

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03120599.2

C12N 5/16

C12N 15/12 C12P 21/08

A61K 39/395 A61P 15/18

A61P 15/04

[43] 公开日 2004 年 9 月 22 日

[11] 公开号 CN 1530440A

[22] 申请日 2003.3.14 [21] 申请号 03120599.2

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 阎锡蕴 刘 琴 林 芸

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 胡交宇

权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 15 页

[54] 发明名称 一种单克隆抗体、其编码基因、用途以及分泌它的杂交瘤细胞系

[57] 摘要

本发明提供了一种分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞系，其保藏编号为 CGMCC0491。本发明还提供了所述的杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体，编码它们的基因和它们的用途。

1. 一种分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞系，其保藏编号为
5 CGMCC0491。
2. 一种由权利要求 1 所述的杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体。
3. 按照权利要求 2 所述的单克隆抗体，其中，所述抗体的重链可变区具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述抗体的轻链可变区具有 SEQ
10 ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
4. 按照权利要求 2 所述的单克隆抗体的 Fab 片段，其中，该 Fab 片段的 Fab 轻链具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，该 Fab 片段的 Fab 重链具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。
5. 按照权利要求 2 所述的单克隆抗体的单链抗体，其中，该单链抗
15 体具有 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。
6. 一种编码权利要求 2 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体的核苷酸序列。
7. 权利要求 1 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体，或者衍生于这种
20 单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在制备用于肿瘤诊断和导向治疗的药物中的应用。
8. 权利要求 1 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在药物筛选和肿瘤疫苗中的应用。
- 25 9. 权利要求 1 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在制备阻止早期妊娠和避孕方面的药物中的应用。
10. 权利要求 1 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在制备治疗与
30 新生血管有关的疾病的药物中的应用。

一种单克隆抗体、其编码基因、用途以及 分泌它的杂交瘤细胞系

5

发明领域

本发明涉及一种分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞系，一种单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体，
10 编码它们的基因和它们的用途。这类抗体通过与 CD146 分子相互作用能够抑制肿瘤生长和转移，终止早期妊娠。因此，它们可以用于与血管生成有关疾病的诊断和治疗，是一类新型的避孕和流产药物。

发明背景

15 肿瘤是一种与血管生成有关的疾病，是当前危害人类生命健康的头号杀手。我国每年恶性肿瘤的发病人数约 160 万。死于癌症者占死亡总人数的 20%以上，居城市居民死亡原因的第一位（根据 1996 年统计资料）。目前缺乏对肿瘤进行早期特异性诊断的方法。在肿瘤治疗中，三大常规（放疗，化疗和手术）是首选，药物治疗是一个重要方面。由于大多数
20 肿瘤化疗药物不是针对肿瘤细胞的特异性作用，因此副作用大而且容易产生耐药性。此外影响肿瘤药物治疗效果的因素还包括药物的运输方式和渗透性等，这是目前肿瘤治疗学急需解决的关键问题。本研究首次发现 CD146 分子特异分布于新生血管内皮细胞，在新生血管生成过程中起着非常重要的作用。血管生成在生理和病理条件下均可发生。病理条件下的血管生成包括肿瘤、糖尿病视网膜病变、类风湿性关节炎等，生理
25 条件下的血管生成包括胚胎发育和伤口愈合等。

本发明的特色之一在于发现 CD146 分子选择性地表达在肿瘤新生血管，因此它可以作为一个肿瘤血管特征性标志物用于肿瘤的诊断。在治疗方面，本发明所采取的策略是通过干扰 CD146 在血管生成方面的作用，从而
30 阻断肿瘤区的营养和氧供应，使肿瘤细胞缺血坏死^[1]。本发明与传统的

抗肿瘤抗体相比，其特点在于抗 CD146 抗体是一类高效、广谱、无毒或低毒、无耐药性的新型抗癌药物。作用机理如下，(1) 肿瘤血管内皮细胞相对比较稳定，突变少，因此抗肿瘤血管药物不会象抗肿瘤细胞药物那样易产生耐药性；(2) 不同类型实体瘤的特异靶分子不同，而它们赖以生存的新生血管结构大致相同，因此抗肿瘤新生血管抗体具有广谱性，即一种抗肿瘤血管药物可以应用于多种肿瘤的治疗；(3) 成千上万个肿瘤细胞依赖于一条毛细血管获取氧和营养物质，即使少量药物对于血管的不完全破坏，亦会造成血栓形成，导致大量肿瘤细胞缺血死亡。因此本发明用药量少，效率高；(4) 肿瘤血管药物直接作用于血管内皮，无需穿透到肿瘤深部，避免了肿瘤组织局部高压所引起的药物渗透和分布问题；(5) 抗体选择性地破坏肿瘤血管而非正常血管，这种高度药物靶向特异性将大大减少药物的毒付作用。

本发明的特色之二在于发现 CD146 分子特异分布于滋养层细胞，在胚胎植入和胎盘建立过程中起着非常重要的作用。目前避孕药物的作用机理主要是通过干预胚泡植入过程。胚泡侵入到母体子宫内的过程(简称植入)，是一个受到母体孕酮和雌激素的共同控制过程。胚胎植入的顺利进行，一方面要求胚泡从透明带孵育出来，处于活化状态，另一方面还要求母体的子宫处于接受状态，能够接受胚泡的植入。这两方面在时间和空间需要高度的协调一致，否则将导致胚泡植入失败，造成流产^[2,3]。

研制新型避孕药物的关键是寻找在胚胎植入过程中起关键作用的新型药物靶分子。作为一个有应用前景的避孕药物靶点要具备以下 2 个基本条件(1) 特异性：避孕候选药物靶点必需只在胚泡植入过程中起关键作用，而对其他器官没有重要作用，否则会增加药物的副作用；(2) 通用性：由于不同的种属的胚泡植入和早期胎盘形成的方式差异很大，因此最好选用一个避孕靶点能够应用于多个种属植入过程。

我们首次发现 CD146 是一个非常理想的避孕药物靶分子，具备上述两个条件：(1) CD146 是一个非常保守的通用靶分子，人和小鼠的 CD146 mRNA 序列同源性达到 82%以上，它在人和小鼠的胚泡植入中都起重要作用；(2) CD146 分子在血管内皮和胚胎滋养层细胞^[4]上高表达，这保证了 CD146 作为避孕靶分子的特异性。我们发现抗 CD146 抗体能够有效阻断小

鼠胚胎植入，造成小鼠流产率达 80%以上，这一发现为避孕药物的开发提供了新的途径和新型候选药物。进一步分析抗 CD146 抗体的作用机制，我们发现：（1）抗 CD146 抗体抑制小鼠滋养层细胞黏附和迁移；（2）抑制小鼠滋养层细胞分泌金属蛋白酶，从而抑制胚胎外围的滋养层细胞侵入到母体子宫内；（3）抑制母体蜕膜的血管生成，导致胚胎发育滞后。在动物实验中，对妊娠期小鼠注射抗 CD146 抗体后，不仅造成流产现象，而且母体子宫蜕膜中的血管密度与对照组相比明显减少。这些试验结果为避孕药物的开发提供了新思路和新靶点，抗 CD146 抗体为一类新型避孕药物。

10 本发明采用两种技术路线制备抗 CD146 分子的抗体：（1）采用肿瘤细胞培养上清诱导人脐静脉内皮细胞，使其成为增殖的血管内皮细胞。后者用于免疫小鼠获得单克隆抗体。这种新方法不仅提高了增生血管内皮细胞标志的丰度，维持了细胞膜抗原的天然构象，而且还可以发现增生期血管新的靶分子。（2）利用现代分子生物学和抗体工程技术，研制出各种不同结构形式的基因工程抗体。这些抗体比原代鼠单克隆抗体具有更大的应用价值，主要表现在免疫源性较低、毒副作用小；易于与其它功能分子结合形成高效的免疫复合物；抗体基因易于保存并有利于进行抗体结构与功能的改造，以更好地适应于临床应用。

20 发明内容

本发明的一个目的是提供一种分泌特异结合 CD146 分子的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

本发明的另一个目的是提供一种特异结合 CD146 分子的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体。

本发明的又一个目的是提供一种编码这种单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体的核苷酸序列。

30 本发明的再一个目的是提供一种单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体的用途。

本发明提供了一种分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞系，所分泌的单克隆抗体特异结合 CD146 分子。该细胞系已于 2000 年 9 月 19 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，保藏中心地址是，中国，北京，中关村，其保藏编号为 CGMCC0491。

5 本发明还提供了由所述的杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体。所述单克隆抗体的重链可变区可以具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述抗体的轻链可变区可以具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

本发明还提供了所述的单克隆抗体的 Fab 片段，其中，该 Fab 片段的 Fab 轻链可具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，该 Fab 片段的 Fab 重链可具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

本发明还提供了所述的单克隆抗体的单链抗体，其中，该单链抗体可具有 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

本发明也提供了编码本发明的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体的核苷酸序列。

本发明还提供了本发明的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在制备用于肿瘤诊断和导向治疗的药物中的应用。

本发明还提供了本发明的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在药物筛选和肿瘤疫苗中的应用。

本发明还提供了本发明的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在制备阻止早期妊娠和避孕方面的药物中的应用。

25 本发明还提供了本发明的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体在制备治疗与新生血管有关的疾病的药物中的应用。

综上所述，我们首次发现抗 CD146 抗体不仅能够抑制胚胎植入导致流产，而且能够抑制肿瘤生长和转移。因此，这类抗体可用于肿瘤及其它与血管生成有关疾病的诊断和治疗，是一类新型的避孕和流产药物。

附图简要说明

图 1: 流式细胞术分析 CD146 抗体与各种细胞的结合. 抗 CD146 抗体结合人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人微血管内皮细胞(HMVEC), 而不结合表皮细胞(A431)和乳腺上皮细胞(HBL100)。

图 2: 免疫组化表示抗 CD146 抗体结合胃癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、平滑肌肉瘤等组织中的新生血管。

图 3: SDS-PAGE 分析 CD146 抗体亲和层析柱分离和纯化靶分子。1—蛋白标准分子量; 2—人脐静脉内皮蛋白质粗提液, 3—层析柱流出液; 4—层析柱洗脱液, 5—洗脱液与 Protein A 反应去除免疫球蛋白之后蛋白组分。

图 4: 抗体靶分子与 CD146 分子的氨基酸序列比较。

图 5: 凝胶分析抗体轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 经过 PCR 扩增后的基因产物。1- 1Kb DNA 标准分子量; 2—载体; 4— VL 基因; 5—VH 基因。

图 6: 抗体 Fab 基因和重组质粒的构建。1—100bp DNA 标准分子量; 2- 抗体轻链基因; 3—载体 pComb3-k SacI/XbaI; 4—抗体轻链可变区; 5—抗体轻链基因; 6—抗体重链 Fd; 7—重链可变区。

图 7: SDS-PAGE 和免疫印迹检测抗体 Fab 和单链抗体 scFv。

图 8: ELISA 检测单克隆抗体(IgG), 抗体 Fab 和单链抗体 scFv 对 CD146 分子的结合活性。

图 9: 凝胶电泳分析含有单链抗体基因的重组质粒。1, 2, 4—分别代表不同的克隆; 3—DNA 标准分子量。

图 10: 鸡胚尿囊膜血管生成试验: A 同型鼠 IgG 对尿囊膜血管生长无影响。B 抗 CD146 抗体对鸡胚血管生成具有明显的抑制作用。

图 11: 抗 CD146 抗体抑制肿瘤生长, 抑制率分别为平滑肌肉瘤 (SK-LMS-1) 50%, 肝癌(7721)71.9%, 胰腺癌(SW1990)48.7%。用 ^{131}I -抗 CD146 抗体偶联物治疗胰腺癌时, 肿瘤抑制率达到 82%。

图 12: 动物试验表示荷人胰腺癌裸鼠在经过抗 CD146 抗体和同型鼠抗体 (对照组) 治疗后的情况。与对照组相比, 抗 CD146 抗体对于肿瘤

的生长具有明显的抑制作用。

图 13: 治疗后肿瘤的病理检查。A—比较对照组同型鼠抗体(上)和抗 CD146 抗体治疗后的肿瘤大小; B—抗 CD146 抗体治疗后的肿瘤病理分析, 发现肿瘤组织中血管密度降低, 部分血管可见栓塞, 血管周围肿瘤细胞可见空泡坏死。

图 14: 抗 CD146 抗体对小鼠外胎盘锥黏附的影响。

图 15: 抗 CD146 抗体对小鼠外胎盘锥扩展的影响。

图 16: 小鼠外胎盘锥在抗 CD146 抗体或同型鼠 IgG 存在下的体外生长情况。A—在抗 CD146 抗体的存在下小鼠外胎盘锥不向外扩展, B—在同型鼠 IgG 的存在下小鼠外胎盘锥的扩展不受影响。

图 17: 抗 CD146 抗体对经 FGF 刺激的小鼠外胎盘锥黏附的影响。

图 18: 抗 CD146 抗体对经 FGF 刺激的小鼠外胎盘锥扩展的影响。

图 19: 抗 CD146 抗体对经 VEGF 刺激的小鼠外胎盘锥黏附的影响。

图 20: 抗 CD146 抗体对经 VEGF 刺激的小鼠外胎盘锥扩展的影响。

图 21: 抗 CD146 抗体对小鼠外胎盘锥金属蛋白酶分泌的影响。(a)和(d)为培养 24 小时培养液的酶谱结果, (b)和(e)为培养 48 小时培养液的酶谱结果, (c)和(f)EDTA 处理组。

图 22: 抗 CD146 抗体对小鼠胚泡植入的影响。抗 CD146 抗体导致 80% 以上的胚胎流产。图 22—A 是以 PBS 为对照, 图 22—B 是以同型鼠 IgG 为对照。

图 23: 动物试验观察 CD146 抗体导致妊娠小鼠流产。小鼠子宫分左右两侧, 左侧经过抗 CD146 抗体处理后, 个别残余的胚胎发育不良或畸形。右侧为对照经过无关小鼠 IgG 处理, 胚胎发育正常。

25 实施例

实施例一: 抗 CD146 单克隆抗体的制备和鉴定

应用杂交瘤技术生产单克隆抗 CD146 抗体^[5], 具体操作如下: 采用肝癌细胞的培养上清诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增生, 以增生的 HUVEC 作为免疫原对 BALB/C 小鼠进行五次免疫接种。每次接种部位为腹膜内注射和皮下注射; 注射的细胞总数大约为 10^7 。在最后一次免疫接种三天后,

取脾脏，并将脾细胞悬浮于 RPMI1640 培养基中。在聚乙二醇（PEG）存在下，将脾细胞和 P3-X63-Ag8.635 鼠骨髓瘤细胞进行融合，并用 HAT 选择性培养基对杂交瘤进行筛选。

运用 Douillard 等人介绍的方法^[6]，将增生 HUVEC 细胞接种到 96 孔培养板内培养过夜。用新鲜配置的 0.5% 的戊二醛固定细胞 15 分钟，用 PBS 洗三遍。加入牛血清白蛋白封闭 1 小时。然后加入分泌抗体的杂交瘤培养上清、酶标抗体和底物，进行 ELISA 筛选。挑选只与免疫原结合而不与原代 HUVEC 结合的单克隆抗体。筛选出的阳性克隆在通过免疫组化方法进一步筛选。用每个克隆的培养上清对正常肝及肝癌组织冰冻切片染色，挑选只与肝癌血管反应而不与正常肝反应的杂交瘤细胞株。经过以上两种方法的筛选，最后获得的特异抗体仅与增生 HUVEC 及与肝癌血管内皮反应，不与正常肝血管反应。

用限制性稀释法多次克隆分泌特异抗体的杂交瘤细胞，最后获得分泌新生血管特异抗体的杂交瘤细胞 HE2A5（保藏号 CGMCC0491）。HE2A5 杂交瘤所分泌的抗体识别靶抗原为 CD146 分子。

腹水的制备方法简述如下：六周龄 BALB/C 小鼠腹腔注射降植烷（Pristane）0.5ml/只。10 天后，将杂交瘤细胞悬液接种于 BALB/C 小鼠腹腔， 1×10^7 /ml/只，约十天后，收集腹水，离心取上清。通过蛋白 A 亲和层析，从培养上清或腹水中纯化单克隆抗体。将纯化单克隆抗体无菌过滤，并冷藏或冷冻保存。应用 Zymed 公司抗体亚型鉴定试剂盒，ELISA 方法鉴定出抗 CD146 抗体属于 IgG 型抗体。

采用 FACS 细胞分类器分析抗 CD146 抗体对各种细胞系的结合活性。将 1×10^6 细胞与抗 CD146 抗体培养上清共孵育 1 小时。用 PBS 洗三遍，加入 FITC-羊抗鼠 IgG 抗体，孵育 45 分钟。洗三遍后，将细胞重新悬浮在 500 μ l PBS 中。在 FACS 上进行免疫荧光分析并测定平均荧光密度。实验结果归纳于表 1 和图 1。

表 1 FACS 分析 CD146 抗体与人正常和肿瘤细胞系的结合

细胞系	CD146 抗体	细胞系	CD146 抗体
人脐静脉内皮细胞 HUVEC	+	膀胱癌细胞 T24	-
人脐微静脉内皮细胞 HMVEC	+	白血病 T 细胞 Jurkat	-
肝癌细胞 ALEX	-	成髓白血病粒细胞 KG-1	-
骨肉瘤细胞 Saos-2	-	胰腺癌细胞 SW1990	-
表皮细胞 A431	-	纤维肉瘤细胞 HT1080	-
黑色素瘤细胞 A375	-	乳腺上皮细胞 HBL100	-
黑色素瘤细胞 SBcl	-	卵巢癌细胞 SKOV3	-
肺癌细胞 1 A549	-	外周血淋巴细胞	-
卵巢癌细胞 LS-174	-	成纤维细胞	-
卵巢癌 SW1116	-	前列腺癌细胞 Pc-1	-
胚性肾癌细胞 293	-	绒毛膜癌细胞 JAR	-
平滑肌肉瘤 SK-LMS-1	-	胰腺癌细胞 SW1990	-
肝癌细胞 7721	-	子宫颈癌细胞 HeLa	-

- 5 利用冷冻组织切片和免疫组化方法^[7]鉴定抗 CD146 抗体与人体正常组织和肿瘤组织的反应, 结果表明抗 CD146 抗体与许多肿瘤组织的微血管高特异反应, 而与正常组织的反应十分有限 (表 2, 图 2)。

表 2 免疫组织化学分析 CD146 抗体与人正常和肿瘤组织血管的结合

正常组织	阳性/例	肿瘤组织	阳性 / 例
肝脏	0/14	肝癌	20/20
脑	0/6	脑瘤	9/9
肾上腺	0/4	肾癌	2/2
胰腺	0/5	胰腺癌	6/6
胃	2/2	胃癌	10/10
结肠	2/2	结肠癌	15/15
乳腺	1/1	乳腺癌	20/20
肺	2/2	肺癌	18/18
卵巢	2/2	卵巢癌	9/9
心肌	0/2	平滑肌肉瘤	13/13
甲状腺	0/2	甲状腺癌	16/20
淋巴结	0/2	咽喉癌	4/4
骨髓	0/2	鳞癌	3/3
窦炎	0/2	纤维血管瘤	4/4
		子宫内膜癌	15/15
		其它	24/25

- 5 为了进一步研究抗体靶分子的理化性质，我们用生物素标记 HUVEC 细胞膜蛋白，免疫沉淀，SDS-PAGE 和免疫印迹等方法分析，确定抗体靶分子是一个分子量为 97kD 左右（图 3），表达于细胞表面的膜蛋白，抗原决定簇为构象结构。利用亲和层析分离纯化抗体靶分子，通过氨基酸序列分析结果表明靶分子的 N 端 20 个氨基酸与人细胞黏附分子 CD146 完全
- 10 相同，确认 CD146 分子（图 4）。

CD146 分子，又名 MUC18、A32 抗原、MCAM、Mel-CAM 和 S-Endo-1^[8-10]，新近被鉴定为 Ig 基因超家族的成员。它是一种跨膜的糖蛋白，其胞外区有一个典型的 V-V-C-C-C 的类 Ig 结构域，仅有一个跨膜区，胞

质部分较短，有一些潜在的蛋白激酶的识别位点。CD146 是一个高度糖基化的蛋白质，大约 35%的分子量是由碳水化合物组成，包括唾液酸和其它的碳水化合物。目前，对 CD146 功能理解甚少。有试验表明它参与细胞黏附、迁移和细胞信号传导^[11-13]。本发明解释了 CD146 分子的部分生物学功能，发现了 CD146 分子及其抗体在肿瘤诊断和治疗以及避孕药物方面的应用价值。

实施例二：抗 CD146 人-鼠嵌合抗体的制备

由于鼠单克隆抗体在人体免疫系统中被识别为外来物质，诱发机体的免疫排斥反应，因而不适用于人体治疗。为了克服这一缺点。本发明采用现代分子生物学技术，研制出了人/鼠嵌合抗体 chiAA98。该抗体的可变区（抗原结合区）来自鼠源蛋白（占抗体分子的 1/3），其他不变区来自人 IgG（占抗体分子的 2/3）。这种抗体不仅保持了鼠单抗结合抗原的特异性，能够竞争抑制单克隆抗 CD146 抗体与其靶抗原的结合；而且降低了抗体分子中的鼠源成分，减低了人的免疫排斥反应，增加了抗体的生物学效应功能，便于临床应用。研制嵌合抗体的操作步骤如下：

从杂交瘤细胞 HE2A5 中分离纯化 mRNA，合成第一链 cDNA。设计引物：轻链可变区引物为 5'gg tct aga gag ctc gtg atg aca 3' (23mer) (SEQ ID NO: 6) 和 5'at gga tcc agc ccg ttt tat ttc c 3' (24mer) (SEQ ID NO: 7)；重链可变区引物为 5'ccg ctc gag gag gtg cag ctg ctg gaa tct 3' (30mer) (SEQ ID NO: 8) 和 5'ccc aag ctt tga gga gac ggt ga 3' (23mer) (SEQ ID NO: 9)。用 PCR 方法克隆和扩增抗体轻和重链可变区基因（图 5），并分别克隆到 T 载体上进行基因序列分析。根据所获得的基因序列推导出该基因所编码的重链可变区是由 118 个氨基酸组成，序列如 SEQ ID NO: 1 所示。抗 CD146 抗体轻链可变区是由 112 个氨基酸组成，序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

然后把抗 CD146 抗体的轻链和重链可变区基因分别与人的轻链和重链恒定区基因连接，构建可编码完整嵌合抗体的融合基因；将这种融合基因插入到有选择性标记和基因控制区（如启动子，增强子，终止子）的表达载 pDHL^[14]中；在细菌中扩增这种表达载体，分离纯化含有嵌合抗

体基因的表达载体。用 lipofectin 将含有嵌合抗体基因的表达载体导入哺乳动物细胞 CHO 中。用 MTX 筛选转化细胞, 获得转基因细胞株 CHO-chiAA98。用 ELISA 筛选分泌抗体并鉴定细胞株 CHO-chiAA98 的稳定性。检测嵌合抗体的抗原结合特异性和效应功能, 结果显示抗 CD146 嵌合抗体保留亲代抗 CD146 抗体的特异性。

实施例三 抗 CD146 抗体-Fab 的制备

利用抗体识别肿瘤血管的特异性, 将抗体识别功能片段与具有免疫活性或抗肿瘤活性物质连接, 研制出具有识别和杀伤作用的双能够融合蛋白。其中抗体成分主要是 Fab。生产抗体 Fab 功能片段的操作步骤如下:

首先设计一套引物: 抗体 Fd 引物为 5'agg tcc agc tgc tcg agt ctg g3' (mH1) (SEQ ID NO: 10) 和 5'gat atc act agt ggg ccc gct ggg ctc3'(for IgG2a/2b) (SEQ ID NO: 11); 抗体轻链引物为 5'primer gat att gag ctc gtg atg ac(c/a) ca(g/a) (t/a)ct cc (SEQ ID NO: 12) 和 3'primer 5'gc tct aga aag ctt a tta aca ctc att cct gtt gaa (SEQ ID NO: 13)。用快速制备、纯化 mRNA 试剂盒 (Promega) 从大约 2×10^7 个杂交瘤细胞 HE2A5 中提取并纯化 mRNA。以纯化的 mRNA 为模板, 反转录合成 cDNA。用 PCR 方法, 以 cDNA 为模板, 在 PCR 反应体系中分别加入引物, 进行 30 个循环的 PCR 扩增。每个循环的条件是: 94°C 变性 30s, 55°C 退火 90s, 72°C 延伸 90s, 反应进行到最后一个循环后在 72°C 中保温 10min。反应结束后, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物(图 6)。把扩增抗 CD146 抗体的 Fd(抗体可变区和恒定区 CH1) 基因和轻链基因克隆到 pComb3H^[15] 表达载体上。把 Fab-pCom3H 重组质粒转入大肠杆菌 XL-Blue(DE3), 用含氨苄青霉素选择性培养基筛选重组菌。用 IPTG 诱导重组菌表达可溶性抗 CD146 抗体-Fab。从胞周质中分离纯化抗 CD146 抗体-Fab (图 7)。ELISA 和免疫印记鉴定可溶性抗 CD146 抗体-Fab 的特异性 (图 8)。

分析抗 CD146 抗体-Fab 的基因序列并推导出抗 CD146 抗体轻链是由 217 个氨基酸组成, 序列如 SEQ ID NO: 3 所示。抗 CD146 抗体重链 Fd 是由 222 个氨基酸组成, 序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

实施例四：抗 CD146 小分子单链抗体的制备

抗 CD146 小分子单链抗体是保留抗体的特异性和生物活性的最小分子。由于它分子量小和免疫源性低，因此有利于作为载体携带药物和毒素进行免疫治疗。制备方法如下：

5 设计引物：轻链可变区引物为 5' primer for VL(25mer) ccg gag ctc
gtg atg aca caa tct c (SEQ ID NO: 14) 和 3' primer for VL(26mer)
gc tct aga ccg ttt tat ttc cag ctt (SEQ ID NO: 15)；重链链可变
区引物为 5' primer for VH(27mer) ccg ctc gag tct gga gct gag ctg gtg
(SEQ ID NO: 16) 和 3' primer for VH(26mer) gg act agt tga gga gac
10 ggt gac cgt (SEQ ID NO: 17) 。以抗 CD146 抗体-Fab 基因为模板,用
PCR 方法分别扩增抗体的轻重链可变区基因。PCR 反应进行 30 个循环。
每个循环的条件是：94℃变性 30s, 55℃退火 90s, 72℃延伸 90s, 反应
进行到最后一个循环后在 -72℃中保温 10min。反应结束后，用琼脂糖凝
胶电泳鉴定扩增产物。把扩增的抗体可变区基因克隆到 pComb3H 表达载
15 体上，构建 VH-linker-VL 融合基因（图 9）。构建可溶性单链抗体高效表
达载体。氨苄青霉素筛选分泌抗体的重组菌，IPTG 诱导培养，离心收集
含有可溶性抗体功能片段的上清。层析分离纯化单链抗体（图 7）。ELISA
鉴定可溶性抗 CD146 单链抗体的特异性和生物活性（图 8）。单链抗 CD146
抗体核苷酸序列分析以及推导出的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

20

实施例五、抗 CD146 抗体抑制血管生成

我们采用鸡胚尿囊膜血管生成(CAM)模型检测 CD146 抗体对血管生成的影响。方法如下^[16]：受精莱杭鸡蛋 37℃ 培养三天后剥除蛋壳，在半圆
25 形容器中继续无菌培养三天，将抗 CD146 抗体和对照抗体溶液吸附到
2×2mm 滤纸上，然后将滤纸平放于尿囊膜血管网上孵育 24 至 48 小时，解
剖显微镜下观察血管生成并照相。

结果发现在鸡胚发育的第 6 天，将 PBS, 抗 CD146 抗体, 同型鼠抗体加
样于尿囊膜血管，培养 24 小时后连续观察。在每组 20 个加样鸡蛋中，
30 CD146 抗体抑制血管生成为 16/20。同型鼠 IgG 对尿囊膜血管生长无任何

反应。在 CD146 抗体加样区可见约 6×6mm 的无血管区，其中没有观察到出血与炎症反应。与对照组 PBS 或同型鼠抗体相比，抗 CD146 抗体对鸡胚血管生成都具有明显的抑制作用。（图 10）。

5 实施例六、抗 CD146 抗体抑制肿瘤的生长和转移

荷人瘤裸鼠动物试验将人肿瘤模型分为肝癌，胰腺癌及平滑肌肉瘤 3 组。肿瘤细胞接种量分别为肝癌细胞 7721 1×10^7 个，胰腺癌细胞 SW1990 2×10^6 个，和平滑肌肉瘤细胞 SK-LMS-1 0.5×10^6 个，在肿瘤生长到直径约 10 1cm 时开始腹腔给药 10mg/kg/只，每周 2 次。肝癌治疗组为肿瘤细胞与抗体同时给药。对照组分别以 PBS 或同型鼠 IgG 取代抗 CD146 抗体。每周测量瘤长径，短径，并计算瘤体积。当对照组出现小鼠死亡时终止观察。按公式计算抑瘤率，抑瘤率(%)=1-(实验组瘤体积/对照组瘤体积)。

在肿瘤生长到直径约 1cm 时，开始腹腔注射抗体 10mg/kg/只，每周 15 2 次，观察 3-4 周。我们发现抗 CD146 抗体单独使用对三种肿瘤均有不同程度的治疗作用，肿瘤抑制率分别为平滑肌肉瘤 50%，肝癌 71.9%，胰腺癌 48.7%。当我们把抗 CD146 抗体与 ^{131}I 偶联，用 ^{131}I -抗 CD146 抗体偶联物治疗胰腺癌时，仅一次给药后观察 10-18 天肿瘤抑制率达到 82%-86%。这一结果表明抗 CD146 抗体及其抗体- ^{131}I 偶联物均能有效抑制多种肿瘤 20 生长，而且后者的抑瘤作用更强（图 11）。

在治疗过程中，我们对小鼠的全身情况进行了观察。发现 CD146 抗体治疗组小鼠精神良好，食欲正常，体重无减，没有肿瘤转移和死亡。而对照组由于肿瘤体积大且出现溃疡和坏死，造成小鼠精神不佳，食欲不振，出现明显消瘦和恶病质现象（图 12）。在 60-80% 对照组小鼠的 25 肺和淋巴结发现肿瘤转移灶，20% 的小鼠在治疗第 14-16 天死亡。

对肿瘤组织进一步病理分析，发现经 CD146 抗体治疗的肿瘤组织中血管密度降低至对照组的 1/3，部分血管可见栓塞，血管周围肿瘤细胞可见空泡坏死（图 13）。由于抗 CD146 抗体选择性结合血管内皮细胞而非用于接种的肿瘤细胞，因此我们认为 CD146 抗体的抑瘤作用可能是通过抑 30 制肿瘤血管生成而实现的。

实施例七 抗 CD146 抗体对小鼠外胎盘锥黏附和扩展的影响

为了研究 CD146 在妊娠期小鼠子宫和胚胎中的表达，我们用原位杂交的方法分析了整个妊娠期小鼠子宫中 CD146 的表达。实验结果显示 CD146 主要表达在植入位点、胚胎滋养层细胞、子宫蜕膜血管等与胚泡植入密切相关的部位。特别引起我们注意的是 CD146 分子在滋养层细胞上的高表达。为了进一步证实，我们采用免疫荧光的方法分析了 CD146 分子在小鼠外胎盘锥中滋养层细胞的分布。结果显示，抗 CD146 抗体特异结合迁移性强的滋养层细胞，提示 CD146 可能参与滋养层细胞的迁移过程。

因此，我们分离了小鼠外胎盘锥，在体外水平研究抗 CD146 抗体对小鼠滋养层细胞黏附和扩展的影响，具体方法如下，小鼠交配后检出阴栓的第一天作为妊娠第一天，从妊娠第 8.5 天的雌鼠子宫蜕膜中取出胚胎，在胚胎外胚层处将外胎盘锥分离，经清洗后随机移入培养碟中进行培养，培养液为 Ham's F-12 培养基，并补充 3%胎牛血清，1.6mg/ml 碳酸氢钠，0.3mg/ml 谷氨酰胺，0.24mg/ml 乳酸钙和 400U/ml 庆大霉素。24 孔培养板预先用 0.1mg/ml 层粘连蛋白按 10 μ l/孔铺盖，在超净台内室温风干 3 小时以上。外胎盘锥培养液中加入抗 CD146 抗体 (20 μ g/ml) 作为实验组，对照组用相同浓度的正常小鼠 IgG。培养 48 小时，每隔 12 小时在倒置显微镜下观察一次，轻轻晃动培养板，不动者为黏附的外胎盘锥，在已黏附的外胎盘锥周围迁移出滋养层细胞的被认为是扩展的外胎盘锥，实验结果表明，抗 CD146 抗体能抑制外胎盘锥在层粘连蛋白的黏附和扩展率 (图 14, 15)，其中对外胎盘锥扩展的抑制更为显著。在对照组中，滋养层细胞正常迁移和扩展，而实验组中，滋养层细胞的迁移和扩展能力受到抑制，细胞成圆形不像对照组的伸展状 (图 16) 实验重复 3 次。另外，我们还检测了抗 CD146 抗体对经过 bFGF 和 VEGF 刺激的小鼠外胎盘锥的黏附和扩展的作用，发现抗 CD146 抗体对其也有抑制效果 (图 17,20)，具体方法是在外胎盘锥培养液中不加胎牛血清，而加入 10ng/ml 的 bFGF 或 VEGF，其他步骤同上。

实施例八 CD146 抗体抑制小鼠外胎盘锥分泌金属蛋白酶

分离妊娠第 8.5 天的小鼠外胎盘锥，在培养 24 和 48 小时后收集培养液，用 Bradford 法测定培养液的蛋白浓度。然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，以含 1mg/ml 明胶的 10%聚丙烯酰胺凝胶作为分离胶，4%聚丙烯酰胺凝胶作为浓缩胶，每泳道 10—20 μ l 培养液，相当于 6 μ g 总蛋白质，与非还原的样品缓冲液 37 度孵育半个小时，再上样电泳，电泳在冰浴中进行，浓缩胶内的电压为 80 伏，分离胶中的电压为 120 伏。电泳后凝胶在 2.5%TritonX-100 中洗涤数次，在孵育液(150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 和 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.6) 中 37 度孵育 16—18 小时，常规考马斯亮蓝 G-250 染色，脱色后在 Bio-rad Chemdoc 2000 凝胶成像仪进行定量分析。孵育液中加入 EDTA(20mmol/L)螯合钙离子，以鉴定是否为金属蛋白酶起的作用。结果显示抗 CD146 抗体对小鼠外胎盘锥中滋养层细胞分泌金属蛋白酶 9 和金属蛋白酶 2 有明显的抑制(图 21)，定量分析差异显著， $p < 0.01$ 。

15

实施例九 抗 CD146 抗体导致妊娠小鼠的流产

在动物实验中，我们观察抗 CD146 抗体是否能够终止妊娠。实验分为 3 组，每组 9 只小鼠。一组注射抗 CD146 抗体，一组以 PBS 为对照，另一组以同型鼠 IgG 为对照。注射同型鼠 IgG 的目的是为了排除小鼠 IgG 本身对胚胎植入的影响。在妊娠第三天，对其左侧子宫角(即子宫和卵巢的连接处)用微量注射器注入抗 CD146 抗体(2 μ g 抗体溶在 10 μ l pH7.4 磷酸缓冲液)，对其右侧子宫角注入相同体积的 PBS 或相同浓度的正常小鼠 IgG。五天后处死小鼠，在解剖镜下统计小鼠胚胎的成功植入率。结果显示经注入抗 CD146 抗体的右侧子宫，小鼠胚胎的植入被阻断，抑制率高达 80%以上(图 22) 剩余的胚胎有发育不良和畸形的现象，而对照侧子宫胚胎植入未受影响(图 23)。这种现象说明 CD146 分子在胚胎植入和维持妊娠方面起着非常重要的作用，抗 CD146 抗体能够影响胚胎植入和胚胎的发育。

30

参 考 文 献

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N Engl J Med*, 1971, 285(21):
5 1182~1186
2. Paria, B.C. et al. Deciphering the cross-talk of implantation: Advance and challenges. *Science*, 2002, 296(21):2185-2188
3. Cross, J.C. et al. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science*, 1994, 266(2):1508-1518
- 10 4. Shih, I.M., Wang, T.L., Wu, T.C. et al. Expression of Mel-CAM in implantation site intermediate trophoblastic cell line, IST-1, limits its migration on uterine smooth muscle cells. *J. Cell sci.* 111, 2655-2664 (1998).
5. Kohler and Milstein. *Nature*, 1975, 256:495.
6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Screening monoclonal antibody production
15 using enzyme-labeled second antibody. *Meth. Enzymol*, 1983, 92:168-74.
7. Ivan Lefkovits. *Immunology Methods Manual*. 1997
8. Shih, I.M., Elder, D.E., Speicher, D. et al. Isolation and functional characterization of
the A32 melanoma-associated antigens. *Cancer Res* 54, 2514-2520 (1994)
9. Bardin, N., Frances, V., Lesaule, G. et al. Identification of the S-Endo endothelial-
20 associated antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 210-216 (1996).
10. Shih, I.E., Nesbit, M., Herlyn, M. et al. A new Mel-Cam (CD146)-specific monoclonal
antibody, MN-4, on paraffin- embedded tissue. *Mod. Pathol.* 11, 1098-1106 (1998).
11. Shih, I.M., Speicher, D., Hsu, M.Y. et al. Melanoma cell-cell interactions are mediated
through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. *Cancer Res.* 57, 3835-3840 (1997).
- 25 12. Anfosso, F., Bardin, N., Frances, V. et al. Activation of human endothelial cells via S-
Endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion
kinase p125^{FAK}. *J. Biol. Chem.* 273, 26852-26856 (1998).
13. Anfosso, F., Bardin, N., Vivier, E. et al. Outside-in signalling pathway linked to CD146
engagement in human endothelial cells. *J Biol Chem* (2000).
- 30 14. 朱迎春 等, 细胞与分子免疫学杂志 16: 355—358, 2000

-
15. Kang AS, et al. Linkage of recognition and replication functions by assembly combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. Proc Natl Acad Sci USA, 88:363-366, 1991.
 16. Auerbach R, Kubai L, Knighton D. A simple procedure for the long-term cultivation for
5 chicken embryo. Dev Biol, 41:391-394, 1974.

序列表

- <110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 一种单克隆抗体、其编码基因、用途以及分泌它的杂交瘤细胞系
 <130> I030173
 <160> 17
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Ile Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Leu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ser Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 2

Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
 85 90 95

Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

<210> 3
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 3

Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20					25					30					
Gly	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65					70					75					80
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ile	Arg
				85					90					95	
Glu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala
			100					105					110		
Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu
		115					120					125			
Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
	130					135					140				
Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn
145					150					155					160
Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				165					170					175	
Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His
			180					185					190		
Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile
		195					200					205			
Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Trp							
	210					215									

<210> 4

<211> 222

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Ile Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Leu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ser Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Cys Ala His Leu Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Met Thr Val Thr Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Ala Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Asn Gly Ala Thr Ser
 210 215 220

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
 85 90 95

Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser
 100 105 110

Arg Arg Gly Gly Gly Ser Arg Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 130 135 140

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 145 150 155 160

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175

Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Ile Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 180 185 190

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr
 195 200 205

Met Leu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ser Val Tyr Phe Cys
 210 215 220

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 225 230 235 240

Thr Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 6
 ggtctagaga gctcgtgatg aca

<210> 7
 <211> 24

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
atggatccag cccgttttat ttcc	24
<210> 8	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
ccgctcgagg aggtgcagct gctggaatct	30
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
cccaagcttt gaggagacgg tga	23
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
aggtccagct gctcgagtct gg	22
<210> 11	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
gatatacta gtgggcccgc tgggctc	27
<210> 12	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	

gatattgagc tcgtgatgac cacagatact cc	32
<210> 13	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
gctctagaaa gcttattaac actcattcct gttgaa	36
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
ccggagctcg tgatgacaca atctc	25
<210> 15	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 15	
gctctagacc gttttatttc cagctt	26
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
ccgctcgagt ctggagctga gctggtg	27
<210> 17	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
ggactagttg aggagacggt gaccgt	26

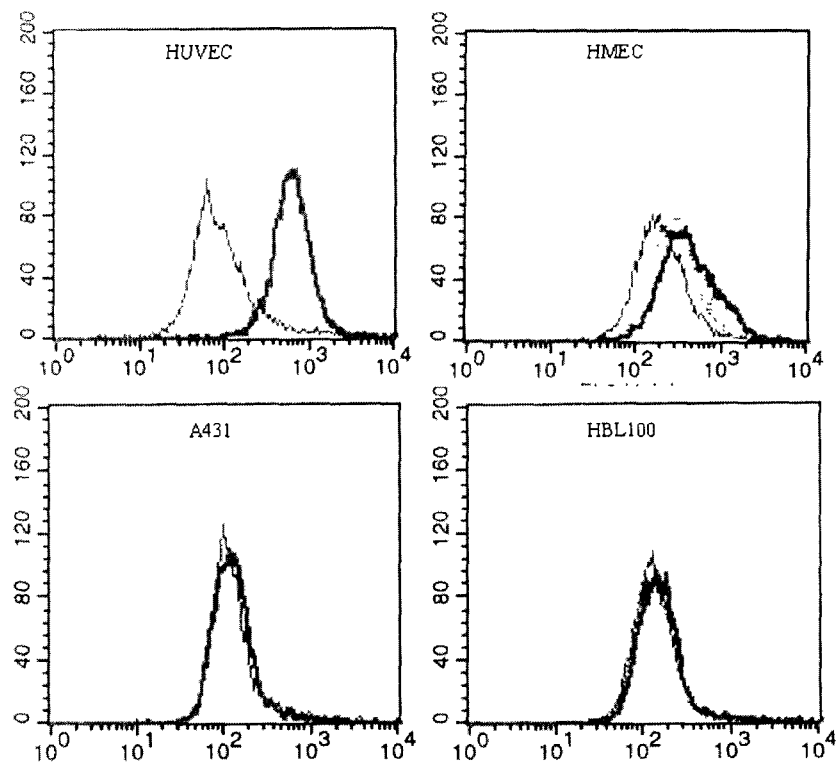


图 1

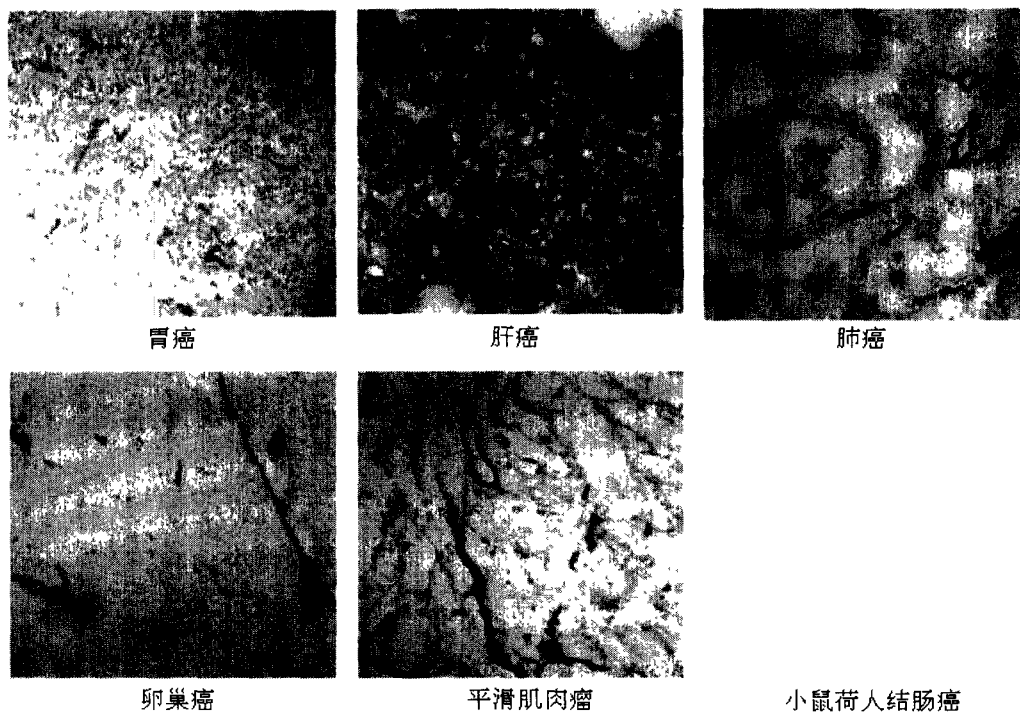


图 2

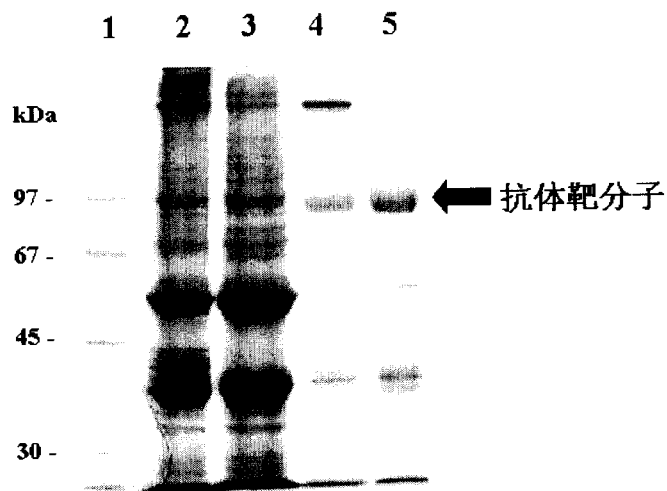


图 3

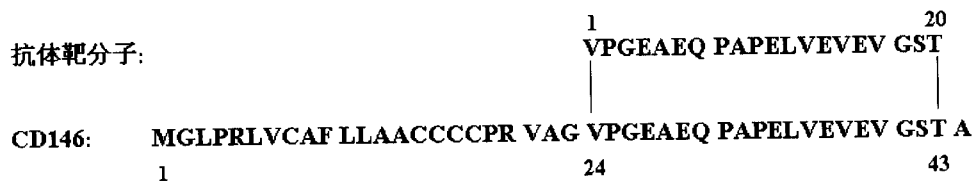


图 4

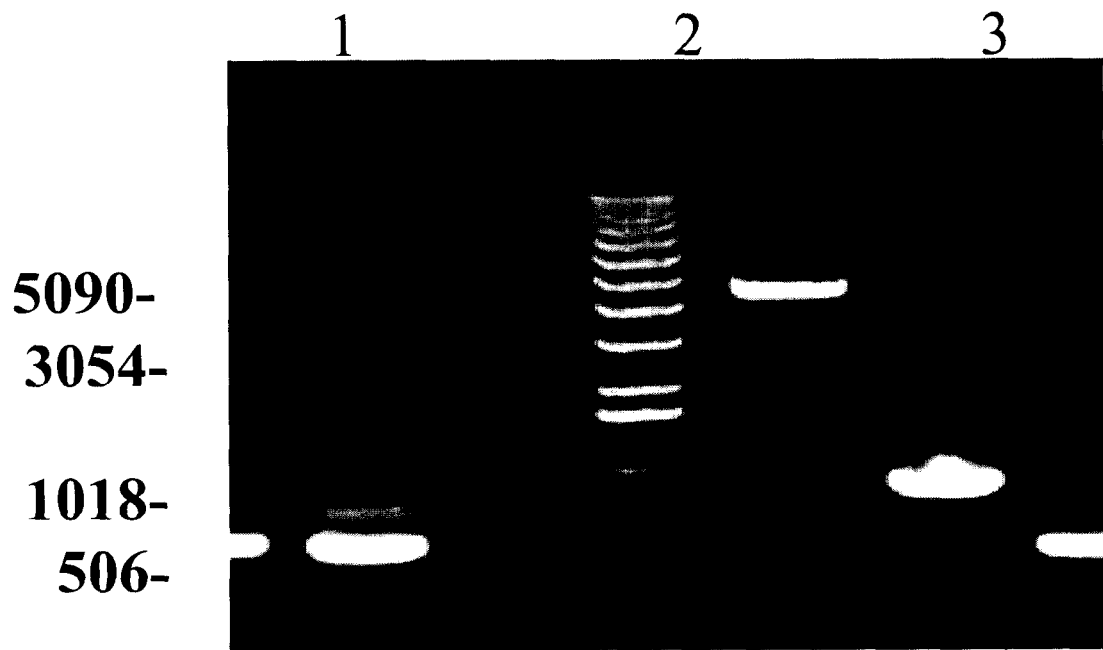


图 5

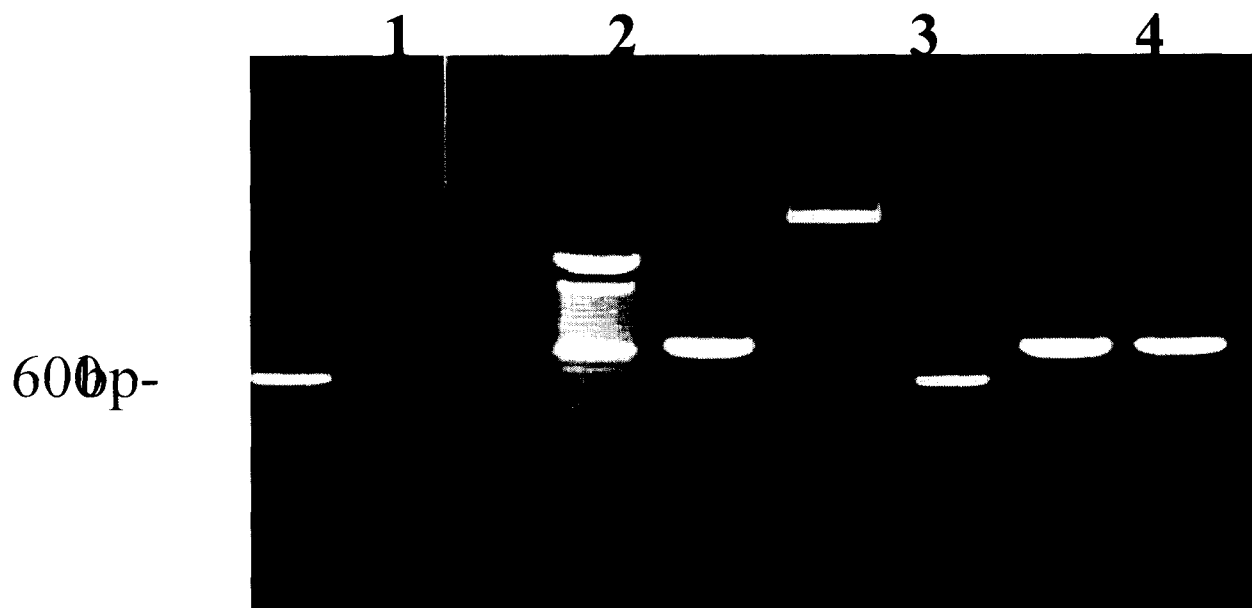


图 6

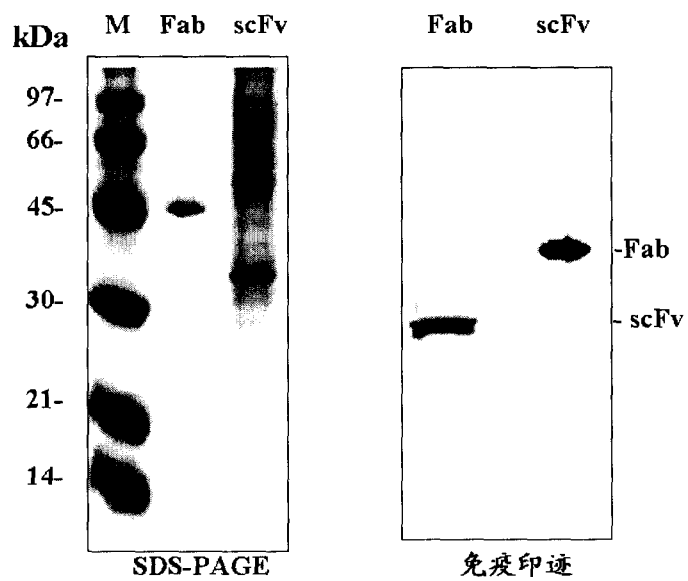


图 7

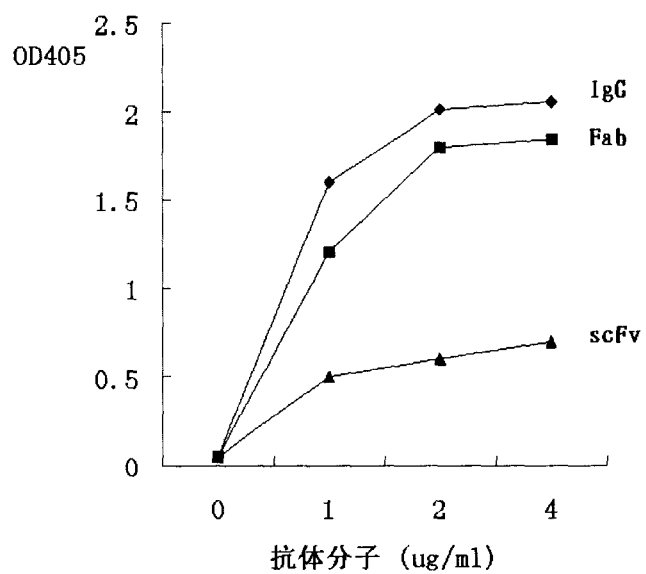


图 8

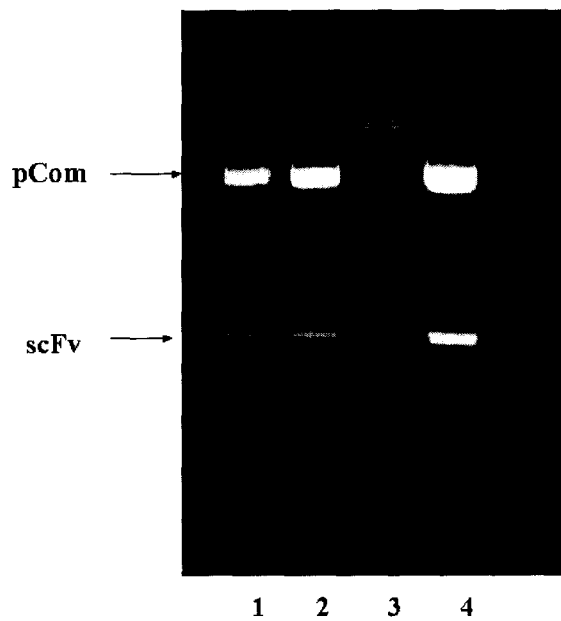


图 9

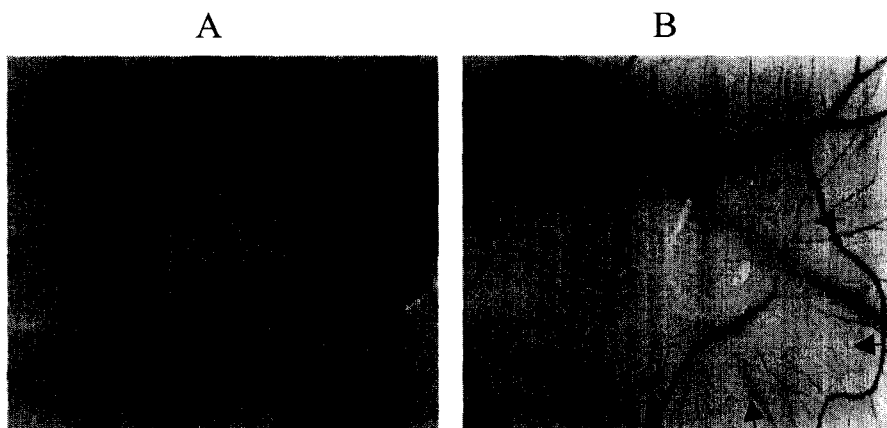


图 10

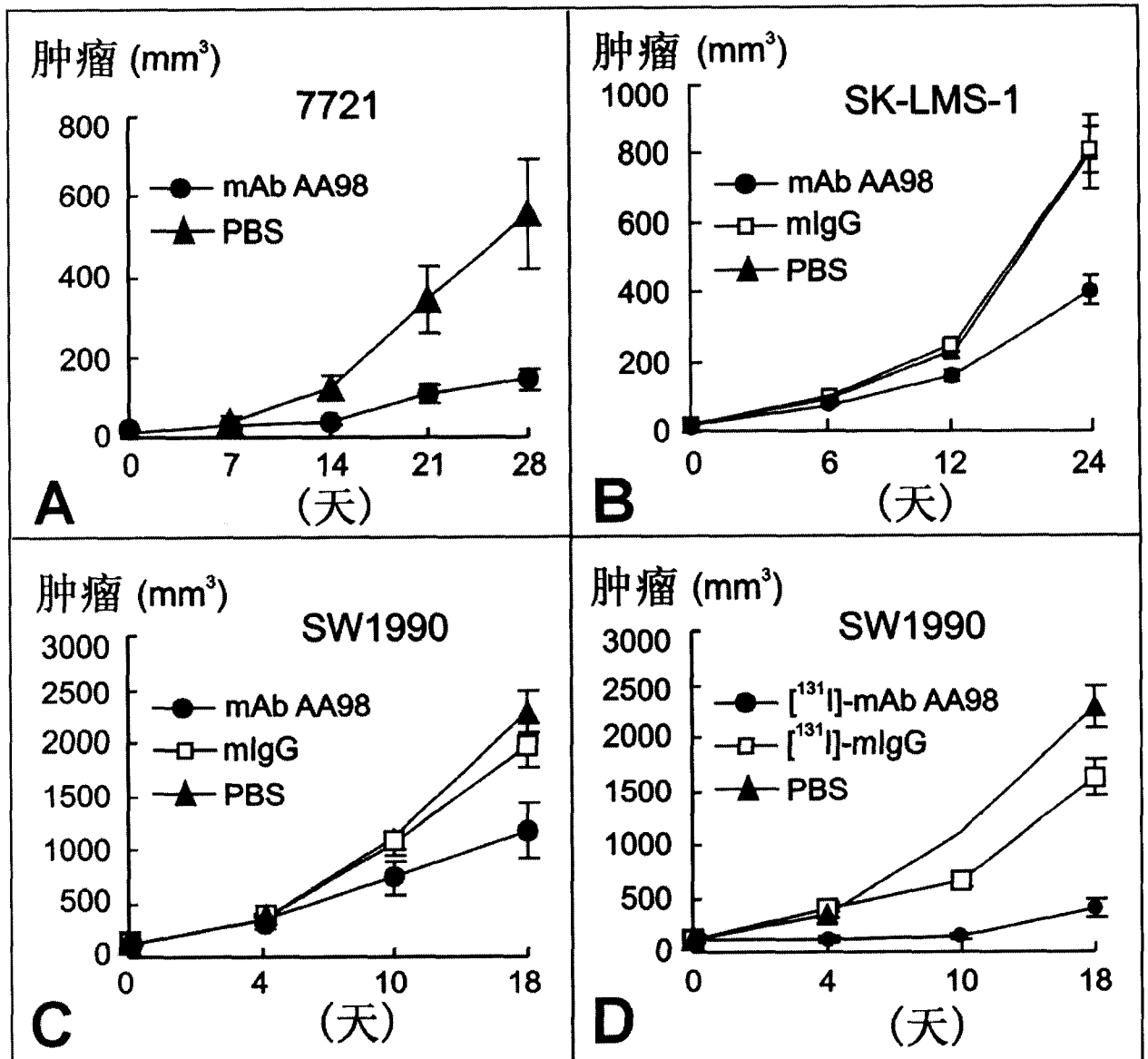


图 11

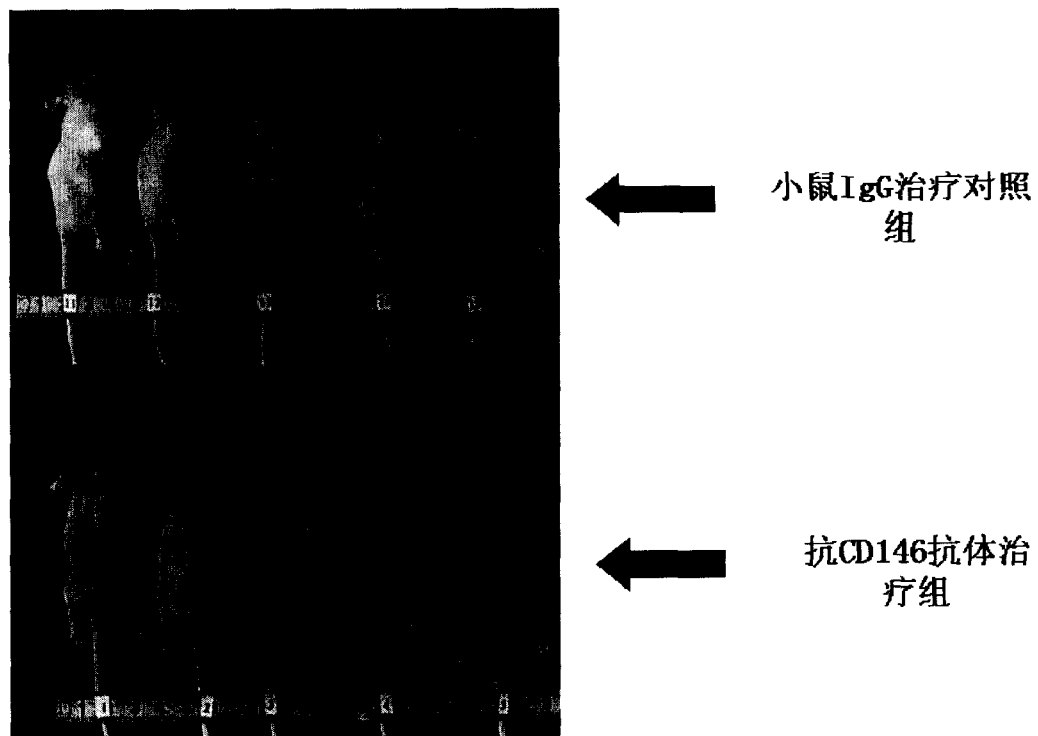


图 12

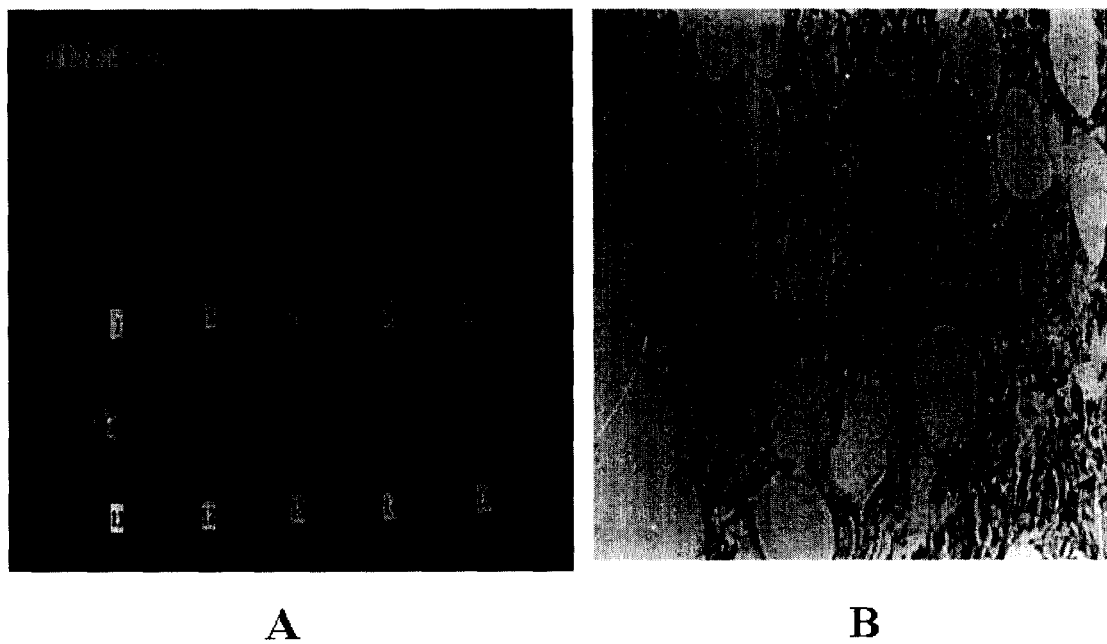


图 13

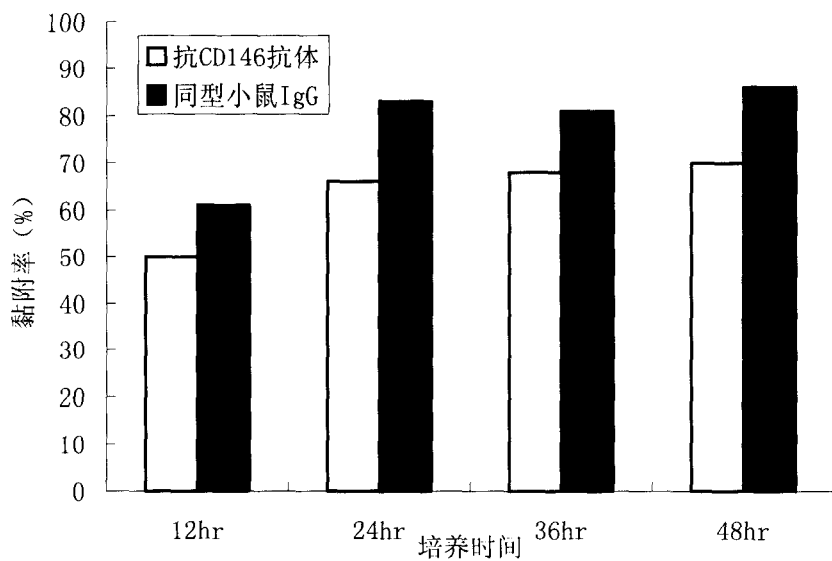


图 14

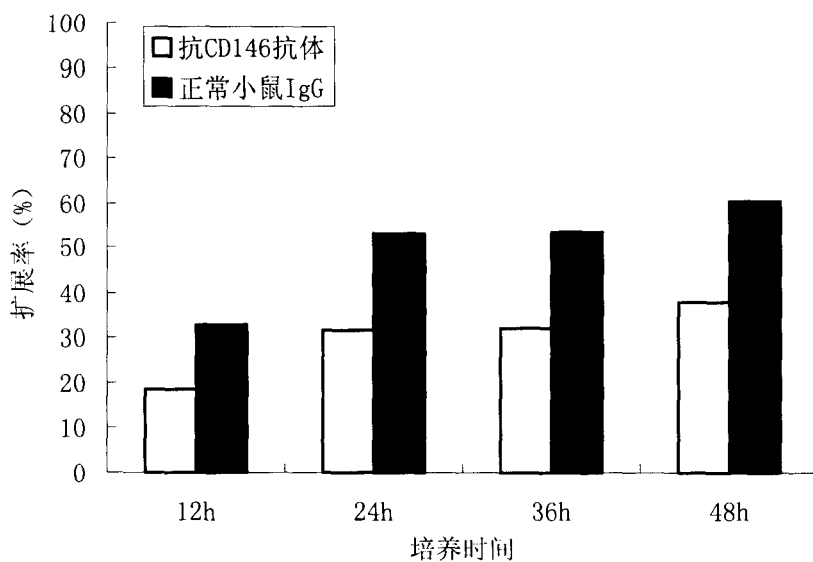
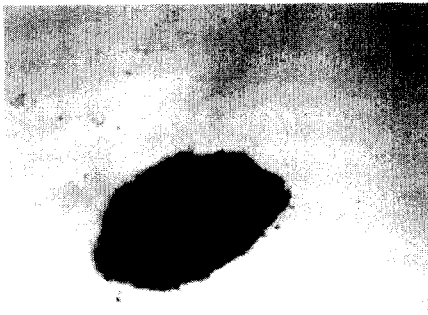


图 15



A



B

图 16

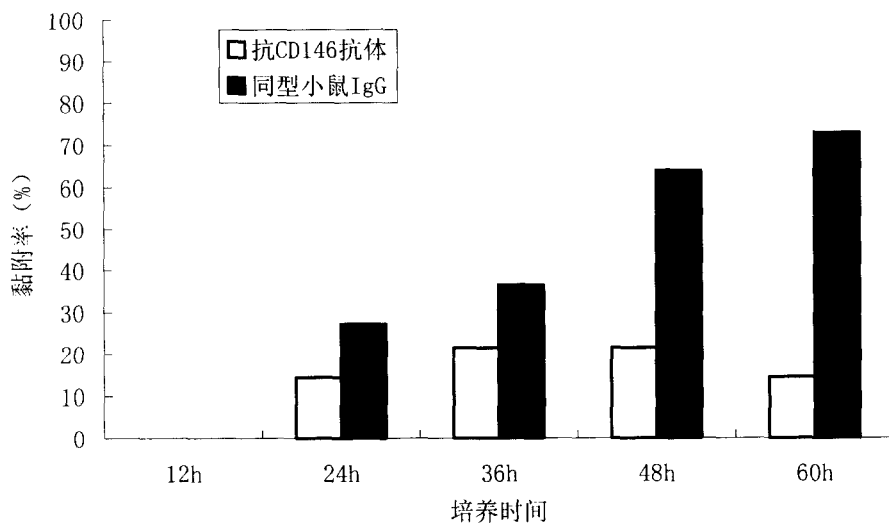


图 17

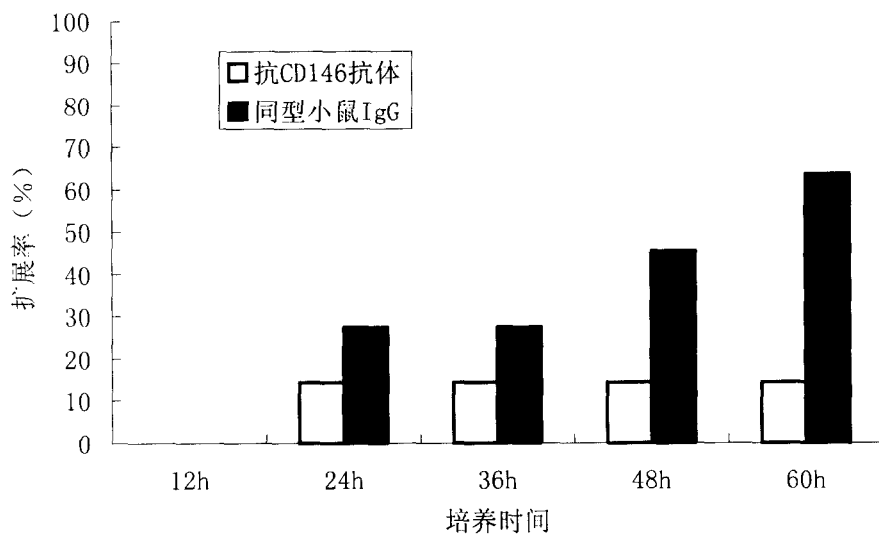


图 18

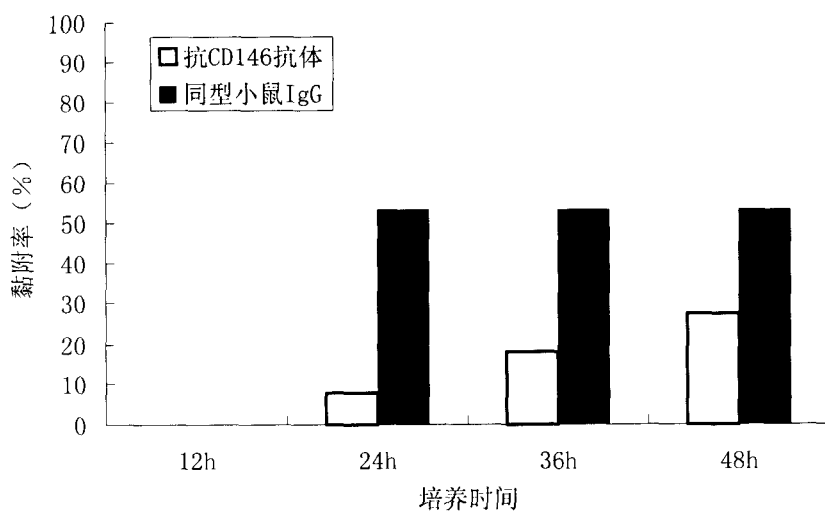


图 19

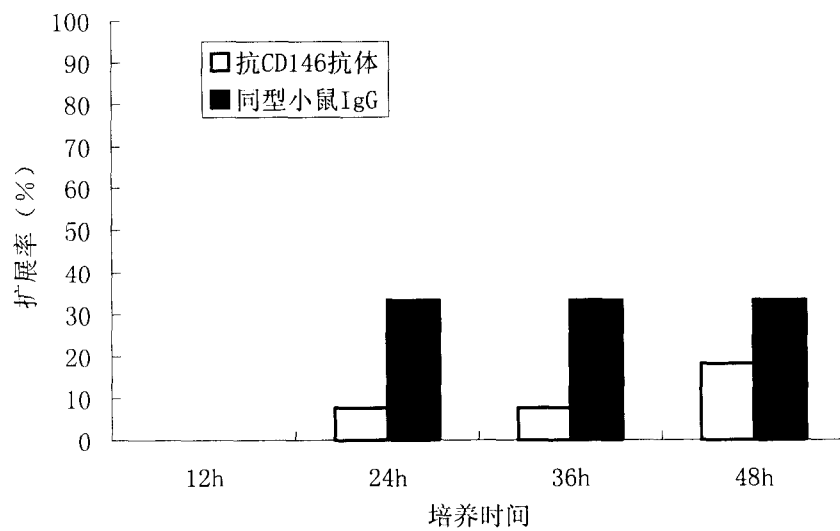


图 20

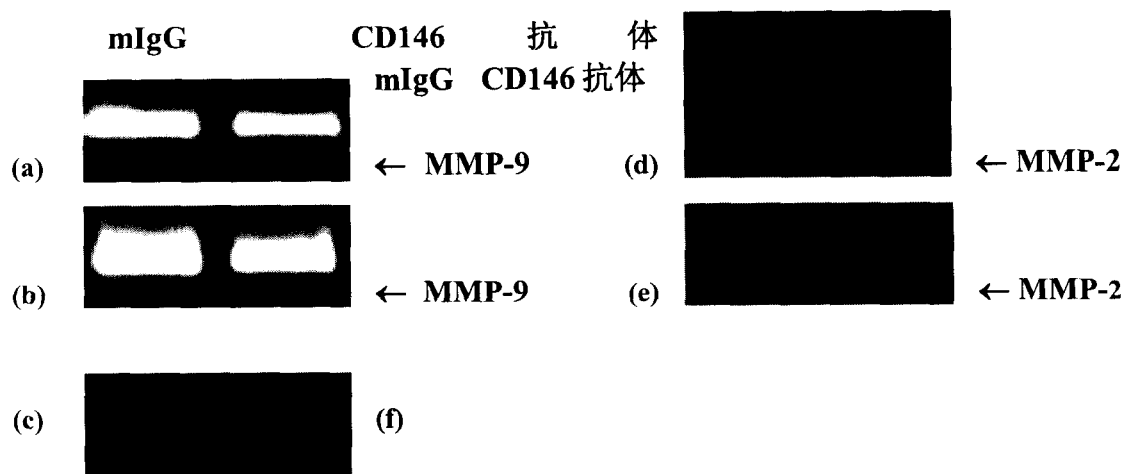


图 21

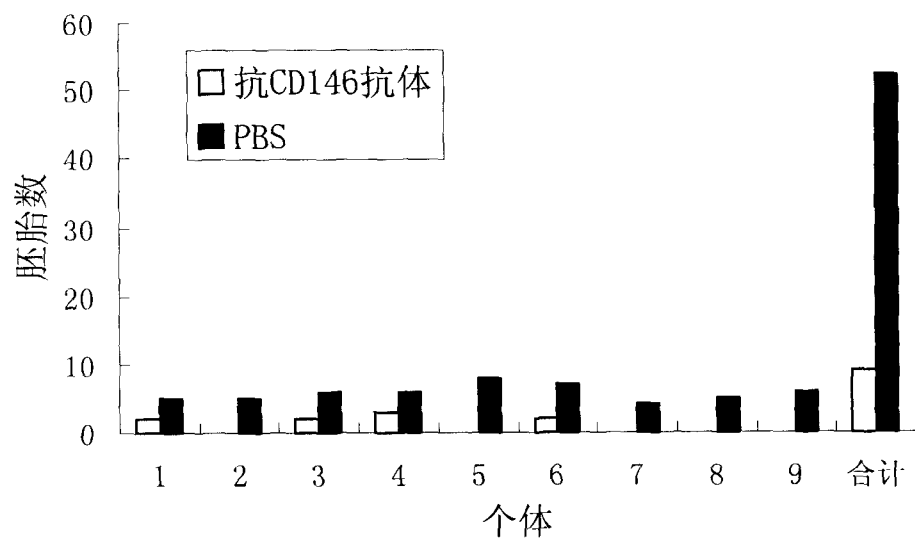


图 22A

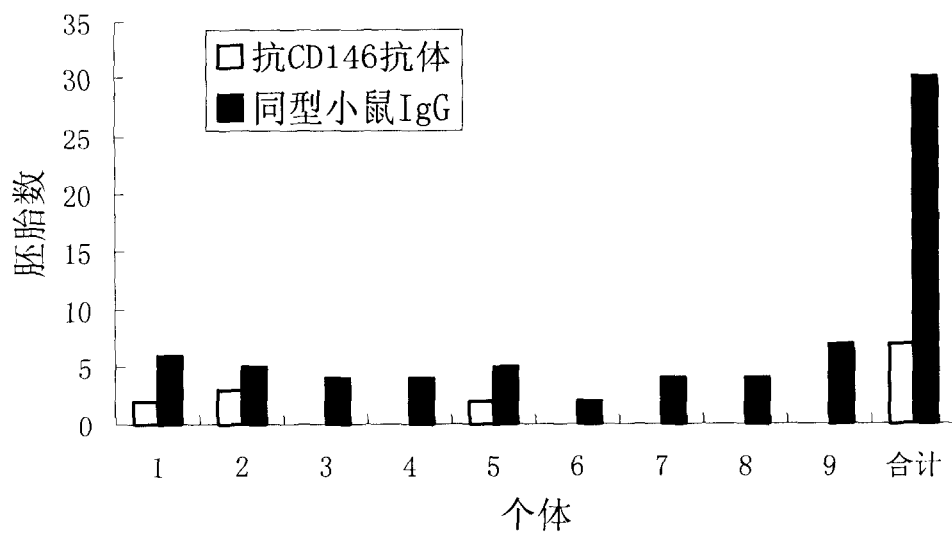


图 22B



图 23