



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112574310 B

(45) 授权公告日 2023.05.05

(21) 申请号 202011464010.2

(22) 申请日 2020.12.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112574310 A

(43) 申请公布日 2021.03.30

(73) 专利权人 浙江博锐生物制药有限公司  
地址 318000 浙江省台州市椒江区疏港大  
道1号

(72) 发明人 王海彬 吴振华 周雅琼 聂磊  
陈瑶 蒋美珠 焦静雨 杨亚平  
高栋

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理  
有限公司 11728  
专利代理师 王笑康 陈悦军

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28* (2006.01)

*C12N 15/13* (2006.01)

*C12P 21/02* (2006.01)

*A61K 39/395* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

*A61P 35/02* (2006.01)

审查员 范英程

权利要求书2页 说明书15页  
序列表14页 附图5页

(54) 发明名称

抗SIRP  $\alpha$  抗体及其用途

(57) 摘要

本发明属于生物学领域,涉及一种抗SIRP  $\alpha$  抗体或其抗原结合片段、其组合物及应用。本发明的抗SIRP  $\alpha$  抗体及其抗原结合片段能够有效阻断SIRP  $\alpha$  和CD47的结合,进而有效促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬,有效抑制了肿瘤的生长,具有良好的成药前景。

1. 抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,重链可变区包括三个CDR,分别为VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,轻链可变区包括三个CDR,分别为VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中,

VH CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:33所示;

VH CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示;

VH CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;

VL CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示;

VL CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:39所示;

VL CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示。

2. 根据权利要求1所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示,或与上述序列具有至少90%序列一致性;所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示,或与上述序列具有至少90%序列一致性。

3. 根据权利要求2所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:31具有至少95%序列一致性,所述轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:36具有至少95%序列一致性。

4. 根据权利要求3所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:31具有至少96%序列一致性,所述轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:36具有至少96%序列一致性。

5. 根据权利要求4所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:31具有至少97%序列一致性,所述轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:36具有至少97%序列一致性。

6. 根据权利要求5所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:31具有至少98%序列一致性,所述轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:36具有至少98%序列一致性。

7. 根据权利要求6所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:31具有至少99%序列一致性,所述轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:36具有至少99%序列一致性。

8. 根据权利要求1~7任一项所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,进一步包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc区中的一种或多种。

9. 根据权利要求8所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述轻链恒定区是 $\lambda$ 链或 $\kappa$ 链恒定区。

10. 根据权利要求8所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4型。

11. 根据权利要求1~10任一项所述的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。

12. 一种核酸分子,包含编码权利要求1~11任一项所述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸。

13. 根据权利要求12所述的核酸分子,其中,所述核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区和/或轻链可变区。

14. 根据权利要求13所述的核酸分子,其中,所述核酸分子编码重链可变区,其核苷酸序列如SEQ ID NO:32所示,或与上述序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性;或者所述核酸分子编码轻链可变区,其核苷酸序列如SEQ ID NO:37所示,或与上述序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。

15. 本发明提供一种生物材料,为:

- (1) 包含权利要求12~14任一项所述的核酸分子的载体、宿主细胞或微生物;或
- (2) 上述(1)的表达产物、悬浮液或上清液。

16. 一种组合物,其包含权利要求1~11任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中,所述组合物为药物组合物,进一步包含制药学上可接受的载体。

18. 制备权利要求1~11任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,包括:培养权利要求15中所述的宿主细胞使抗体或抗原结合片段表达,及分离所述抗体或抗原结合片段。

19. 权利要求1~11任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求12~14所述的核酸分子或权利要求15所述的生物材料或权利要求16或17所述的组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用。

20. 根据权利要求19所述的应用,其中,所述肿瘤为CD47表达阳性的肿瘤,所述肿瘤是血液肿瘤或实体瘤。

21. 根据权利要求20所述的应用,其中,所述肿瘤为白血病、淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、头颈癌、胃癌、黑色素瘤、胰腺癌、结直肠癌、食管癌、肝癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、甲状腺癌或神经胶质瘤。

22. 权利要求1~11任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求12~14所述的核酸分子或权利要求15所述的生物材料或权利要求16或17所述的组合物在制备阻断SIRPα和CD47的结合的制剂中的应用。

23. 权利要求1~11任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求12~14所述的核酸分子或权利要求15所述的生物材料或权利要求16或17所述的组合物与一种或多种其它癌症治疗剂在联合制备治疗肿瘤的药物中的应用。

24. 根据权利要求23所述的应用,其中,所述肿瘤为CD47表达阳性的肿瘤。

25. 根据权利要求23或24所述的应用,其中,所述其它癌症治疗剂包括但不限于化疗剂、放疗剂和生物大分子药物。

26. 根据权利要求25所述的应用,其中,所述生物大分子药物是靶向肿瘤细胞表面抗原的单克隆抗体药物。

27. 根据权利要求26所述的应用,其中,所述单克隆抗体为抗CD20抗体、西妥昔单抗或曲妥珠单抗。

28. 根据权利要求27所述的应用,其中,所述抗CD20抗体为泽贝妥单抗或利妥昔单抗。

## 抗SIRP $\alpha$ 抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物学领域,涉及一种抗SIRP $\alpha$ 抗体。

### 背景技术

[0002] SIRP $\alpha$ 是表达于巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、粒细胞等髓系细胞表面的跨膜蛋白,属免疫球蛋白超家族(IgSF)成员。SIRP $\alpha$ 由N端胞外区、跨膜区、C端胞内区组成,胞外区含三个IgSF结构域(N端是Ig-V结构域),胞内区含酪氨酸免疫受体抑制基序(ITIM)。SIRP $\alpha$ 的主要配体是CD47,CD47是广泛表达于正常组织和疾病组织中的一类跨膜糖蛋白。CD47与巨噬细胞等髓系细胞上SIRP $\alpha$ 的结合使得SIRP $\alpha$ 胞内区的ITIM发生磷酸化,进而募集和激活磷酸酶SHP-1和SHP-2,从而通过下游信号传导抑制巨噬细胞等的吞噬功能。正常组织通过表达CD47及CD47-SIRP $\alpha$ 信号传递从而释放“别吃我”信号做为一种自我保护机制。

[0003] 研究发现,CD47在几乎在所有肿瘤细胞上过表达,肿瘤细胞利用CD47与SIRP $\alpha$ 的结合释放“别吃我”信号从而逃避免疫细胞的监控。而且临床上CD47表达水平与患者不良预后密切相关。体内外研究也发现阻断CD47/SIRP $\alpha$ 可以促进肿瘤细胞吞噬并在动物模型中抑制肿瘤生长。以上表明靶向CD47/SIRP $\alpha$ 可做为肿瘤免疫疗法药物开发的新途径,考虑到CD47在正常细胞组织上的广泛表达,特别是在红细胞和血小板上的表达,靶向CD47可能会带来一定的血液毒性,而且,与CD47相互作用的蛋白除SIRP $\alpha$ 外,还包括TSP-1、整合素等,CD47参与的信号通路更为复杂,靶向CD47有更多的风险,因此,开发抗SIRP $\alpha$ 抗体阻断CD47/SIRP $\alpha$ 信号通路可能是肿瘤药物开发更有效的策略。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种新的抗SIRP $\alpha$ 抗体,其能够与SIRP $\alpha$ 特异性结合,对肿瘤治疗很有潜力。

[0005] 第一个方面,本发明提供结合SIRP $\alpha$ 或其片段的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,重链可变区包括三个CDR,分别为VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,轻链可变区包括三个CDR,分别为VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中,

[0006] VH CDR1包含SEQ ID NO:3、13、23或33所示的氨基酸序列或由其组成,VH CDR2包含SEQ ID NO:4、14、24或34所示的氨基酸序列或由其组成,VH CDR3包含SEQ ID NO:5、15、25或35所示的氨基酸序列或由其组成,VL CDR1包含SEQ ID NO:8、18、28或38所示的氨基酸序列或由其组成,VL CDR2包含SEQ ID NO:9、19、29或39所示的氨基酸序列或由其组成,VL CDR3包含SEQ ID NO:10、20、30或40所示的氨基酸序列或由其组成。

[0007] 在优选的实施方式中,所述抗体包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中,

[0008] VH CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;

[0009] VH CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;

- [0010] VH CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;
- [0011] VL CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;
- [0012] VL CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示;
- [0013] VL CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。
- [0014] 在优选的实施方式中,所述抗体包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中,
- [0015] VH CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示;
- [0016] VH CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;
- [0017] VH CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;
- [0018] VL CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示;
- [0019] VL CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;
- [0020] VL CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示。
- [0021] 在优选的实施方式中,所述抗体包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中,
- [0022] VH CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示;
- [0023] VH CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示;
- [0024] VH CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示;
- [0025] VL CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示;
- [0026] VL CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示;
- [0027] VL CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示。
- [0028] 在优选的实施方式中,所述抗体包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中,
- [0029] VH CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:33所示;
- [0030] VH CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示;
- [0031] VH CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;
- [0032] VL CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示;
- [0033] VL CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:39所示;
- [0034] VL CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示。
- [0035] 在一些实施方式中,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1、11、21或31所示,或与上述序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。
- [0036] 在一些实施方式中,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6、16、26或36所示,或与上述序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。
- [0037] 在某些优选的实施方式中,所述重链可变区中含有的3个CDR,和/或所述轻链可变区中含有的3个CDR,由Kabat或Chothia编号系统定义。
- [0038] 在一些实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段可进一步包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc区中的一种或多种。在进一步优选的实施方式中,所述轻链恒定区是 $\lambda$ 链或 $\kappa$ 链恒定区。在一些优选的实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2、IgG3或

IgG4型。

[0039] 在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。

[0040] 在第二个方面,提供一种核酸分子,包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区和/或轻链可变区。

[0041] 在优选的实施方式中,所述核酸分子编码重链可变区,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2、12、22或32所示,或与上述序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。在其它优选的实施方式中,所述核酸分子编码轻链可变区,其核苷酸序列如SEQ ID NO:7、17、27或37所示,或与上述序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。

[0042] 在第三个方面,本发明提供一种生物材料,为:

[0043] (1) 包含本发明的核酸分子的载体、宿主细胞或微生物等;或

[0044] (2) 上述(1)的表达产物、悬浮液、上清液等。

[0045] 本领域技术人员根据抗体的氨基酸序列能够容易地选择并制备包含所述抗体的编码序列的载体、宿主细胞或微生物,并能够知道如何培养这样的宿主细胞或微生物,从而获得相应的表达产物、悬浮液、上清液等,以获得相应的抗体。这都是本领域常规技术手段。

[0046] 在第四个方面,提供一种组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合片段;优选地,所述组合物为药物组合物,进一步包含制药学上可接受的载体。

[0047] 在第五个方面,提供制备本发明的抗体或其抗原结合片段的方法,包括:培养上述的宿主细胞使抗体或抗原结合片段表达,及分离所述抗体或抗原结合片段。

[0048] 在第六个方面,提供本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的核酸分子或本发明的生物材料或本发明的组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用;优选地,所述肿瘤为CD47表达阳性的肿瘤;进一步优选地,所述肿瘤是各种血液肿瘤和实体瘤,如白血病、淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、头颈癌、胃癌、黑色素瘤、胰腺癌、结直肠癌、食管癌、肝癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、神经胶质瘤等实体瘤。

[0049] 在第七个方面,提供本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的核酸分子或本发明的生物材料或本发明的组合物在制备阻断SIRP $\alpha$ 和CD47的结合的制剂中的应用。

[0050] 在第八个方面,提供本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的核酸分子或本发明的生物材料或本发明的组合物与一种或多种其它癌症治疗剂在联合制备治疗肿瘤的药物中的应用;优选地,所述肿瘤为CD47表达阳性的肿瘤。

[0051] 在一些优选实施方式中,所述其它癌症治疗剂包括但不限于化疗剂、放疗剂和生物大分子药物。进一步优选地,该生物大分子药物是靶向肿瘤细胞表面抗原的单克隆抗体药物,包括抗CD20抗体(如泽贝妥单抗或利妥昔单抗)、西妥昔单抗或曲妥珠单抗。

[0052] 本发明的抗SIRP $\alpha$ 抗体及其抗原结合片段是阻断性抗体,能够有效阻断SIRP $\alpha$ 和CD47的结合,进而有效促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬,有效抑制了肿瘤的生长,具有良好的成药前景。

## 附图说明

- [0053] 图1显示了鼠源单克隆抗体对SIRP $\alpha$ 与CD47结合的阻断作用。
- [0054] 图2显示了人源化单克隆抗体与SIRP $\alpha$ 的结合。
- [0055] 图3显示了人源化单克隆抗体对SIRP $\alpha$ 与CD47结合的阻断作用。
- [0056] 图4显示了#14抗体和KWAR23对SIRP $\alpha$ 和CD47结合的阻断作用。
- [0057] 图5显示了#14抗体与重组SIRP $\alpha$ 蛋白的结合动力学。
- [0058] 图6显示了#14抗体对抗CD20抗体引起的吞噬的促进作用。
- [0059] 图7显示了#14抗体在MC38肿瘤模型中的抗肿瘤药效。
- [0060] 图8显示了#14抗体与抗CD20抗体能协同抑制肿瘤生长。

## 具体实施方式

[0061] 下面将结合具体实施例来说明本发明内容。如无明确说明,以下方法中使用的试剂和仪器都是本领域常用试剂和仪器,可以通过商购方式获得;所使用的方法都是本领域常规方法,本领域技术人员根据实施例所描述的内容可以毫无疑问地施行所述方法并获得相应的结果。

[0062] 定义:

[0063] 本发明中,术语“抗体”是能特异识别并结合抗原的免疫球蛋白,其涵盖多种抗体结构物,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、双特异抗体或抗体片段。

[0064] 术语“可变区”指识别并特异结合抗原表位的抗体重链或轻链的结构域。

[0065] CDR区或称“互补决定区”指抗体可变区中在序列上高变并形成在结构上确定的环和/或含有抗原接触氨基酸残基的区域。CDR主要负责抗体与抗原表位的结合,决定了抗体的特异性。在一个给定的重链或轻链可变区氨基酸序列中,各CDR的具体氨基酸序列使用许多公知的编号规则的任一种或其组合确定,所述编号规则包括例如Kabat、Contact、AbM和Chothia。本发明抗体的CDR可以根据本领域的任何规则或其组合来确定。

[0066] 本发明的抗SIRP $\alpha$ 抗体

[0067] 本发明提供了对人SIRP $\alpha$ 蛋白具有高亲和力的抗SIRP $\alpha$ 抗体。该抗体可以有效抑制SIRP $\alpha$ 与其配体CD47的结合,从而阻断CD47/SIRP $\alpha$ 下游信号传导,促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,从而实现了对肿瘤细胞的清除。本文所述抗SIRP $\alpha$ 抗体一旦与细胞表面的SIRP $\alpha$ 蛋白结合,可以引起内吞,导致细胞表面SIRP $\alpha$ 蛋白的表达量减少,从而进一步减少CD47与SIRP $\alpha$ 的信号传递。

[0068] 本发明的抗SIRP $\alpha$ 抗体或其抗原结合片段包含取代、插入或缺失。本发明的抗SIRP $\alpha$ 抗体包括对轻链可变区、重链可变区、轻链或重链的修饰,修饰后其氨基酸序列不同于衍生出该抗体的氨基酸序列。例如,衍生自同一指定蛋白质的氨基酸序列可以是与起始序列相似的,例如具有一定的百分比同一性,例如它可以与起始序列的百分比同一性是60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%。

[0069] 本发明中,“同一性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间序列比对时,所比较的两个序列中该百分比的碱基(或氨基酸)相同。可以使用本领域已知的软件程序来确定该比对和同源性百分比或序列同一性,比如Ausubel et al. eds. (2007) 在Current Protocols in Molecular Biology中所述的软件程序。优选使用默认参数进行比对。其中一种比对程

序是使用默认参数的BLAST。特别地，程序是BLASTN和BLASTP。

[0070] 在某些实施方案中，可在本文所提供抗体的Fc区引入氨基酸修饰，所述氨基酸修饰可以是一个或多个，以此产生Fc变体。Fc变体可包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰的人Fc区序列。

[0071] 适用于本发明的“抗体及其抗原结合片段”包括但不限于多克隆、单克隆、单价、双特异性、多特异性、重组、异源、嵌合、人源化、去免疫原性的抗体，或Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、单链抗体、纳米抗体和上述任一种的表位结合片段。

[0072] 在一些实施方案中，本发明的抗体可以是单特异的、双特异的或多特异性的。抗SIRPα抗体可以与另一种抗体或抗体片段连接以产生具有第二或更多结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0073] 在某些实施方案中，抗体可经进一步修饰以添加功能性组分，适合抗体衍生作用的部分包括但不限于以下实例，PEG、葡聚糖、蛋白质、脂类、治疗剂或毒素。抗体可以通过磷酸化、乙酰化、糖基化、聚乙二醇化、酰胺化、或与其它蛋白连接等进行修饰。

[0074] 肿瘤治疗方法和抗体用途

[0075] 本发明提供的抗SIRPα抗体及其抗原结合片段和包含其的药物组合物可用于诊断、预后、治疗或抑制癌症。本发明涉及向有需要的受试者施用本发明的抗SIRPα抗体或其片段而提供治疗受试者癌症的方法。本发明的治疗性化合物包括但不限于本发明所述抗体(包括本发明所述的变体和衍生物)和编码本发明所述抗体(包括本发明所述的变体和衍生物)的核酸或多核苷酸。

[0076] 本发明还提供了组合疗法，包括本发明所述抗SIRPα抗体和至少另外一种治疗剂联合使用，所述另外一种治疗剂包括但不限于化疗剂、放疗剂和生物大分子药物。在一个实施方案中，该生物大分子药物是靶向肿瘤细胞表面抗原的单克隆抗体药物，包括抗CD20抗体(如泽贝妥单抗、利妥昔单抗)、西妥昔单抗与曲妥珠单抗。

[0077] 本发明的抗体(以及任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方式给药，包括但不限于腹腔内、静脉内、皮下、鼻内、肌肉内注射。抗体及其变体或组合物可以通过任何方便的途径施用，例如通过推注或输注，通过上皮或皮肤黏膜的吸收。

[0078] 本发明示例下的抗SIRPα抗体序列

[0079] 表1: 本发明抗体的VH、VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3, VL、VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3的氨基酸序列编号

抗体编号	VH 序列编号	VH-CD R1 序列编号	VH-CD R2 序列编号	VH-CD R3 序列编号	VL 序列编号	VL-CD R1 序列编号	VL-CD R2 序列编号	VL-CD R3 序列编号
[0080] #4	1	3	4	5	6	8	9	10
#11	11	13	14	15	16	18	19	20
#13	21	23	24	25	26	28	29	30
#14	31	33	34	35	36	38	39	40

[0081] 表2: 本发明抗体的VH、VL DNA序列编号

抗体编号	VH DNA序列编号	VL DNA序列编号
------	------------	------------

#4	2	7
#11	12	17
#13	22	27
#14	32	37

[0083] 表3:本发明序列信息

SEQ ID NO.	名称	序列
1	#4 VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCRGSGFNKDYYIQWVQQAPGKGL EWMGWIDPENGDTKYAPKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSED TAVYYCYAKGPYWGQGTTLTVSS
2	#4 VH DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCC GGCGCCACCGTGAAGATCTCCTGCCGCGGCTCCGGCTTCAACAT CAAGGACTACTACATCCAGTGGGTGCAGCAGGCCCCCGGCAAG GGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCGACCCCGAGAACGGCGACA CCAAGTACGCCCCAAGTTCAGGGCCGCGTGACCATCACCGC CGACACCTCCACCGACACCGCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGC GCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCTACGCCAAGGGCCC CTACTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTCTCGAGC
3	#4 VH-CDR1	DYYIQ
4	#4 VH-CDR2	WIDPENGDTKYAPKFQG
5	#4 VH-CDR3	KGPY
6	#4 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYSSNQKNFLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITISSVKAEDLAVY YCQQYYSPPTFGGGTKLEIK
7	#4 VL	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCT GGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCAGTCCCTG TTCTACTCCTCCAACCAGAAGAACTTCCTGGCCTGGTACCAGCA GAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCC ACCCGCGAGTCCGGCGTGCCCGACCGCTTCACCGGCTCCGGCT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCGTGAAGGCCGA GGACCTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACTCCTACCCCC CCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTCGAGATAAAA
8	#4	KSSQSLFYSSNQKNFLA

[0084]

[0085]

	VL-CDR1	
9	#4 VL-CDR2	WASTRES
10	#4 VL-CDR3	QQYYSYPPT
11	#11 VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSHGVHWIRQPPGKALE WLAVIWSDGSTTYNSTLKSRLTISKDTSKSKVVLMTNMDPVDTA TYYCARHGNYHYNMDYWGQGLTVVSS
12	#11 VH	CAGGTGACCCTGAAGGAGTCCGGCCCCGTGCTGGTGAAGCCCA CCGAGACCCTGACCCTGACCTGCACCGTGTCCGGCTTCTCCCTG TCCTCCCACGGCGTGCACCTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAGG CCCTGGAGTGGCTGGCCGTGATCTGGTCCGACGGCTCCACCAC CTACAACTCCACCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCTCCAAGGACA CCTCCAAGTCCCAGGTGGTGCTGACCATGACCAACATGGACCC CGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCCCGCCACGGCAACTAC CACTACAACATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCG TCTCGAGC
13	#11 VH-CDR1	SHGVH
14	#11 VH-CDR2	VIWSDGSTTYNSTLKS
15	#11 VH-CDR3	HGNYHYNMDY
16	#11 VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRTSSRVNSGYLHWYQQKPGKAPK LLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSS YPWTFGGGTKLEIK
17	#11 VL	GACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCTTCTGTCGCGCTCCGT GGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCCGCACCTCCTCCCGCGTG AACTCCGGCTACCTGCACCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGG CCCCAAGCTGCTGATCTACTCCACCTCCACCCTGGCCTCCGGC GTGCCCTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGAGTTAC CCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACT ACTGCCAGCAGTACTCCTCCTACCCCTGGACCTTCGGCGGCGGC

[0086]

		ACCAAGCTCGAGATAAAA
18	#11 VL-CDR1	RTSSRVNSGYLH
19	#11 VL-CDR2	STSTLAS
20	#11 VL-CDR3	QQYSSYPWT
21	#13 VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDYSIHWVRQAPGQG LEWMGWINTETGEPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAE DTAVYYCSRGPLYRYDGYGLEYWGQGLVTVSS
22	#13 VH	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCTCCGAGCTGAAGAAGCCCCG GCGCCTCCGTGAAGGTGCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTC ACCGACTACTCCATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCGCCAGG GCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCGAGACCGGCGAGCC CACCTACGCCGACGACTTCAAGGGCCGCTTCGTGTTCTCCCTGG ACACCTCCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCTGCTCCCTGAAG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCTCCCGCGGCCCCCTGTA CCGCTACGACGGCTACGGCCTGGAGTACTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTCTCGAGC
23	#13 VH-CDR1	DYSIH
24	#13 VH-CDR2	WINTETGEPTYADDFKG
25	#13 VH-CDR3	GPLYRYDGYGLEY
26	#13 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDAWYQQKPGPPK LLIYYASNRCTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCHQD YISPYTFGGGTKLEIK
27	#13 VL	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCT GGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCTCCAGTCCGTG TCCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCC CCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCGCTGCACCGGCGTG CCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCT

[0087]

		GACCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACT GCCACCAGGACTACATCTCCCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACC AAGCTCGAGATAAAA
28	#13 VL-CDR1	KASQSVSNDVA
29	#13 VL-CDR2	YASNRCT
30	#13 VL-CDR3	HQDYISPYT
31	#14 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGYYWSWIRQHPGKGL EWIGYISYDGSRYNNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAREEYANYFAYWGQGTTTVTVSS
32	#14 VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCT AGCCAGACACTGTCTCTGACCTGCACAGTGAGCGGCGGCTCTAT CTCCAGCGGCTACTATTGGTCTTGGATCAGACAGCACCCAGGCA AGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATGATGGCAGCAGG TATAACAATCCTTCCCTGAAGAACCGGGTGACCATCTCTGTGGA CACATCCAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTGTCTTCCGTGACCG CCGCTGATACAGCCGTGTACTATTGCGCTCGCGAGGAGTACGCC AACTATTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACACAGTGACCGTGA GCTCT
33	#14 VH-CDR1	SGYYWS
34	#14 VH-CDR2	YISYDGSRYNNPSLKN
35	#14 VH-CDR3	EEYANYFAY
36	#14 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYSSNQKNFLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTLISSVKAEDLAVY YCQQYYSPPTFGQGTKLEIK
37	#14 VL	GATATCGTGATGACCCAGTCTCCTGACTCCCTGGCCGTGA GCCTGGGCGAGAGAGCTACAATCAACTGTAAGTCCAGCCA GTCTCTGTTCTACTCTTCCAACCAGAAGAATTTTCTGGCC

[0088]		TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCACCAGAGAGTCTGGAGTGCCTGACCGCTTCACCGGATCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCTGTGAAGGCCGAGGATCTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACTATTCTTATCCACCCACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTCGAGATCAAG	
	38	#14 VL-CDR1	KSSQSLFYSSNQKNFLA
	39	#14 VL-CDR2	WASTRES
	40	#14 VL-CDR3	QQYYSPPT

[0089] 表4#14抗体重链和轻链氨基酸序列

SEQ ID NO.	名称	序列
[0090] 41	#14 HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGYYWSWIRQHPGKGL EWIGYISYDGSRYNNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAREEYANYFAYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP CPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
42	#14 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYSSNQKNFLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVY YCQQYYSPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0091] 实施例1:抗SIRP $\alpha$ 抗体鼠单抗的制备

[0092] 本实施例描述了使用杂交瘤技术制备小鼠抗人SIRP $\alpha$ 单克隆抗体的方法。首先表达胞外区SIRP $\alpha$ 蛋白 (Uniprot:P78324) 作为免疫原,将胞外区SIRP $\alpha$ 蛋白氨基酸序列 (Glu31-Arg370) C末端添加Fc标签,然后克隆到V152载体 (华安单抗提供) 上,得到V152-SIRP $\alpha$ ECD-Fc。将其瞬时转染293细胞 (来源:ATCC),5天后收集细胞培养液,用protein A (厂家:Solarbio,货号:I8090) 纯化上清液。为制备抗人SIRP $\alpha$ 小鼠单克隆抗体,首先用100 $\mu$ g SIRP $\alpha$ 蛋白对4周龄的BAL B/c小鼠 (华安单抗提供) 进行免疫。首次免疫后的第14天和第28

天,用50 $\mu$ g SIRP $\alpha$ 蛋白对免疫后的小鼠进行再次免疫。采用ELISA法检测免疫后小鼠血清效价,将SIRP $\alpha$ 以1 $\mu$ g/ml的浓度稀释到PBS(厂家:中杉金桥,货号:ZLI-9062)中,包被微孔板4 $^{\circ}$ C过夜。然后用1%BSA-PBS封闭液37 $^{\circ}$ C封闭1h;PBST洗板后,将来自免疫小鼠的血清稀释液加入板中并37 $^{\circ}$ C孵育1小时。洗板加入HRP标记的山羊抗鼠IgG(厂家:Abcam,货号:Ab205719,1:10000稀释),37 $^{\circ}$ C反应0.5小时。洗板后加入TMB溶液(厂家:湖州英创,货号:TMB-S-00),室温避光反应5分钟,然后加入2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。置于酶标仪上450nm波长检测吸光度。在免疫后第42天,用50 $\mu$ gSIRP $\alpha$ 蛋白对有足够效价的抗SIRP $\alpha$ 抗体的小鼠进行加强免疫。3-5天后处死小鼠,收集脾细胞,用IMDM(厂家:上海源培,货号:L610KJ)基础培养基离心清洗细胞2-3次,然后按1:1比率与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0(华安单抗提供)混合,在混合的细胞中加入PEG(厂家:Roche,货号:25771700)并轻柔搅拌,37 $^{\circ}$ C静置30s。融合后的细胞稀释到含15%胎牛血清(厂家:浙江天杭生物,货号:11011-8611)、1 $\times$ HAT(厂家:Sigma,货号:H0262-1VL)的IMEM选择性培养基中,按200微升每孔加入到96孔细胞培养板中,放入5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C培养箱中。10-14天后用ELISA实验检测杂交瘤上清液中抗SIRP $\alpha$ 抗体。11不同的杂交瘤克隆被鉴定出来,包括10F11-5-6、1B6-1-1、27A11-1-8、14B11-5-4、31D4-4-5、7C2-3-8、30C1-6-4、4A3-5-1、6H1-8-6、9A12-5和10F4-15,并用于进一步分析。

[0093] 实施例2:鼠源抗体对SIRP $\alpha$ 的结合

[0094] 采用ELISA方法检测鼠源抗体与SIRP $\alpha$ 蛋白的结合能力,具体方法如实施例1所述,其中鼠源抗体起始浓度为10 $\mu$ g/ml,再用PBS进行3倍梯度稀释共得到7个梯度。结果见表5。

[0095] 表5:鼠源单克隆抗体与SIRP $\alpha$ 的结合活性EC50值

[0096]	抗体编号	克隆	ELISA EC50 (pM)
	mAb#4	10F11-5-6	4.22
	mAb#6	1B6-1-1	9.15
	mAb#11	27A11-1-8	5.47
	mAb#12	14B11-5-4	8.67
	mAb#13	31D4-4-5	6.77
[0097]	mAb#14	7C2-3-8	5.69
	mAb#15	30C1-6-4	10.31
	mAb#16	4A3-5-1	10.64
	mAb#17	6H1-8-6	11.93
	mAb#18	9A12-5	8.05
	mAb#19	10F4-15	8.66

[0098] 采用流式细胞实验(FACS)分析鼠源单抗与内源表达SIRP $\alpha$ 的人髓系白血病单核细胞(THP-1,来源:中国科学院细胞库)膜上SIRP $\alpha$ 的结合。将THP-1细胞与不同浓度的鼠源单抗(最高浓度为1 $\mu$ g/ml,3倍稀释,共7个浓度点)于4 $^{\circ}$ C反应30分钟。洗涤细胞2次后,加入FITC标记的山羊抗鼠IgG(厂家:Jackson,货号:115-095-003,1:1000稀释),4 $^{\circ}$ C避光反应30

分钟。洗涤细胞2次后,用流式细胞仪BD C6检测。结果见表6。

[0099] 表6:鼠源单克隆抗体与THP-1细胞结合的EC50值

抗体编号	克隆	FACS EC50 (pM)
mAb#4	10F11-5-6	139.22
mAb#6	1B6-1-1	231.81
mAb#11	27A11-1-8	125.84
mAb#12	14B11-5-4	211.43
mAb#13	31D4-4-5	144.27
mAb#14	7C2-3-8	128.72
mAb#15	30C1-6-4	128.70
mAb#16	4A3-5-1	232.4
mAb#17	6H1-8-6	544.21
mAb#18	9A12-5	212.34
mAb#19	10F4-15	220.11

[0101] 实施例3:鼠源抗SIRP $\alpha$ 抗体对SIRP $\alpha$ 与CD47结合的阻断作用

[0102] 根据实施例2的结果,综合鼠源单抗与SIRP $\alpha$ 的结合能力及与THP-1细胞的结合能力,mAb#4、mAb#11、mAb#13和mAb#14为活性最好的分子,因此选择mAb#4、mAb#11、mAb#13和mAb#14检测了这些鼠源单抗是否可以阻断SIRP $\alpha$ 与CD47的结合。将CD47-Fc(厂家:Acrobiosystems,货号:CD7-H5256)包被于96孔酶标板并4℃过夜;洗板后加入1%BSA-PBST封闭液,37℃封闭1h。将不同浓度的抗体(1.8nM起始,3倍稀释,共7个浓度)和生物素标记的SIRP $\alpha$ (厂家:Acrobiosystems,货号:CDA-H82F2)加入板上,37℃孵育1小时。洗板后加入HRP标记的链霉亲和素(厂家:Abcam,货号:ab7403),37℃反应0.5小时。洗板后,加入TMB溶液,室温避光反应30分钟,加入2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,酶标仪检测450nm波长吸光度。IgG(金斯瑞合成)作为实验对照。结果见图1,显示这些鼠源抗体均能不同程度地抑制SIRP $\alpha$ 与CD47的结合。

[0103] 实施例4:鼠源抗体的人源化

[0104] 根据实施例2和实施例3的结果,选择mAb#4、mAb#11、mAb#13和mAb#14进行人源化,将这些抗体的重链可变区和轻链可变区与可用的人IgG基因序列数据库进行比较,以鉴定最佳匹配的人种系Ig基因序列。具体地,mAb#4、mAb#11、mAb#13和mAb#14选择的人种系IgG重链分别为IGHV1-69-2\*01、IGHV2-26\*01、IGHV7-4-1\*01、IGHV4-31\*02,mAb#4、mAb#11、mAb#13和mAb#14选择的人种系IgG轻链分别为IGKV4-1\*01、IGKV1-9\*01、IGKV4-1\*01、IGKV4-1\*01。将mAb#4、mAb#11、mAb#13和mAb#14重链的CDR区移植到匹配的重链可变区基因的框架序列上,将mAb#4、mAb#11、mAb#13和mAb#14轻链的CDR区移植到匹配的轻链可变区基因的框架序列上。新的人源化分子分别命名为#4、#11、#13和#14。构建后,得到的各人源化抗体的重链可变区、轻链可变区以及CDR区的序列如表3所示。#14抗体的重链和轻链序列如表4所示。#4、#11和#13抗体的重链恒定区和轻链恒定区与#14抗体的重链恒定区和轻链恒定区一致。本领域技术人员根据上述披露的信息完全可以知晓#4、#11和#13抗体的重链和轻链的完整氨基酸序列。

[0105] 在293细胞(来源:ATCC)中表达并且纯化本发明的抗体。首先将抗体的重链和轻链

编码序列克隆到V152载体(华安单抗提供)中,然后采用转染试剂PEI(厂家:Polyscience,货号:23966-2)将带有抗体分子重链和轻链编码序列的V152载体转入293细胞中。在生物安全柜中准备质粒DNA和转染试剂,将质粒DNA和PEI(质量比:0.15:1.75)混匀后静置10min,将DNA和转染试剂的混合物轻轻倒入293细胞并混匀。在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养5天后,将细胞培养上清3000rpm离心10min。取上清液,用protein A(厂家:Solarbio,货号:I8090)纯化上清液,使抗体纯度>95%。

[0106] 实施例5:人源化抗体和SIRP $\alpha$ 蛋白的结合

[0107] 采用ELISA法检测人源化抗体和SIRP $\alpha$ 蛋白的结合。将SIRP $\alpha$ (厂家:Acrobiosystems,货号:SIA-H5225)以1 $\mu$ g/ml的浓度稀释到PBS中,包被微孔板4℃过夜。然后用1%BSA-PBS封闭液37℃封闭1h;PBST洗板后,将人源化抗体稀释到不同浓度(1.8nM起始,3倍稀释,共11个浓度)加入板中并37℃孵育1小时。洗板加入HRP标记的山羊抗人IgG(厂家:Abcam,货号Ab98595,1:10000稀释),37℃反应0.5小时。洗板后加入TMB溶液,室温避光反应5分钟,然后加入2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。置于酶标仪上450nm波长检测吸光度。结果见图2, #4、#11、#13和#14抗体与SIRP $\alpha$ 结合的EC50值分别为:1.833nM、0.4642nM、0.9517nM、0.6831nM,表明这些人源化分子均与SIRP $\alpha$ 具有较高的结合活性。

[0108] 实施例6:人源化抗SIRP $\alpha$ 抗体对SIRP $\alpha$ 与CD47结合的阻断作用

[0109] 按实施例3所述方法检测人源化抗SIRP $\alpha$ 抗体#4、#11、#13和#14对SIRP $\alpha$ 与CD47结合的阻断作用,结果见图3, #4、#11、#13和#14抗体的IC50分别为:6.03nM、0.2086nM、1.5nM和0.1315nM,显示这些人源化抗体均能有效阻断SIRP $\alpha$ 与CD47的结合,其中#11和#14相比其它人源化抗体具有更强的阻断作用。

[0110] 用KWAR23作为阳性对照,根据US2018037652公开的序列(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2)产生KWAR23,进一步比较了#14抗体和KWAR23对SIRP $\alpha$ 与CD47结合的阻断作用。结果如图4所示, #14抗体的IC50值为3.404nM, KWAR23的IC50值为13.54nM,表明#14抗体对SIRP $\alpha$ 和CD47的阻断作用强于KWAR23。

[0111] 实施例7:抗体与SIRP $\alpha$ 的结合动力学

[0112] 抗体对抗原结合动力学采用Octet Red96(厂家:ForteBio)为测试仪器,选用H1S1K生物传感器(厂家:ForteBio)为测试传感器,可用其直接捕获抗原,紧接着将该传感器浸于分析物样品(抗体)中。本实验共运行五个步骤:1、Baseline(100s), 2、Loading(捕获抗原SIRP $\alpha$ )(500s), 3、Baseline(100s), 4、Association(结合抗体)(500s), 5、Dissociation(抗体解离)(1000s)。测试完成后使用再生缓冲液(甘氨酸, pH 1.5)与中和缓冲液(PBS)交替浸润5秒,共循环五次对传感器进行再生。本实验中的运行缓冲液为PBS。

[0113] 样品处理:使用运行缓冲液将抗原SIRP $\alpha$ 蛋白稀释至2.5 $\mu$ g/mL的工作浓度,以及将分析物样品(#14抗体和KWAR23)梯度稀释为五个工作浓度:1 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml、0.125 $\mu$ g/ml、0.0625 $\mu$ g/ml。数据分析使用Octet Data Analysis(version 7.0 or the latest)计算响应信号值(偶联的分析物样品信号扣减掉空白的分析物样品信号),并使用1:1结合模型拟合数据。

[0114] 结合动力学拟合图见图5,结合常数、解离常数以及平衡常数见表7。可见#14抗体具有极高的亲和力,亲和力与阳性对照抗体KWAR23相当。

[0115] 表7:#14抗体和KWAR23与SIRP $\alpha$ 的结合动力学

[0116]	样品名称	Kon	Koff	KD (M)
	#14	$1.33 \times 10^6$	$2.89 \times 10^{-5}$	$2.173 \times 10^{-11}$
	KWAR23	$2.90 \times 10^6$	$1.48 \times 10^{-4}$	$5.094 \times 10^{-11}$

[0117] 实施例8:本发明抗SIRP $\alpha$ 抗体对巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的促进作用取PBMC细胞(厂家:Allcells,货号:PB004F-C)用1640基础培养基(厂家:Gibco,货号:22400-089)在5% CO<sub>2</sub>、37°C下培养2~3小时,轻轻吸去未贴壁细胞,加入诱导培养基(80ng/ml M-CSF)开始诱导。每隔3天更换含有足量细胞因子的新鲜培养基。培养至第7天得巨噬细胞。将Raji细胞(来源:中国科学院细胞库)按CFSE试剂(厂家:Abcam,货号:AB113853)的说明进行荧光标记。将标记好的靶细胞Raji细胞和上述已经完成分化的巨噬细胞以3:1混合均匀,同时加入抗CD20抗体(泽贝妥单抗(Zuberitamab),CAS RN:2251143-19-6,WHO Drug Information, Vol33, No.4, 2019, 914-915),浓度:0.05 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml,厂家:海正博锐),或抗CD20抗体(浓度:0.05 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml)和#14抗体(浓度:10 $\mu$ g/ml)的组合,或抗CD20抗体(浓度:0.05 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml)和KWAR23抗体(浓度:10 $\mu$ g/ml)的组合,于37°C,5%CO<sub>2</sub>下培养4小时。PBS洗涤细胞后,加入抗-CD14-APC(厂家:BD Biosciences,货号:555399)后在4°C避光孵育30min。将细胞洗涤后通过流式细胞术分析,吞噬率按如下公式计算:吞噬率(%)=(APC+CFSE)阳性细胞比例/APC阳性细胞比例\*100%。图6显示#14抗体能够增强抗CD20抗体对Raji细胞的吞噬能力。

[0118] 实施例9:本发明抗SIRP $\alpha$ 抗体诱导细胞表面SIRP $\alpha$ 发生内吞

[0119] 将THP-1细胞(来源:中国科学院细胞库)与10 $\mu$ g/ml抗体于4°C反应30分钟后,洗涤细胞2次,将细胞分成两份,一份细胞置于37°C孵育4h,一份细胞继续置于4°C作为对照细胞。洗涤细胞2次后,加入FITC标记羊抗人IgG(厂家:Abcam,货号:ab97224),4°C避光反应30分钟。将细胞洗涤后通过流式细胞术分析,根据37°C相对于4°C条件下细胞表面荧光的减少计算内吞率。内吞率按如下公式计算:内吞率(%)=(4°C荧光强度MFI-37°C荧光强度MFI)/4°C荧光强度MFI\*100%。

[0120] 表8显示#14抗体的内吞率为52.9%,而KWAR23的内吞率为34.7%,表明#14抗体能更有效地降低细胞表面SIRP $\alpha$ 的表达水平。

[0121] 表8:#14和KWAR23对THP-1细胞膜上SIRP $\alpha$ 的内吞率

[0122]	样品	内吞率(%)
	#14	52.9
	KWAR23	34.7

[0123] 实施例10:本发明抗SIRP $\alpha$ 抗体抑制肿瘤生长

[0124] 在hCD47-MC38小鼠结肠癌肿瘤模型中评估了#14抗体的抗肿瘤药效。将hCD47-MC38细胞(来源:南方模式生物)接种hSIRP $\alpha$ /hCD47双人源化C57BL/6小鼠(来源:南方模式生物)。肿瘤体积长到150mm<sup>3</sup>左右时,通过腹腔注射给小鼠施用#14抗体(200 $\mu$ g/只),对照使用等量PBS溶液,每周给药两次。结果如图7所示,和对照组相比,#14抗体可持续抑制肿瘤的生长。

[0125] 评估了#14抗体和抗CD20抗体(泽贝妥单抗,来源:海正博锐)联合使用在淋巴瘤模型中的抗肿瘤药效。将Raji-Luc细胞(来源:百奥赛图)尾静脉接种B-NDG-hSIRP A小鼠(来源:百奥赛图),平均成像信号强度达到1 $\times 10^6$ p/sec左右时,对小鼠施用指定剂量的IgG对

照(百奥赛图提供,200 $\mu$ g/只)、单独的#14抗体(200 $\mu$ g/只)、单独的抗CD20抗体(2 $\mu$ g/只)、#14抗体(200 $\mu$ g/只)加上抗CD20抗体(2 $\mu$ g/只)。如图8显示,#14抗体和抗CD20抗体能发挥协同的抗肿瘤作用。



[0039] ccctactggg gccagggcac caccctgacc gtctcgagc 339  
 [0040] <210> 3  
 [0041] <211> 5  
 [0042] <212> PRT  
 [0043] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0044] <400> 3  
 [0045] Asp Tyr Tyr Ile Gln  
 [0046] 1 5  
 [0047] <210> 4  
 [0048] <211> 17  
 [0049] <212> PRT  
 [0050] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0051] <400> 4  
 [0052] Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln  
 [0053] 1 5 10 15  
 [0054] Gly  
 [0055] <210> 5  
 [0056] <211> 4  
 [0057] <212> PRT  
 [0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0059] <400> 5  
 [0060] Lys Gly Pro Tyr  
 [0061] 1  
 [0062] <210> 6  
 [0063] <211> 113  
 [0064] <212> PRT  
 [0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0066] <400> 6  
 [0067] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0068] 1 5 10 15  
 [0069] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser  
 [0070] 20 25 30  
 [0071] Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0072] 35 40 45  
 [0073] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 [0074] 50 55 60  
 [0075] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 [0076] 65 70 75 80  
 [0077] Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

[0078]		85	90	95
[0079]	Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
[0080]		100	105	110
[0081]	Lys			
[0082]	<210> 7			
[0083]	<211> 339			
[0084]	<212> DNA			
[0085]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0086]	<400> 7			
[0087]	gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ccctgggcca gcgcgccacc 60			
[0088]	atcaactgca agtcctccca gtccctgttc tactcctcca accagaagaa cttcctggcc 120			
[0089]	tggtaccagc agaagcccg ccagccccc aagctgctga tctactgggc ctccaccgc 180			
[0090]	gagtcggcg tgcccgaccg cttcaccggc tccggtccg gcaccgactt caccctgacc 240			
[0091]	atctctccg tgaaggcca ggacctggcc gtgtactact gccagcagta ctactcctac 300			
[0092]	ccccccacct tcggcgcgcg caccaagctc gagataaaa 339			
[0093]	<210> 8			
[0094]	<211> 17			
[0095]	<212> PRT			
[0096]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0097]	<400> 8			
[0098]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu			
[0099]	1 5 10 15			
[0100]	Ala			
[0101]	<210> 9			
[0102]	<211> 7			
[0103]	<212> PRT			
[0104]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0105]	<400> 9			
[0106]	Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser			
[0107]	1 5			
[0108]	<210> 10			
[0109]	<211> 9			
[0110]	<212> PRT			
[0111]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0112]	<400> 10			
[0113]	Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr			
[0114]	1 5			
[0115]	<210> 11			
[0116]	<211> 118			

- [0117] <212> PRT
- [0118] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0119] <400> 11
- [0120] Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu  
 [0121] 1 5 10 15  
 [0122] Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His  
 [0123] 20 25 30  
 [0124] Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu  
 [0125] 35 40 45  
 [0126] Ala Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Thr Leu Lys  
 [0127] 50 55 60  
 [0128] Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu  
 [0129] 65 70 75 80  
 [0130] Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 [0131] 85 90 95  
 [0132] Arg His Gly Asn Tyr His Tyr Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0133] 100 105 110  
 [0134] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0135] 115
- [0136] <210> 12
- [0137] <211> 354
- [0138] <212> DNA
- [0139] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0140] <400> 12
- [0141] caggtgaccc tgaaggagtc cggccccgtg ctggtgaagc ccaccgagac cctgaccctg 60  
 [0142] acctgcaccg tgtccggctt ctccctgtcc tcccacggcg tgcactggat ccgccagccc 120  
 [0143] cccggcaagg ccctggagtg gctggccgtg atctggtccg acggctccac cacctacaac 180  
 [0144] tccaccctga agtcccgcct gaccatctcc aaggacacct ccaagtccca ggtggtgctg 240  
 [0145] accatgacca acatggaccc cgtggacacc gccacctact actgcgcccc ccacggcaac 300  
 [0146] taccactaca acatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtctc gagc 354
- [0147] <210> 13
- [0148] <211> 5
- [0149] <212> PRT
- [0150] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0151] <400> 13
- [0152] Ser His Gly Val His  
 [0153] 1 5  
 [0154] <210> 14  
 [0155] <211> 16

[0156] <212> PRT  
 [0157] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0158] <400> 14  
 [0159] Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Thr Leu Lys Ser  
 [0160] 1 5 10 15  
 [0161] <210> 15  
 [0162] <211> 10  
 [0163] <212> PRT  
 [0164] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0165] <400> 15  
 [0166] His Gly Asn Tyr His Tyr Asn Met Asp Tyr  
 [0167] 1 5 10  
 [0168] <210> 16  
 [0169] <211> 108  
 [0170] <212> PRT  
 [0171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0172] <400> 16  
 [0173] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0174] 1 5 10 15  
 [0175] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Ser Arg Val Asn Ser Gly  
 [0176] 20 25 30  
 [0177] Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 [0178] 35 40 45  
 [0179] Ile Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 [0180] 50 55 60  
 [0181] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 [0182] 65 70 75 80  
 [0183] Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro  
 [0184] 85 90 95  
 [0185] Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0186] 100 105  
 [0187] <210> 17  
 [0188] <211> 324  
 [0189] <212> DNA  
 [0190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0191] <400> 17  
 [0192] gacatccagc tgaccagtc ccctccttc ctgtccgct ccgtagggcga ccgctgacc 60  
 [0193] atcacctgcc gcacctctc ccgctgaac tccgctacc tgcactggta ccagcagaag 120  
 [0194] cccggcaagg cccccaagct gctgatctac tccacctca ccctggcctc cggcgtgcc 180

[0195] tccccgtttct ccggctccgg ctccggcacc gagttcaccc tgaccatctc ctcctgcag 240  
 [0196] cccgaggact tcgccaccta ctactgccag cagtactect cctacccttg gaccttcggc 300  
 [0197] ggcggcacca agctcgagat aaaa 324  
 [0198] <210> 18  
 [0199] <211> 12  
 [0200] <212> PRT  
 [0201] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0202] <400> 18  
 [0203] Arg Thr Ser Ser Arg Val Asn Ser Gly Tyr Leu His  
 [0204] 1 5 10  
 [0205] <210> 19  
 [0206] <211> 7  
 [0207] <212> PRT  
 [0208] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0209] <400> 19  
 [0210] Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser  
 [0211] 1 5  
 [0212] <210> 20  
 [0213] <211> 9  
 [0214] <212> PRT  
 [0215] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0216] <400> 20  
 [0217] Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr  
 [0218] 1 5  
 [0219] <210> 21  
 [0220] <211> 122  
 [0221] <212> PRT  
 [0222] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0223] <400> 21  
 [0224] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0225] 1 5 10 15  
 [0226] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0227] 20 25 30  
 [0228] Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0229] 35 40 45  
 [0230] Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 [0231] 50 55 60  
 [0232] Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 [0233] 65 70 75 80

[0234]	Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0235]	85 90 95
[0236]	Ser Arg Gly Pro Leu Tyr Arg Tyr Asp Gly Tyr Gly Leu Glu Tyr Trp
[0237]	100 105 110
[0238]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0239]	115 120
[0240]	<210> 22
[0241]	<211> 366
[0242]	<212> DNA
[0243]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0244]	<400> 22
[0245]	caggtgcagc tgggtgcagtc cggctccgag ctgaagaagc ccggcgcctc cgtgaaggtg 60
[0246]	tcttgcaagg cctccggcta caccttcacc gactactcca tccactgggt gcgccaggcc 120
[0247]	cccggccagg gcttggagtg gatgggctgg atcaacaccg agaccggcga gccacacctac 180
[0248]	gccgacgact tcaagggccg ctctcgtgttc tccctggaca cctccgtgtc caccgcctac 240
[0249]	ctgcagatct gctccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcgccccc 300
[0250]	ctgtaccgct acgacggcta cggcctggag tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtc 360
[0251]	tcgagc 366
[0252]	<210> 23
[0253]	<211> 5
[0254]	<212> PRT
[0255]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0256]	<400> 23
[0257]	Asp Tyr Ser Ile His
[0258]	1 5
[0259]	<210> 24
[0260]	<211> 17
[0261]	<212> PRT
[0262]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0263]	<400> 24
[0264]	Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
[0265]	1 5 10 15
[0266]	Gly
[0267]	<210> 25
[0268]	<211> 13
[0269]	<212> PRT
[0270]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0271]	<400> 25
[0272]	Gly Pro Leu Tyr Arg Tyr Asp Gly Tyr Gly Leu Glu Tyr

[0273]	1	5	10
[0274]	<210>	26	
[0275]	<211>	107	
[0276]	<212>	PRT	
[0277]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0278]	<400>	26	
[0279]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0280]	1	5	10 15
[0281]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp		
[0282]		20	25 30
[0283]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile		
[0284]		35	40 45
[0285]	Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Cys Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
[0286]		50	55 60
[0287]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala		
[0288]		65	70 75 80
[0289]	Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Asp Tyr Ile Ser Pro Tyr		
[0290]		85	90 95
[0291]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0292]		100	105
[0293]	<210>	27	
[0294]	<211>	321	
[0295]	<212>	DNA	
[0296]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0297]	<400>	27	
[0298]	gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ccctgggcca ggcgccacc	60	
[0299]	atcaactgca aggcctcca gtccgtgtcc aacgacgtgg cctggtacca gcagaagccc	120	
[0300]	ggccagcccc ccaagctgct gatctactac gcctccaacc gctgcaccgg cgtgcccgac	180	
[0301]	cgcttctccg gctccggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatctcctc cctgcaggcc	240	
[0302]	gaggacgtgg cctgtacta ctgccaccag gactacatct ccccctacac cttcggcggc	300	
[0303]	ggcaccaagc tcgagataaa a	321	
[0304]	<210>	28	
[0305]	<211>	11	
[0306]	<212>	PRT	
[0307]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0308]	<400>	28	
[0309]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala		
[0310]	1	5	10
[0311]	<210>	29	

[0312] <211> 7  
 [0313] <212> PRT  
 [0314] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0315] <400> 29  
 [0316] Tyr Ala Ser Asn Arg Cys Thr  
 [0317] 1 5  
 [0318] <210> 30  
 [0319] <211> 9  
 [0320] <212> PRT  
 [0321] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0322] <400> 30  
 [0323] His Gln Asp Tyr Ile Ser Pro Tyr Thr  
 [0324] 1 5  
 [0325] <210> 31  
 [0326] <211> 118  
 [0327] <212> PRT  
 [0328] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0329] <400> 31  
 [0330] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [0331] 1 5 10 15  
 [0332] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
 [0333] 20 25 30  
 [0334] Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 [0335] 35 40 45  
 [0336] Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Pro Ser Leu  
 [0337] 50 55 60  
 [0338] Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 [0339] 65 70 75 80  
 [0340] Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0341] 85 90 95  
 [0342] Ala Arg Glu Glu Tyr Ala Asn Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0343] 100 105 110  
 [0344] Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0345] 115  
 [0346] <210> 32  
 [0347] <211> 354  
 [0348] <212> DNA  
 [0349] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0350] <400> 32

[0351] caggtgcagc tgcaggagag cggaccagga ctggtgaagc ctagccagac actgtctctg 60  
 [0352] acctgcacag tgagcggcgg ctctatctcc agcggctact attggtcttg gatcagacag 120  
 [0353] caccagga aggccctgga gtggatcggc tacatctcct atgatggcag caggataaac 180  
 [0354] aatccttccc tgaagaaccg ggtgaccatc tctgtggaca catccaagaa tcagttcagc 240  
 [0355] ctgaagctgt cttccgtgac cgccgctgat acagccgtgt actattgagc tcgagaggag 300  
 [0356] tacgccaact atttcgctta ctggggccag ggcaccacag tgaccgtgag ctct 354  
 [0357] <210> 33  
 [0358] <211> 6  
 [0359] <212> PRT  
 [0360] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0361] <400> 33  
 [0362] Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser  
 [0363] 1 5  
 [0364] <210> 34  
 [0365] <211> 16  
 [0366] <212> PRT  
 [0367] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0368] <400> 34  
 [0369] Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
 [0370] 1 5 10 15  
 [0371] <210> 35  
 [0372] <211> 9  
 [0373] <212> PRT  
 [0374] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0375] <400> 35  
 [0376] Glu Glu Tyr Ala Asn Tyr Phe Ala Tyr  
 [0377] 1 5  
 [0378] <210> 36  
 [0379] <211> 113  
 [0380] <212> PRT  
 [0381] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0382] <400> 36  
 [0383] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0384] 1 5 10 15  
 [0385] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser  
 [0386] 20 25 30  
 [0387] Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0388] 35 40 45  
 [0389] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[0390]	50	55	60	
[0391]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
[0392]	65	70	75	80
[0393]	Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
[0394]		85	90	95
[0395]	Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
[0396]		100	105	110
[0397]	Lys			
[0398]	<210> 37			
[0399]	<211> 339			
[0400]	<212> DNA			
[0401]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0402]	<400> 37			
[0403]	gatatcgtga tgaccagtc tctgactcc ctggccgtga gcctgggcca gagagctaca	60		
[0404]	atcaactgta agtccagcca gtctctgttc tactcttcca accagaagaa ttttctggcc	120		
[0405]	tggtatcagc agaagcccgg ccagccccct aagctgctga tctactgggc tagcaccaga	180		
[0406]	gagtctggag tgccagaccg cttcaccgga tccggaagcg gaacagactt caccctgaca	240		
[0407]	atcagctctg tgaaggcca ggatctggcc gtgtactatt gccagcagta ctattcttat	300		
[0408]	ccaccacct tcggccaggg cacaaagctc gagatcaag	339		
[0409]	<210> 38			
[0410]	<211> 17			
[0411]	<212> PRT			
[0412]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0413]	<400> 38			
[0414]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu			
[0415]	1	5	10	15
[0416]	Ala			
[0417]	<210> 39			
[0418]	<211> 7			
[0419]	<212> PRT			
[0420]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0421]	<400> 39			
[0422]	Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser			
[0423]	1	5		
[0424]	<210> 40			
[0425]	<211> 9			
[0426]	<212> PRT			
[0427]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0428]	<400> 40			





[0507]	Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0508]	85 90 95
[0509]	Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0510]	100 105 110
[0511]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
[0512]	115 120 125
[0513]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
[0514]	130 135 140
[0515]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
[0516]	145 150 155 160
[0517]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
[0518]	165 170 175
[0519]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
[0520]	180 185 190
[0521]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
[0522]	195 200 205
[0523]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0524]	210 215 220

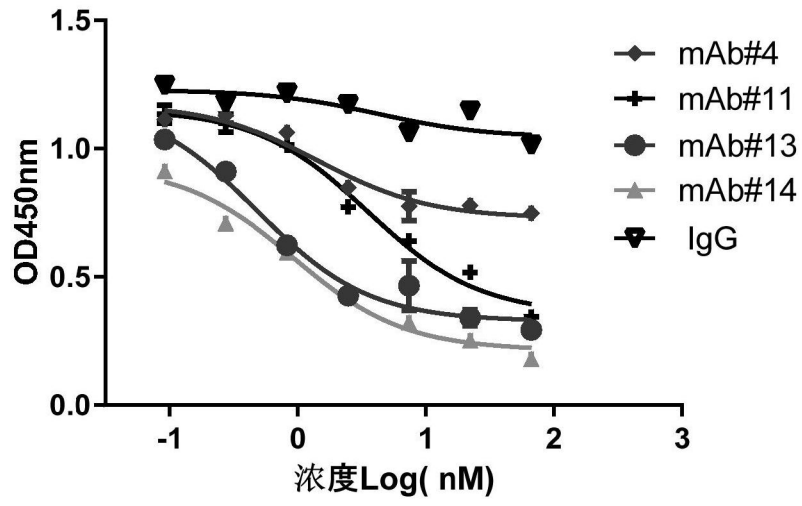


图1

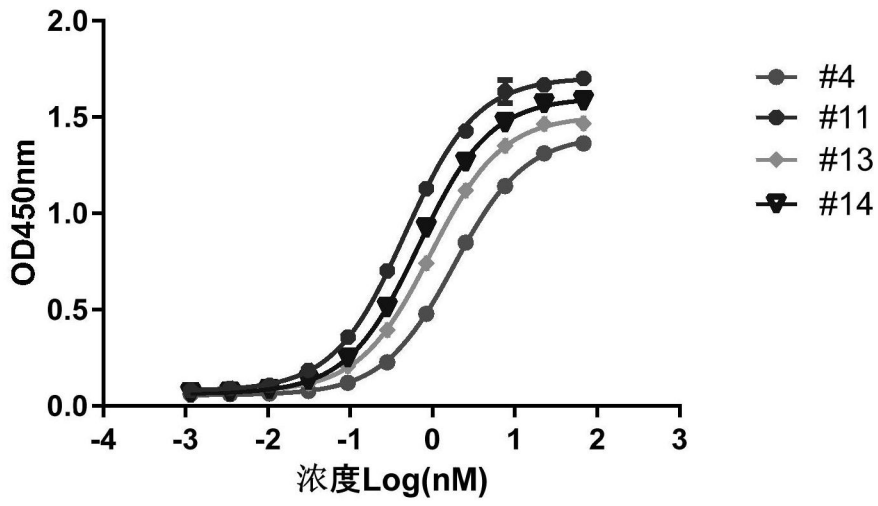


图2

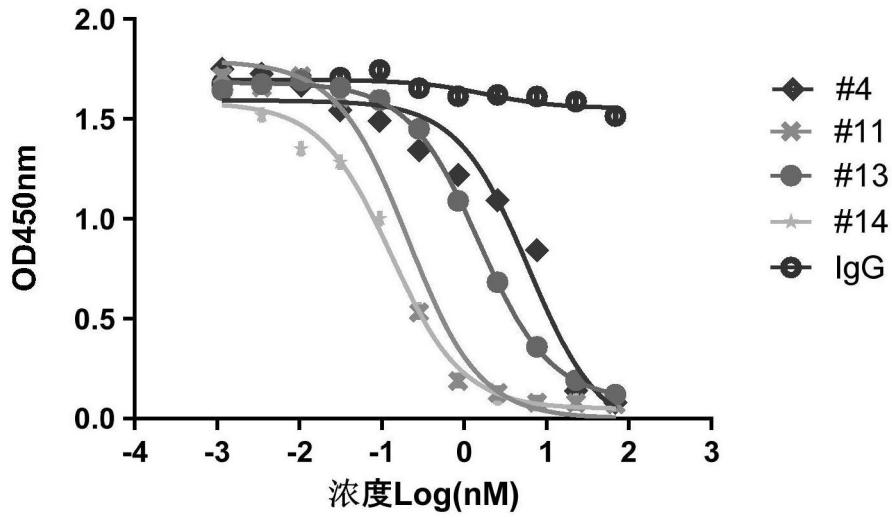


图3

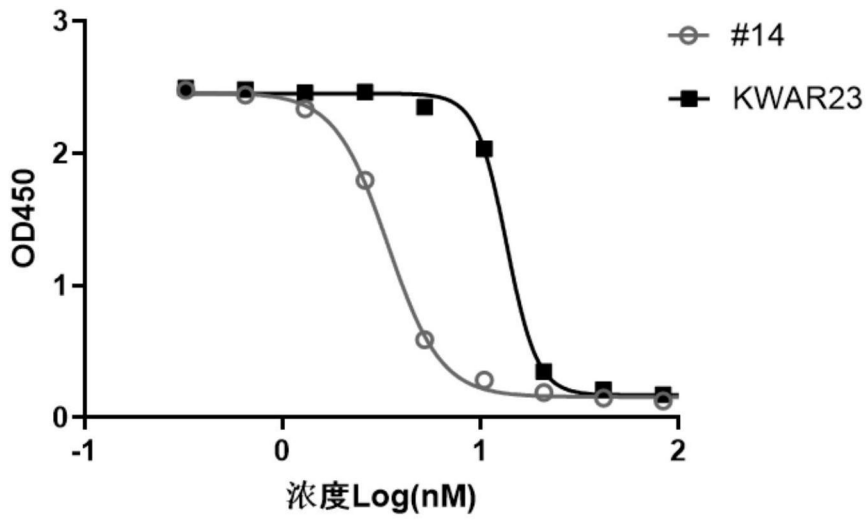


图4

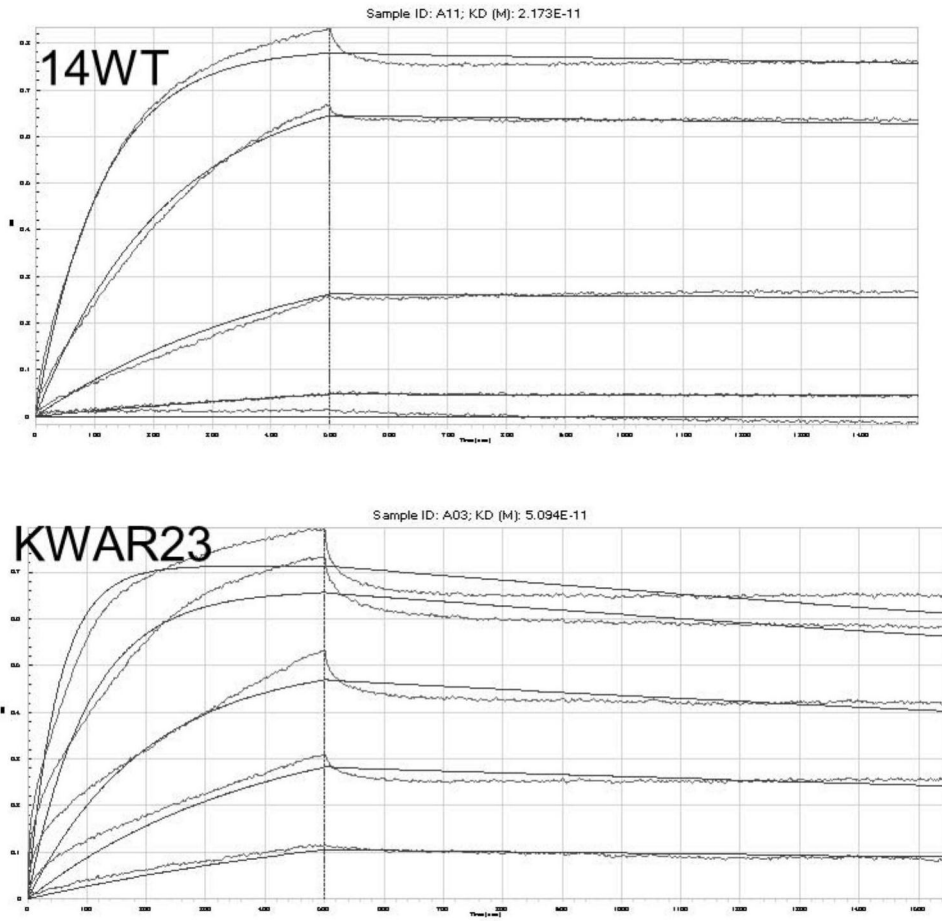


图5

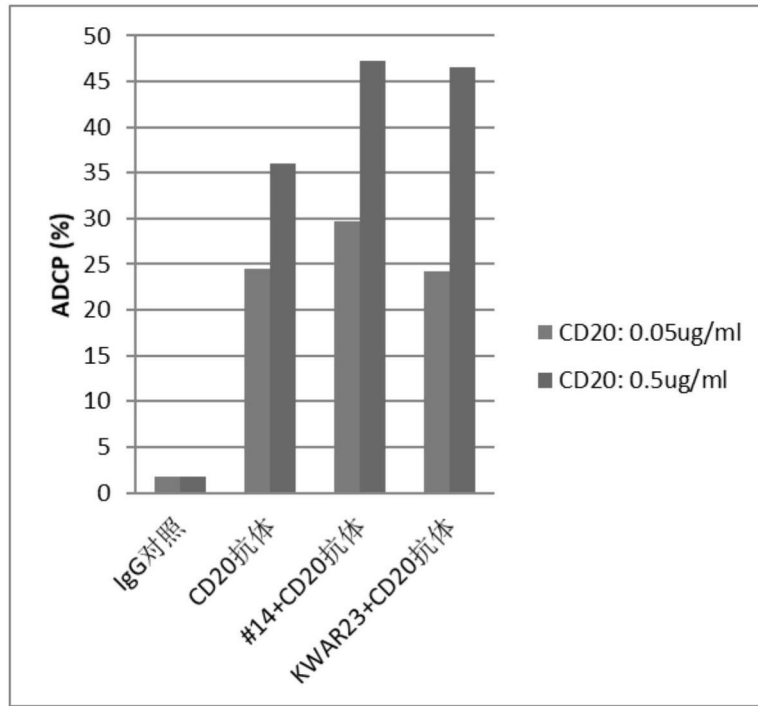


图6

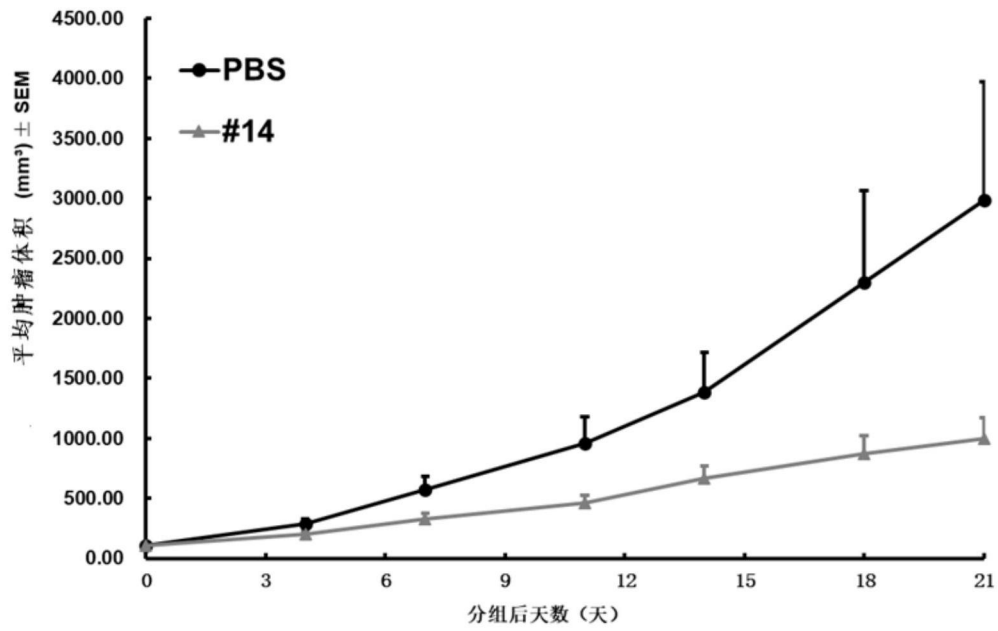


图7

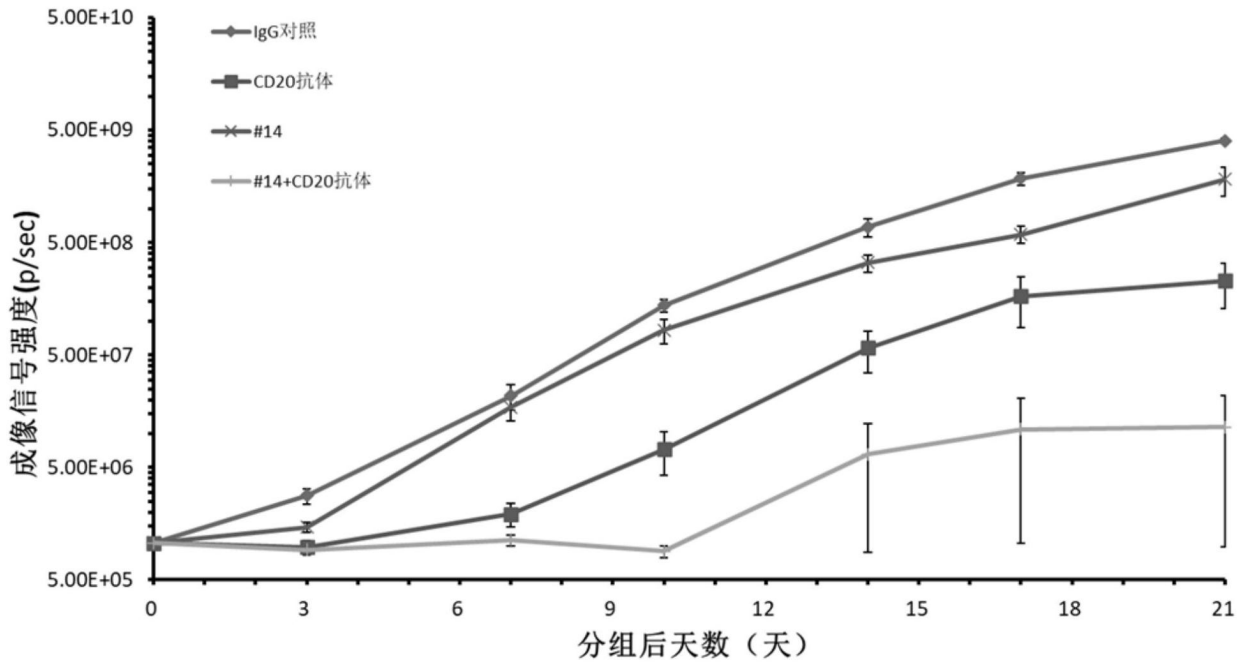


图8