体注射组在抗体注射后肿瘤生长迅速得到抑制,肿瘤体积明显减小。本实施例结果表明,12C3抗体能够有效抑制肿瘤生长,具有潜在的肿瘤治疗价值。

[0169] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院微生物研究所
 <120> 一种抗SIRP α 抗体及其应用
 <130> IB206019
 <160> 30
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly His Gly Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala
 115
 <210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 2
 Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 3
 Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Ile
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 4
 Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 5
 Ala Arg Gly His Gly Val Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 6
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp
 1 5 10 15
 Tyr

[0001]

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 7
 Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 8
 Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 9
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 9
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly His Gly Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 10
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 10
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 11
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 11
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly His Gly Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

[0002]

130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430 435
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440

[0003]

<210> 12
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 13
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <400> 13

cagggtgcagc	tgaaggagtc	aggacctggc	ctgggtggcg	cctcacagag	cctgtccatc	60
acatgcaccg	tctcagggtt	ctcattaacc	ggctatgggt	taatctgggt	tcgccagcct	120
ccaggaaagg	gtctggagtg	gctgggaatg	atatgggggt	atggaagcac	agactataat	180
tcagctctca	aatccagact	gagcatcagc	aaggacaact	ccaagagcca	agttttctta	240
aaaatgaaca	gtctgcaaac	tgatgacaca	gccaggtact	actgtgccag	agggcacggg	300
gtctttgtt	actggggcca	agggactctg	gtcactgtct	ctgca		345
<210>	14					
<211>	333					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	14					
aacattgtgc	tgacceaatc	tcagcttct	ttggetgtgt	ctctagggca	gagggccacc	60
atatcctgca	gagccagtga	aagtgttgat	agttatggca	atagttttat	gcactgggtac	120
cagcagaaac	caggacagcc	acccaaactc	ctcatctatg	ttgcatccaa	cctagaatct	180
gggttcctg	ccaggttcag	tgccagtggt	tctaggacag	acttcacct	caccattgat	240
cctgtggagg	ctgatgatgc	tgcaacctat	tactgtcagc	aaaataatga	ggatcccgtg	300
acgttcggtg	gaggcaccaa	gctggaatc	aaa			333
<210>	15					
<211>	345					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	15					
caagtgcAAC	tgcaagagag	cgcccccgga	ctgggtgaac	cctccgagac	actgtctctg	60
acatgcacag	tgagcggctt	cagcctcacc	ggctacggcg	tgatttgggt	gagacagcct	120
cccggaAaag	gactggagtg	gctgggcatg	atctggggcg	acggcagcac	cgactacaac	180
agcgtctgca	agtcagact	gaccatcagc	aaggacacca	gcaagaacca	gttctctctg	240
aaactgagca	gctgaccgc	tgccgatacc	gccgtgtact	actgcgccag	agggcacggc	300
gtgttcgctt	attggggcca	aggcacactg	gtgaccgtgt	ccagc		345
<210>	16					
<211>	333					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	16					
gacatcgtga	tgaccagag	ccccgactct	ctggctgtgt	ctctgggaga	gagagctacc	60
atcagctgca	gagcctccga	gagcgtggac	tcttacggca	actccttcat	gcactgggtac	120
cagcagaAagc	ccggacagcc	ccccaaactg	ctgatctacg	tgccagcaaa	tctggagagc	180
ggagtgcceg	atagattctc	cggcagcggc	tccggcaccg	atcttacact	gaccatcagc	240
tccttgcaag	ccgaagatgt	ggccacctac	tactgccagc	agaataacga	ggacccttgg	300
acctttggcc	aaggcaccaa	gctggagatc	aag			333
<210>	17					
<211>	1326					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	17					
caagtgcAAC	tgcaagagag	cgcccccgga	ctgggtgaac	cctccgagac	actgtctctg	60
acatgcacag	tgagcggctt	cagcctcacc	ggctacggcg	tgatttgggt	gagacagcct	120
cccggaAaag	gactggagtg	gctgggcatg	atctggggcg	acggcagcac	cgactacaac	180
agcgtctgca	agtcagact	gaccatcagc	aaggacacca	gcaagaacca	gttctctctg	240
aaactgagca	gctgaccgc	tgccgatacc	gccgtgtact	actgcgccag	agggcacggc	300
gtgttcgctt	attggggcca	aggcacactg	gtgaccgtgt	ccagcgttag	caccaagggc	360
ccatccgtct	tcacctggtc	gccctgtctc	aggagcactt	ccgagagcac	agccgcctg	420
ggctgcctgg	tcaggacta	cttccccgaa	ccggtgacgg	tgctgtggaa	ctcagggccc	480
ctgaccagcg	gctgacacac	cttccccgct	gtcttacagt	cctcaggact	ctactccctc	540
agcagcgtgg	tgaccgtgct	ctccagcagc	ttgggcacga	agacctacac	ctgcaacgta	600
gatcacAaagc	ccagcaacac	caaggtggac	aagagagtgt	agtccaaata	tggtccccca	660
tgcccaccat	gcccagcacc	tgagtccgag	gggggaccat	cagtcttctt	gttcccccca	720
aaacccaagg	acactctcat	gatctcccgg	accctgagg	tcacgtgcgt	ggtgggtggac	780
gtgagccAagc	aagaccctga	ggtccagttc	aactggtacg	tgatggcgt	ggaggtgcat	840
aatgccAaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	ttcaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	900
ctaccgtctc	tgaccagga	ctggctgaac	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	960
aaaggectcc	cgctctccat	cgagaaaacc	atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagag	1020
ccacaggtgt	acacctgcc	ccatccccag	gaggagatga	ccaagaacca	ggtcagcctg	1080
acctgcctgg	tcaaaggctt	ctaccaccagc	gacatcccg	tggagtggga	gagcaatggg	1140
cagccgggaga	acaactacaa	gaccacgcct	cccgtgctgg	actccgacgg	ctctctcttc	1200
ctctacagca	ggctaaccgt	ggacaagagc	aggtggcagg	aggggaatgt	cttctcatgc	1260
tcctgtatgc	atgaggtctt	gcacaaccac	tacacacaga	agagcctctc	cctgtctccg	1320
ggtaaa						1326
<210>	18					
<211>	654					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	18					
gacatcgtga	tgaccagag	ccccgactct	ctggctgtgt	ctctgggaga	gagagctacc	60
atcagctgca	gagcctccga	gagcgtggac	tcttacggca	actccttcat	gcactgggtac	120
cagcagaAagc	ccggacagcc	ccccaaactg	ctgatctacg	tgccagcaaa	tctggagagc	180
ggagtgcceg	atagattctc	cggcagcggc	tccggcaccg	atcttacact	gaccatcagc	240
tccttgcaag	ccgaagatgt	ggccacctac	tactgccagc	agaataacga	ggacccttgg	300

[0004]

acctttggcc	aaggcaccaa	gctggagatc	aagcgtacgg	tggctgcacc	atctgtcttc	360
atcttcccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg	420
aataacttct	atcccagaga	ggccaaagta	cagtgggaag	tggataacgc	cctccaatcg	480
ggttaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	540
agcaccctga	cgtgagcaaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	600
accatcagg	gcctgagctc	gccctgcaca	aagagcttca	acaggggaga	gtgt	654
<210>	19					
<211>	1320					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	19					
gaggtgcagc	tgcagcagtc	cggagcagag	ctggtgaagc	caggagcctc	cgtgaagctg	60
tcttgcaccg	ccagcggcct	caacatcaag	gactactata	tccactgggt	gcagcagagg	120
accgagcagg	gactggagtg	gatcggcaga	atcgaccocg	aggatggcga	gacaaagtac	180
gcccctaagt	ttcaggacaa	ggccaccatc	acagccgata	ccagctccaa	tacagcctat	240
ctgcacctgt	ctagcctgac	ctccagggat	acagccctgt	actattgtgc	aagatgggga	300
gcatactggg	gacagggcac	cctggtgaca	gtgtctgccg	ctagcaccaa	gggcccattc	360
gtcttcccgc	tggcgccttg	ctccaggagc	acctccgaga	gcacagccgc	cctgggctgc	420
ctggtcaagg	actacttccc	cgaaccgggtg	acgggtgctg	ggaactcagg	cgccctgacc	480
agcggcgtgc	acaccttccc	ggctgtccta	cagtctctcag	gactctactc	cctcagcagc	540
gtggtgaccg	tgcctccag	cagcttgggc	acgaagacct	acacctgcaa	cgtagatcac	600
aagcccagca	acaccaaggt	ggacaagaga	gttgagtcca	aatatggtcc	cccattgccc	660
ccatgccagc	cacttgagtt	cgagggggga	ccatcagctc	tccctgttccc	cccaaaaccc	720
aaggacactc	tcattgatctc	cggaccctc	gaggtcactg	gcgtggtggt	ggactgagc	780
caggaagacc	cgagggtcca	gttcaactgg	tacgtggatg	gcgtggaggt	gcataatgcc	840
aagacaaaagc	cgcgaggagga	gcagttcaac	agcactgacc	gtgtggtcag	cgctctcacc	900
gtctctgacc	aggactggct	gaacggcaag	gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaaaggc	960
ctcccgtcct	ccatcgagaa	aaccatctcc	aaagccaaag	ggcagccccc	agagccacag	1020
gtgtacacc	tgccccatc	ccaggaggag	atgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	1080
ctggtcaaa	gcttctacc	cagcgcacatc	gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	1140
gagaacaaact	acaagaccac	gcctcccgtg	ctggactccg	acggctcctt	cttctctac	1200
agcaggctaa	ccgtggacaa	gagcaggtgg	caggagggga	atgtcttctc	atgctccgtg	1260
atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacaca	cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	1320
<210>	20					
<211>	645					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	20					
[0005] cagatcgtgc	tgaccagagc	cccagcaate	atgagcgctc	ccccaggaga	gaaggtgacc	60
ctgacatgct	ccgccagctc	ctctgtgagc	tcctcttacc	tgtattggta	ccagcagaag	120
cccgagcagc	ccctaagct	gtggatctat	tctacaagca	acctggcacc	tggagtgcct	180
gcacggttct	ccggctctgg	cagcggcacc	tcctactctc	tgacaatctc	tagcatggag	240
gccgaggagc	ccgccagcta	tttctgtcac	cagtggtcct	cttaccaccag	aacctttggc	300
gcgggacaaa	agctggagct	gaagcgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaaat	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaa	gtggataacg	ccctccaate	gggtaactcc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcactc	acagcctcag	cagcaccctg	540
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagctctac	cctgcgaagt	caccatcag	600
ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtg		645
<210>	21					
<211>	31					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	21					
cggaattcgc	cgccaccatg	gagcccgcg	g			31
<210>	22					
<211>	45					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	22					
ccgctcgagt	tagtggatgat	ggtggtgatg	agagggtttg	gcgcg		45
<210>	23					
<211>	51					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	23					
gttttgcctg	tgigggttcc	aggttccact	ggtgaccaag	tgcaactgca	a	51
<210>	24					
<211>	28					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					
<400>	24					
gccttgggtg	ctagcgtg	acacggtc				28
<210>	25					
<211>	51					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(artificial sequence)					

	<400> 25	
	gttttgctgc tgtgggttc aggttccact ggtgacgaca tcgtgatgac c	51
	<210> 26	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(artificial sequence)	
	<400> 26	
	atggtgcagc cacgtacgc ttgatctcca gc	32
	<210> 27	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(artificial sequence)	
	<400> 27	
	gttttgctgc tgtgggttc aggttccact ggtgacgagg tgcagctgca gcagtc	56
	<210> 28	
	<211> 36	
[0006]	<212> DNA	
	<213> 人工序列(artificial sequence)	
	<400> 28	
	gcccttggtg ctggcggcag aactgtcac cagggt	36
	<210> 29	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(artificial sequence)	
	<400> 29	
	gttttgctgc tgtgggttc aggttccact ggtgaccaga tcgtgctgac ccag	54
	<210> 30	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(artificial sequence)	
	<400> 30	
	atggtgcagc cacgtcttc agtccagct ttgtg	35

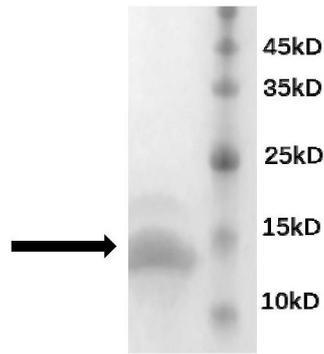


图1

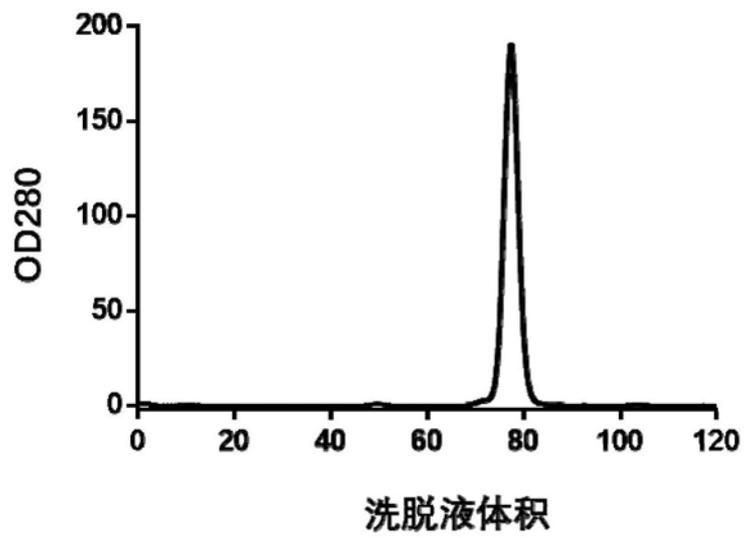


图2

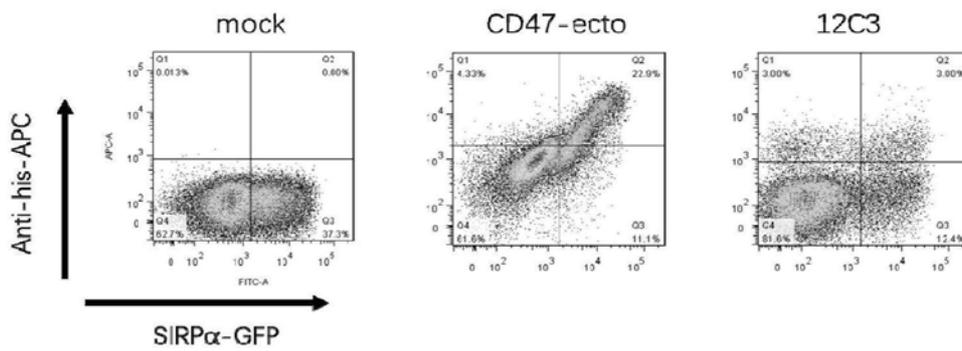


图3

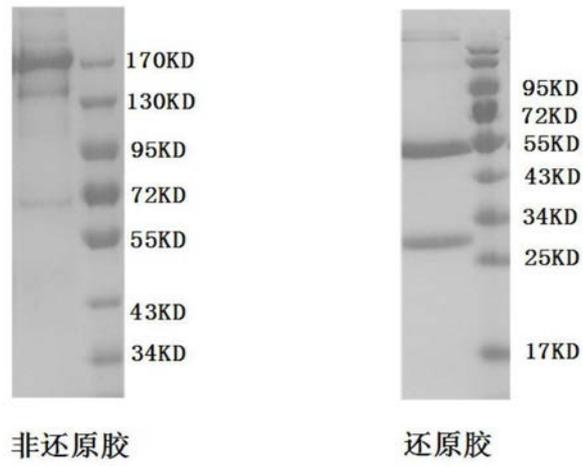


图4

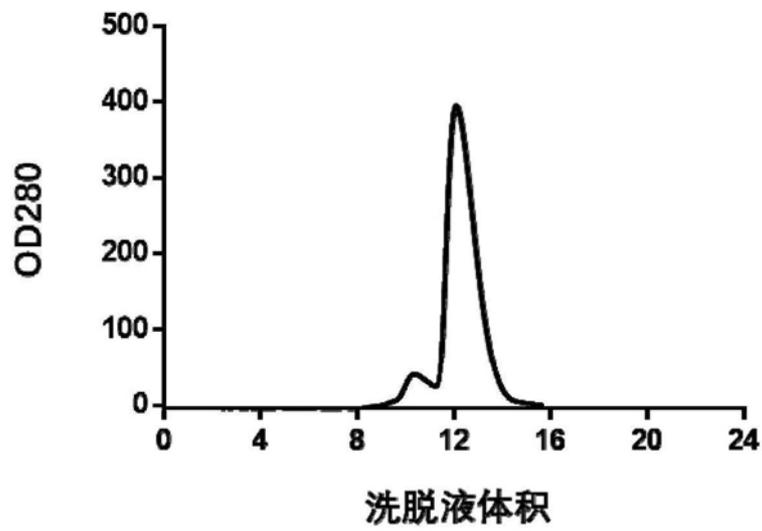


图5

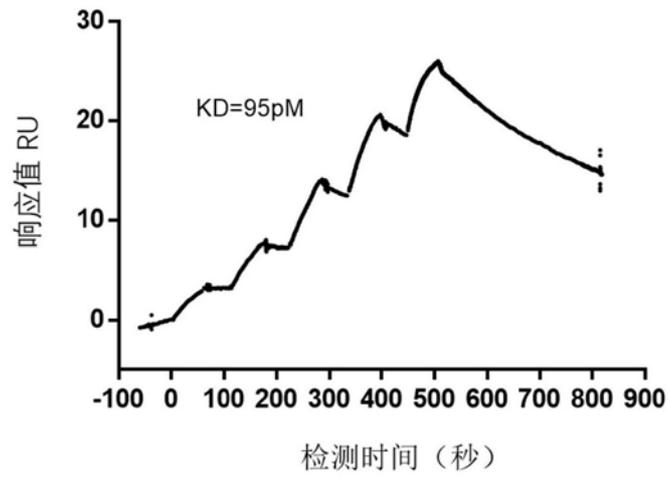


图6

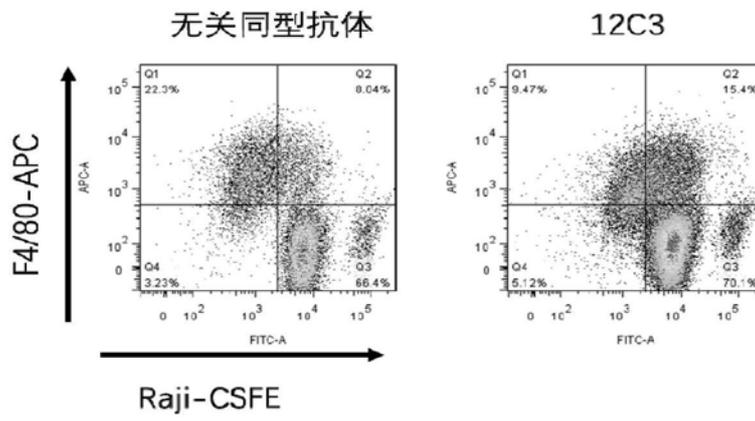


图7

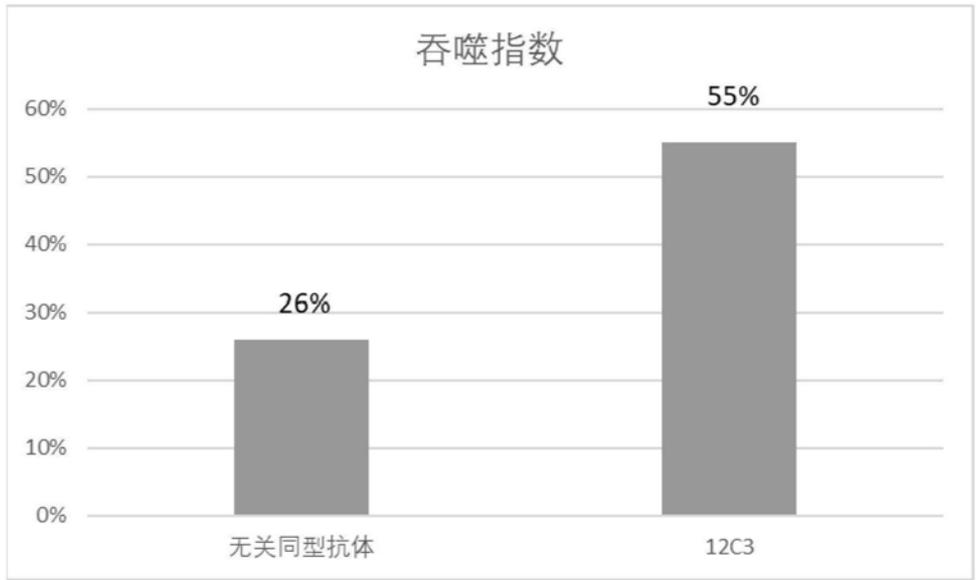


图8

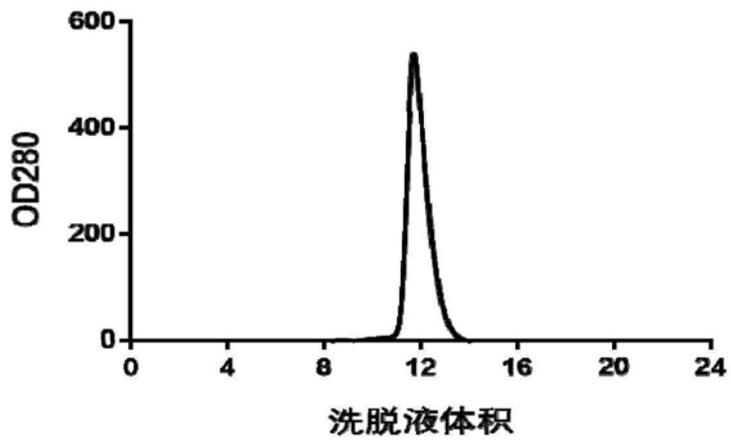


图9

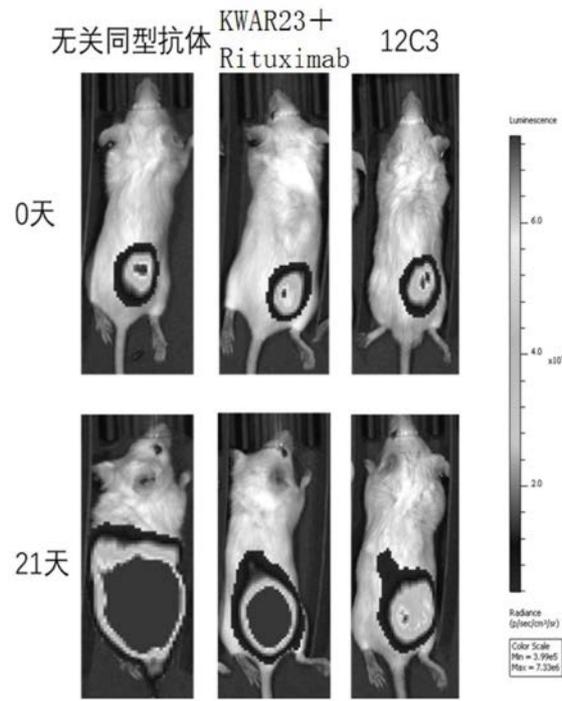


图10

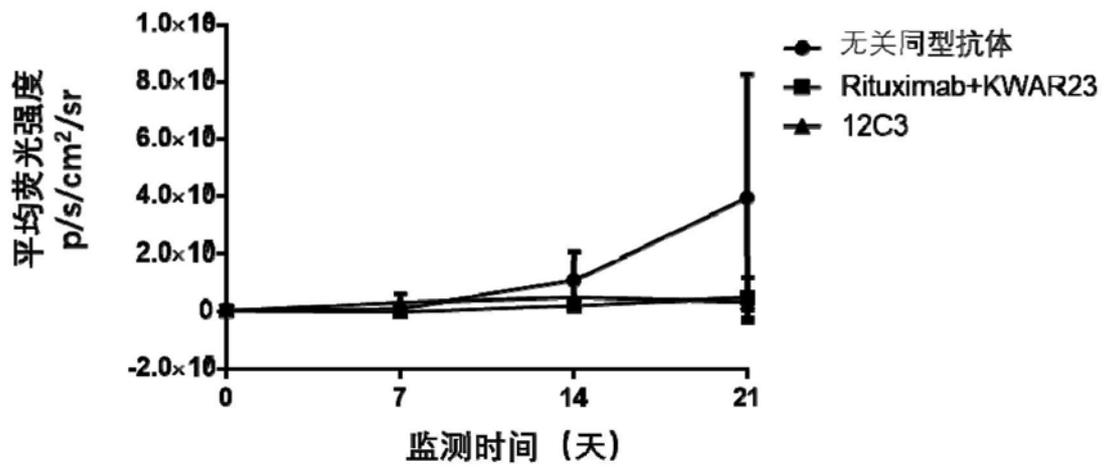


图11