

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C07K 16/40 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109453.8

[43] 公开日 2006年12月13日

[11] 公开号 CN 1878795A

[22] 申请日 2003.12.2

[21] 申请号 200380109453.8

[30] 优先权

[32] 2002.12.2 [33] US [31] 60/430,724

[86] 国际申请 PCT/US2003/038234 2003.12.2

[87] 国际公布 WO2004/050850 英 2004.6.17

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.2

[71] 申请人 阿布格尼克斯公司

地址 美国加利福尼亚

共同申请人 莱克斯康遗传物质公司

[72] 发明人 G·M·兰德斯

M·哈克-弗兰德肖 L·陈

Y·R·李 M·L·梁 X·冯

X·贾 M·R·诺斯瑞尼

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司  
代理人 姜建成 张广育

权利要求书 3 页 说明书 66 页 序列表 71 页  
附图 4 页

[54] 发明名称

针对磷脂酶 A2 的抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及针对抗原磷脂酶 A2 (PLA2) 的抗体以及所述抗体的应用。尤其是, 根据本发明的某些实施方案, 提供针对抗原 PLA2 的完全人源单克隆抗体。本发明提供编码以下序列的核苷酸序列和含有以下序列的氨基酸序列, 所述序列为免疫球蛋白分子的重链和轻链, 特别是对应于跨骨架区和/或互补决定区 (CDR) 的连续重链和轻链序列的序列, 具体从 FR1 到 FR4 或从 CDR1 到 CDR3。本发明还提供表达这些免疫球蛋白分子和单克隆抗体的杂交瘤或其他细胞系。

1. 一种与磷脂酶 A2 (PLA2) 结合的人源单克隆抗体, 并且包括具有选自 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 30 和 31 的氨基酸序列的重链。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体, 进一步包括具有选自 SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 和 28 的氨基酸序列的轻链。
3. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:3 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:4 的氨基序列。
4. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:5 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:6 的氨基序列。
5. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:7 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:8 的氨基序列。
6. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:9 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:10 的氨基序列。
7. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:11 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:12 的氨基序列。
8. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:13 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:14 的氨基序列。
9. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:15 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:16 的氨基序列。
10. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:17 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:18 的氨基序列。
11. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:19 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:20 的氨基序列。
12. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:21 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:22 的氨基序列。
13. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:23 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:24 的氨基序列。
14. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ ID NO:25 的氨基序列, 轻链具有包括序列 SEQ ID NO:26 的氨基序列。
15. 根据权利要求 2 所述的人源单克隆抗体, 其中重链具有包括序列 SEQ

- ID NO:27 的氨基序列,轻链具有包括序列 SEQ ID NO:28 的氨基序列。
16. 一种固定于不溶性基质上的抗体,其中所述抗体为权利要求 2 的抗体。
  17. 一种检测患者样品中磷脂酶 A2 (PLA2) 水平的方法,其中所述方法包括使用权利要求 2 的抗 PLA2 抗体在患者样品分析中检测 PLA2 的水平。
  18. 根据权利要求 17 的方法,其中患者样品为血液。
  19. 一种组合物,包括权利要求 2 的抗体或其结合片段,以及药学上可接受的载体。
  20. 一种有效治疗炎症性疾病的方法,包括:  
选择需要进行炎症性疾病治疗的动物;和  
给所述动物施用治疗有效量的与磷脂酶 A2 (PLA2) 特异性结合的抗体,或其结合片段。
  21. 根据权利要求 20 的方法,其中所述动物为人类。
  22. 根据权利要求 20 的方法,其中所述抗体为完全人源单克隆抗体。
  23. 根据权利要求 20 的方法,其中所述炎症性疾病选自:源于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性和退行性病变,关节炎,牛皮癣,哮喘,阿尔察默病,动脉粥样硬化和再狭窄。
  24. 根据权利要求 20 的方法,其中所述抗体为权利要求 2 的抗体。
  25. 一种有效治疗再狭窄的方法,包括:  
选择需要进行炎症性疾病治疗的动物;和  
给所述动物施用治疗有效量的与磷脂酶 A2 (PLA2) 特异性结合的抗体,或其结合片段。
  26. 根据权利要求 25 的方法,其中所述动物为人类。
  27. 根据权利要求 25 的方法,其中所述抗体为完全人源单克隆抗体。
  28. 根据权利要求 25 的方法,其中所述抗体为权利要求 2 的抗体。
  29. 完全人源抗体或其结合片段在制备有效治疗动物炎症性疾病的药物中的应用,其中所述单克隆抗体或其结合片段与磷脂酶 A2 (PLA2) 结合。
  30. 根据权利要求 29 的应用,其中所述动物为人类。
  31. 根据权利要求 29 的应用,其中所述炎症性疾病选自:源于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性和退行性病变,关节炎,牛皮癣,哮喘,阿尔察默病,动脉粥样硬化和再狭窄。

- 
32. 根据权利要求 29 的应用，其中所述抗体为权利要求 2 的抗体。
  33. 完全人源抗体或其结合片段在制备有效治疗动物再狭窄的药物中的应用，其中所述单克隆抗体或其结合片段与磷脂酶 A2 (PLA2) 结合。
  34. 根据权利要求 33 的应用，其中所述动物为人类。
  35. 根据权利要求 33 的应用，其中所述抗体为权利要求 2 的抗体。

## 针对磷脂酶 A2 的抗体及其应用

### 发明背景

#### 技术领域

本发明涉及针对抗原磷脂酶 A2 (PLA2) 的抗体以及所述抗体的应用。尤其是, 根据本发明的某些实施方案, 提供针对抗原 PLA2 的完全人源单克隆抗体。本发明提供编码以下序列的核苷酸序列和含有以下序列的氨基酸序列, 所述序列为免疫球蛋白分子的重链和轻链, 特别是对应于跨骨架区和 / 或互补决定区 (CDR) 的连续重链和轻链序列的序列, 具体从 FR1 到 FR4 或从 CDR1 到 CDR3。本发明还提供表达这些免疫球蛋白分子和单克隆抗体的杂交瘤或其他细胞系。

#### 背景技术

分泌型磷脂酶 A2 (PLA2) 酶是由小的、含二硫化物的钙依赖酶组成的一类普遍存在的家族, 该酶可催化水解磷脂 sn-2 酯键, 释放溶血磷脂和游离脂肪酸产物。见 E.A. Dennis, *TBE Enzymes*, 第 16 卷, Academic Press, New York (1983)。PLA2 的核苷酸和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO:1 和 2 中表明。两个保守性残基的侧链, 组氨酸和天冬氨酸, 参与催化部位。

具体地说, PLA2 水解 L-1,2-二酰基磷脂的 2-酰基, 生成游离脂肪酸, 例如花生四烯酸和溶血磷脂。溶血磷脂能够破坏细胞和膜, 在与疼痛、发烧和炎症有关的四大类花生酸 (前列腺素, 前列环素, 血栓烷和白三烯) 的生物合成中, 由膜磷脂合成花生四烯酸是限速步骤。花生四烯酸通过两种酶途径代谢, 随后转化为促炎物质, 包括白三烯 (通过脂氧化酶活性)、血栓烷和前列腺素 (两者均通过环加氧酶活性)。这些化学介质募集免疫系统和补体级联反应中的细胞, 产生放大的炎症反应。此外, 已知白三烯 - B4 以反馈环形式作用, 进一步提高 PLA2 活性 (Wijkander, J. 等 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:26543-26549)。

超过 80 种 PLA2 酶已经进行了结构鉴定, 显示高度的序列同源性。J. Chang 等, *Biochem. Pharm.* 36:2429-2436, (1987); F. F. Davidson 和 E. A. Dennis, *J. of Molecular Evolution* 31:228-238 (1990)。PLA2 酶中鉴定最充

分的种类是分泌型，此类酶被释放到细胞外环境中，以帮助消化生物物质。分泌型的分子量约为 12 ~ 15kDa (Davidson 和 Dennis, 同上)。

在哺乳动物细胞中，至少鉴定出四组不同的 PLA<sub>2</sub>，包括组 I (胰腺的)，组 II A，组 II C (炎症的) 和组 V (在心脏中表达)。组 I 中 PLA<sub>2</sub> 酶作用在于消化食物中的脂质，并且有人提出其在细胞增殖、平滑肌收缩和急性肺损伤中具有一定作用。组 II 中 PLA<sub>2</sub> 酶是炎性过程的有效介质，在炎性病变 (inflammatory disorder) 患者的血清和滑液中大量表达。这些酶在检测的多种人细胞类型中均有发现，并在多种病理过程例如败血症休克、肠癌、类风湿性关节炎和表皮增生中表达。组 V 中的一种 PLA<sub>2</sub> 酶已从脑组织中克隆，在心脏组织中强烈表达。其他的 PLA<sub>2</sub> 酶已经从多种人体组织和细胞系中克隆，表明 PLA<sub>2</sub> 酶的高多样性。最近从胎儿肺中克隆了一种人 PLA<sub>2</sub> 酶，根据其结构特征，该酶似乎是被称之为组 X 的哺乳动物 PLA<sub>2</sub> 酶中新一组的第一个成员。(Chen J.等 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:2365-2368; Kennedy, B. P.等 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:22378-22385; Komada, M.等 (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:1059-1065; 和 Cupillard, L.等 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:15745-15752)。

### 发明内容

本发明的实施方案涉及针对 PLA<sub>2</sub> 的抗体。针对抗原 PLA<sub>2</sub> 的抗体可用作降脂质剂 (lipid lowering agent)，例如在治疗动脉粥样硬化和再狭窄中。所述抗体也用于诊断、预防和治疗炎性病变。炎性病变和退行性病变 (degenerative disorder) 可解释绝大多数的衰弱疾病 (debilitating disease)。炎症状态 (state)，例如动脉粥样硬化、关节炎、牛皮癣和哮喘，均源于关节、皮肤和血管处的炎症反应。此外，最近的研究还表明，阿尔察默病 (Alzheimer's disease) 病理的主要部分 (component) 是慢性炎症，给药非类固醇抗炎药物似乎可以减慢阿尔察默病的病情发展。Schnabel, *Science* 260:1719-1720 (1993)。

减弱或消除炎症反应是治疗这些疾病的关键。因此，本文所述抗体用作 PLA<sub>2</sub> 的抑制剂，以阻止从膜磷脂释放花生四烯酸，停止全部花生四烯酸级联反应，从而中止由炎性过程引发的损伤。

本发明的实施方案还包括与 PLA<sub>2</sub> 结合并影响 PLA<sub>2</sub> 功能的单克隆抗体。因此，本发明的实施方案提供具有诊断和治疗所需性质的人源抗 PLA<sub>2</sub>

抗体和抗 PLA2 抗体的制品。具体地说，本发明的一个实施方案提供的抗 PLA2 抗体具有治疗上可利用的特征，包括，例如，但不限于，与 PLA2 的强结合亲和力、体外中和 PLA2 功能的能力和体内长时间中和 PLA2 功能的能力。

本发明的一个实施方案是与 PLA2 结合的完全人源单克隆抗体，并具有选自 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 30 和 31 的重链氨基酸序列。在一个实施方案中，所述抗体进一步包括选自 SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 和 28 的轻链氨基酸序列。

本发明另一实施方案是与 PLA2 结合的完全人源抗体，并包括具有如表 3 和 4 所示的 CDR 序列的重链氨基酸序列。已知 CDR 的测定可由本领域普通技术人员容易地完成。一般地，本发明中所述的 CDR 如 Kabat 等在 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1-3 卷（第五版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD 1991）所定义。

而本发明另一实施方案是与 PLA2 结合的完全人源抗体，并包括具有如表 5 和 6 所示的 CDR 序列的轻链氨基酸序列。

本发明的再一实施方案是与 PLA2 结合的完全人源抗体，并且该抗体包括：具有包括如表 3 和 4 所示序列的 CDR 的重链氨基酸序列，和具有包括如表 5 和 6 所示序列的 CDR 的轻链氨基酸序列。

本发明的再一实施方案是与本发明的完全人源抗体交叉竞争结合 PLA2 的抗体。在本发明另一实施方案中，完全人源抗体是抗 PLA2 单抗 2.12 或抗 PLA2 单抗 2.25。

所述本发明的实施方案基于与 PLA2 特异性结合的分离抗体的产生和识别。如上所讨论，PLA2 在炎症疾病和相关病症（condition）中表达水平提高。因此，抑制 PLA2 的生物活性可延缓由此类疾病和病症引发的综合症的发展。所述疾病或病症可以是，例如，源于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性病变和退行性病变，包括但不限于，关节炎、牛皮癣、哮喘和阿尔察默病，但最优选动脉粥样硬化和再狭窄。

因此，所述本发明的一个实施方案提供与 PLA2 结合的分离抗体或其片段。如本领域所公知，抗体优选为，例如，单克隆、嵌合和/或人源抗体。所述本发明的实施方案还提供产生这些抗体的细胞。

应该领会的是，本发明的实施方案不限于任何特定的抗 PLA2 抗体，或抗体的任何具体形式。例如，抗 PLA2 抗体可以是全长抗体（例如具有

完整的人 Fc 区)或抗体片段(例如 Fab, Fab'或 F(ab')<sub>2</sub>)。此外,抗体可以由分泌该抗体的杂交瘤制备,或者由编码该抗体的单个基因或多个基因转化或转染的重组产生的细胞制备。

在一个优选的实施方案中,本发明包括治疗人类的炎症病症和相关疾病,包括但不限于,源于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性病变和退行性病变,包括但不限于,关节炎、牛皮癣、哮喘和阿尔察默病,但最优选动脉粥样硬化和再狭窄。

在一个实施方案中,抗 PLA2 抗体形成一种药用组合物,包括有效量的所述抗体或其片段,连同药学上可接受的载体或稀释剂。在另一实施方案中,抗 PLA2 抗体或其片段与治疗剂相配合(conjugate)。所述治疗剂可以是毒素或放射性同位素。这些抗体可优选用于治疗疾病,例如,源于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性病变和退行性病变,包括但不限于,关节炎、牛皮癣、哮喘和阿尔察默病,但最优选动脉粥样硬化和再狭窄。

在另一实施方案中,本发明包括一种治疗与患者的 PLA2 表达有关的疾病或病症的方法,所述方法通过给该患者给药有效量的抗 PLA2 抗体实现。患者为哺乳动物患者,优选为人类患者。这些疾病或病症可以是,例如,源于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性病变和退行性病变,包括但不限于,关节炎、牛皮癣、哮喘和阿尔察默病,但最优选动脉粥样硬化和再狭窄。另外的实施方案包括通过下列步骤为哺乳动物治疗与 PLA2 的表达有关的疾病或病症的方法:识别需要进行炎症病症治疗的哺乳动物,给所述哺乳动物给药治疗有效量的抗 PLA2 抗体。

或者,可以给哺乳动物给药抗 PLA2 抗体以防止其感染上与 PLA2 的表达有关的疾病或病症,包括但不限于,炎症病症或相关疾病。抗 PLA2 抗体优选为完全人源抗体。所述疾病或病症可以是,例如,但不限于,基于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性病变和退行性病变,包括但不限于,关节炎、牛皮癣、哮喘和阿尔察默病,并且最优选动脉粥样硬化和再狭窄。

在另一实施方案中,本发明为一个包括一容器、和一包装说明书或标签的制成品,所述容器具有包含抗 PLA2 抗体的组合物,所述包装说明书或标签表明该组合物可用于治疗以 PLA2 的表达为特征的病症。优选哺乳动物,更优选人类接受抗 PLA2 抗体。在一个优选的实施方案中,治疗人类炎症病症和相关疾病。

另一实施方案为一种识别一种疾病的危险因素、诊断一种疾病和判断



一种疾病病期的方法，该方法包括使用抗 PLA2 抗体识别 PLA2 的存在。

在一个实施方案中，本发明包括一种诊断与细胞中 PLA2 的表达有关的病症的方法，所述方法通过将该细胞与抗 PLA2 抗体接触并检测 PLA2 的存在实现。

在另一实施方案中，本发明包括一种检测哺乳动物组织或细胞中的 PLA2 以筛选出人类的炎症病症和相关疾病的检测试剂盒。所述试剂盒包括一种与 PLA2 结合的抗体，和一种显示该抗体与 PLA2（如果存在）反应的工​​具。该抗体优选为单克隆抗体。在一个实施方案中，与 PLA2 结合的抗体被标记。抗体优选使用选自下列的标记物标记：荧光染料、酶、放射性核素和不透射线物质。在另一实施方案中，抗体为未标记的一次抗体，显示反应的工​​具为一种标记的抗免疫球蛋白抗体。

而另一实施方案为一种抗 PLA2 抗体在制备治疗炎症病症和相关疾病的药物中的应用。在一个实施方案中，所述疾病选自基于关节、皮肤和血管处炎症反应的炎性病变和退行性病变，包括但不限于，关节炎、牛皮癣、哮喘和阿尔察默病，但最优选动脉粥样硬化和再狭窄。

### 附图说明

图 1A 为柱状图，显示滴定量的与 0.5 单位 PLA2 酶温育的底物的剂量-反应曲线。

图 1B 为柱状图，显示 KLH 对检测的影响最小。

图 2A 为柱状图，显示与 400nM Bis-BODIPY®底物温育、并由 Fxa 裂解细菌表达的滴定量的酶。

图 2B 为柱状图，显示被 20  $\mu$ l/孔从 G2 和 G4 的 KLH 废弃 (exhaust) 上清液轻微抑制、并由细菌表达的 PLA2 的酶活性。

图 3 为线形图，显示每种抗体所测试的最高剂量的抑制百分率。

图 4 为单抗 2.12 的特异性结合物 (binder) 的肽共有序列的比对结果。

### 具体实施方式

本发明的一个实施方案涉及针对抗原 PLA2 的抗体以及此抗体的应用。例如，针对 PLA2 的抗体可用于对炎症病症和相关疾病进行有效预防、治疗、诊断和 / 或判断病期的方法。所述病症包括，例如，关节、皮肤和血管处的炎症反应，动脉粥样硬化，关节炎，牛皮癣，哮喘，再狭窄和阿

尔察默病。在一个具体的实施方案中，给药治疗有效量的抗 PLA2 抗体以治疗炎症病症和相关疾病。在优选的实施方案中，抗体为针对抗原 PLA2 的完全人源单克隆抗体。

本发明的其他实施方案涉及可导致体内炎症减轻的其他化合物。从而，降低 PLA2 水平的化合物可用于治疗炎症病症。PLA2 核酸、多肽、抗体、促效剂 (agonist)、拮抗剂 (antagonist) 和其他有关化合物的用途会在下文更完全地公开。

另外，本发明的核酸及其片段和变体，可用于(以非限制性举例方式)，(a) 指导相应的编码蛋白、多肽、片段和变体作为重组或异源基因产物的生物合成，(b) 用作检测和定量本文所公开的核酸的探针，(c) 用作制备反义分子的序列模板，等用途。这些用途将在以下公开内容中更完整地叙述。

另外，本发明的蛋白和多肽，及其片段和变体，可应用的方式包括(a) 用作免疫原以激发产生抗 PLA2 抗体，(b) 在此抗体的免疫原性检测中用作捕捉抗原(c) 用作筛选与本发明的 PLA2 多肽结合的物质目标，和(d) 用作 PLA2 特异性抗体的靶，以致使用所述抗体的治疗可抑制炎症反应。PLA2 核酸、多肽、抗体、促效剂、拮抗剂和其他相关化合物的上述用途和其他用途会在下文更完全地公开。由于其调节炎症的效果很强，增强 PLA2 多肽的表达或活性可用于促进炎症。相反，减弱 PLA2 多肽的表达可用于减轻炎症。

### 序列表

序列表中提供了典型的人源抗 PLA2 抗体的重链和轻链可变区核苷酸和氨基酸序列，其内容在表 1 中总结如下。

表 1

单抗 ID No.	序列	SEQ ID NO:
1.5	编码重链可变区的氨基酸序列	3
	编码轻链可变区的氨基酸序列	4
1.7	编码重链可变区的氨基酸序列	5
	编码轻链可变区的氨基酸序列	6
1.14	编码重链可变区的氨基酸序列	7

	编码轻链可变区的氨基酸序列	8
1.18	编码重链可变区的氨基酸序列	9
	编码轻链可变区的氨基酸序列	10
1.21	编码重链可变区的氨基酸序列	11
	编码轻链可变区的氨基酸序列	12
1.27	编码重链可变区的氨基酸序列	13
	编码轻链可变区的氨基酸序列	14
2.7	编码重链可变区的氨基酸序列	15
	编码轻链可变区的氨基酸序列	16
2.9	编码重链可变区的氨基酸序列	17
	编码轻链可变区的氨基酸序列	18
2.12	编码重链可变区的氨基酸序列	19
	编码轻链可变区的氨基酸序列	20
2.15	编码重链可变区的氨基酸序列	21
	编码轻链可变区的氨基酸序列	22
2.19	编码重链可变区的氨基酸序列	23
	编码轻链可变区的氨基酸序列	24
2.23	编码重链可变区的氨基酸序列	25
	编码轻链可变区的氨基酸序列	26
2.25	编码重链可变区的氨基酸序列	27
	编码轻链可变区的氨基酸序列	28
1.3	编码重链可变区的氨基酸序列	29
2.4	编码重链可变区的氨基酸序列	30
2.16	编码重链可变区的氨基酸序列	31

除非另有定义，本文所使用的科技术语的含义与本领域的普通技术人员通常理解的含义相同。另外，除非上下文另有要求，单数形式的术语包括其复数，复数形式的术语也包括其单数。一般地，本文所述细胞和组织培养、分子生物学、蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学，以及杂交有关的术语和技术，都是本技术领域公知的和通常使用的。重组 DNA、寡核苷酸合成、组织培养和转化（例如电穿孔、脂转染(lipofection)）均使用标准技术。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书或本领域常规方法或本文所

述的进行操作。上述技术和方法一般按照本领域所公知的，以及本说明书通篇引用和讨论的多篇一般和具体文献中记载的常规方法进行。参见例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。本文记载的分析化学、有机合成化学、药物化学和制药化学有关的术语、实验室方法和技术均为本领域公知的和通常使用的。化学合成、化学分析、药品的制备、配方和递送以及患者治疗均使用标准技术。

根据所提供的实施方案中使用的下列术语，除非另有说明，按照以下意思理解：

本文使用的术语“分离多核苷酸”是指基因组、cDNA 或合成源的多核苷酸，或其某种组合，依据其来源，“分离多核苷酸”（1）与“分离多核苷酸”天然存在于其中的另一个多核苷酸的全部或部分没有关联，（2）有效连接到与其无天然连接的另—多核苷酸，或者（3）不作为较大序列的一部分天然存在。

本文使用的术语“分离蛋白质”是指 cDNA、重组 RNA 或合成来源的，或其某种形式的组合的蛋白质，依据其来源或起源，“分离蛋白质”（1）不与自然界中发现的蛋白质有关联，（2）不含有相同来源的其他蛋白质，如不含有鼠蛋白（murine protein），（3）在另一不同物种的细胞中表达，或（4）在自然界中不存在。

本文使用的“多肽”作为一个通用术语，是指天然蛋白、片段或多肽序列的类似物。所以，天然蛋白、片段和类似物是多肽属的几种。根据本发明，优选的多肽包括人源重链免疫球蛋白分子和人源 κ 轻链免疫球蛋白分子，以及由包括重链免疫球蛋白分子，轻链免疫球蛋白分子，如 κ 轻链免疫球蛋白分子（反之亦然），以及其片段和类似物相结合形成的抗体分子。

本文提到某对象时使用的术语“天然存在”是指该对象可以在自然界中发现的事实。例如，一段多肽或多核苷酸序列，存在于生物有机体（包括病毒）中，可以从天然源中分离，并且没有在实验室中经过人类或其他途径有意地修饰，这样的多肽或多核苷酸序列就是天然存在的。

本文使用的术语“有效连接”是指所述各元件的位置关系，可使它们以预期方式发挥功能。一段控制序列“有效连接”到一段编码序列，其连接方式可以在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。

本文使用的术语“控制序列”是指影响与之相连的编码序列的表达和加工所必须的多核苷酸序列。控制序列的性质因宿主有机体的不同而不同；原核生物中，控制序列一般包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列；真核生物中，控制序列一般包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在至少包括其存在对表达和加工起重要作用的所有元件，并且还可以包括其存在是有益的附加元件，例如，前导序列和融合配偶体序列（fusion partner sequence）。

本文使用的术语“多核苷酸”是指长度为至少 10 个碱基的多聚体形式的核苷酸，它可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或修饰形式的所述两种核苷酸中的任一种。该术语包括单链和双链形式的 DNA。

本文使用的术语“寡核苷酸”包括由天然存在的和非天然存在的寡核苷酸键连接起来的天然存在的和经过修饰的核苷酸。寡核苷酸是多核苷酸的亚组（subset），通常包括不超过 200 个碱基的长度。寡核苷酸优选为 10 到 60 个碱基长度，最优选 12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 到 40 个碱基长度。寡核苷酸通常为单链，如用于探针；但寡核苷酸也可以为双链，如用于构建基因突变体。本发明的寡核苷酸可以为正义或反义寡核苷酸。

本文使用的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文使用的术语“经过修饰的核苷酸”包括具有修饰或替代的糖基的核苷酸等。本文使用的术语“寡核苷酸键”包括如下寡核苷酸键，例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯（phosphoroselenoate）、二硒代磷酸酯（phosphorodiselenoate）、phosphoroanilothioate、phosphoraniladate、磷酰胺酯（phosphoroamidate）等。参见例如，LaPlanche 等 Nucl. Acids Res. 14:9081(1986)；Stec 等，J. Am. Chem. Soc. 106:6077(1984)；Stein 等 Nucl. Acids Res. 16:3209(1988)；Zon 等 Anti-Cancer Drug Design 6:539(1991)；Zon 等 Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, 87-108 页(F. Eckstein 编辑, Oxford University Press, 英国牛津市(1991))；Stec 等的美国专利 5,151,510；Uhlmann 和 Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)。如果需要，寡核苷酸可以包括检测标记。

本文使用的术语“选择性杂交”是指可检测到的特异性结合。本发明的多核苷酸、寡核苷酸和其片段与核酸链选择性杂交，其杂交和洗涤的条

件应使可检测到的与非特异性核酸结合的可测量的量达到最小。如本领域所公知和本文所讨论的，可使用非常严格的条件获得选择性杂交的条件。一般地，本发明的多核苷酸、寡核苷酸及片段和所研究的核酸序列之间的核酸序列的同源性 (homology) 为至少 80%，更一般地，优选将同源性提高到至少 85%，90%，95%，99% 和 100%。如果两段氨基酸序列部分或完全相同，那么它们是同源的。例如 85% 同源性表示当两段序列以最大匹配的方式比对时，有 85% 的氨基酸是相同的。最大匹配时允许存在间隔 (匹配的两段序列中任一段上)；间隔长度优选 5 或更小，更优选 2 或更小。另一种优选情形，两条蛋白序列 (或来源于蛋白的至少 30 氨基酸长度的多肽序列) 使用带有突变数据矩阵、间隔罚分设置值等于或大于 6 的程序 ALIGN 时，如果它们的比对分数大于 5 (标准差单元)，本文中称之为同源。参见 M.O. Dayhoff, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 101-110 页 (第 5 卷, National Biomedical Research Foundation (1972)) 和该卷的增补本 2, 1-10 页。当使用 ALIGN 程序对两段序列或其部分进行最优比对时，如果它们的氨基酸有多于或等于 50% 相同时，它们即为更优选的同源。本文使用的术语“相应的”表示一段多核苷酸序列与基准多核苷酸序列的全部或部分同源 (即相同，但没有严格的进化关系)，或者一段多肽序列与基准多肽序列相同。与之不同的是，本文使用术语“互补的”表示其互补序列与基准多核苷酸序列的全部或部分同源。举例说明，核苷酸序列“TATAC”与基准序列“TATAC”相应，与“GTATA”互补。

下列术语用于描述两条或多条多核苷酸或氨基酸序列之间的序列关系：“基准序列”“对比窗 (comparison window)”“序列相同 (sequence identity)”“序列相同百分率 (percentage of sequence identity)”和“基本相同 (substantial identity)”。 “基准序列”是用作序列比较基础的规定序列。基准序列可以是较长序列的亚组，比如序列表中所示全长 cDNA 或基因序列的片段，或者可以包括完整的 cDNA 或基因序列。一般地，基准序列至少在 18 核苷酸或 6 氨基酸长度，经常至少 24 核苷酸或 8 氨基酸长度，更经常至少 48 核苷酸或 16 氨基酸长度。既然两段多核苷酸或氨基酸序列中的各段都可以 (1) 包括一段在所述两分子之间相似的序列 (即完整多核苷酸或氨基酸序列的一部分)，并且 (2) 还包括一段在两段多核苷酸或氨基酸序列之间不同的序列，两 (或多) 个分子之间的序列比较一般通过在“对比窗”内比较所述两个分子的序列进行，以便识别和比较部分

区域的序列相似性。本文使用的“对比窗”是指至少 18 个连续的核苷酸或 6 个氨基酸这一概念上的片段，其中多核苷酸序列或氨基酸序列与基准序列上的至少大约 18 个连续的核苷酸或 6 个氨基酸序列相比较，并且其中与基准序列（它不包括插入或缺失）比较，多核苷酸序列在对比窗中的部分可以包括 20% 或更少的插入、缺失、替换等（如间隔）以使两段序列最优比对。用于与对比窗比对的序列的最优比对可以使用以下算法进行：局部同源算法（local homology algorithm），Smith 和 Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)，同源比对算法（homology alignment algorithm），Needleman 和 Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)，寻求相似性方法（search for similarity method），Pearson 和 Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (美国)* 85:2444 (1988)，这些算法的计算机实现（Wisconsin Genetics 软件包版本 7.0 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA，(Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)，Geneworks，或 MacVector 软件包），或者人工比对（by inspection），然后选择通过以上方法产生的最优比对（即在对比窗中产生最高同源百分率）。

术语“序列相同”是指两段多核苷酸或氨基酸序列在对比窗内相同（即基于单个核苷酸或单个氨基酸残基顺次比较）。术语“序列相同百分率”按照如下方法计算：在对比窗内比较两段最优比对的序列，确定两段序列中出现相同的核酸碱基（如 A、T、C、G、U 或 I）或残基的位置的数量，得出匹配位置数，匹配位置数除以对比窗的总位置数（即对比窗的大小），结果再乘以 100 即得到序列相同百分率。本文使用的术语“基本相同”表示多核苷酸或氨基酸序列的一种特性，其中多核苷酸或氨基酸包括一段至少 85% 序列相同的序列，优选至少 90~95% 序列相同，更优选至少 99% 序列相同，以上结果是在对比窗内至少 18 个核苷酸（6 氨基酸）位置上，更经常至少 24~48 个核苷酸（8~16 氨基酸）位置上与基准序列比较得出的，其中序列相同百分率是通过在对比窗内比较基准序列与某一序列计算得到的，该序列可以包括总计为基准序列的 20% 或以下的缺失或插入。基准序列可以是更长序列的亚组。

本文引用的 20 种常规氨基酸及其缩写遵循常规使用方式。参见 *Immunology--A Synthesis* (第二版, E. S. Golub 和 D. R. Gren 编辑, Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))。20 种常规氨基酸的立体异构体（如 D-氨基酸），非天然氨基酸如  $\alpha$ - $\alpha$ -双取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸，

以及其他非常规氨基酸也可以是本发明的多肽的适宜组分。非常规氨基酸的例子包括：4-羟基脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸、 $\epsilon$ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 $\epsilon$ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 $\sigma$ -N-甲基精氨酸，以及其他类似氨基酸和亚氨基酸（如4-羟基脯氨酸）。本文所用的多肽表示方法中，左手方向为氨基末端方向，右手方向为羧基末端方向，与标准用法和惯例一致。

类似地，除非另有说明，单链多核苷酸序列的左手端为5'端；双链多核苷酸序列的左手方向为5'方向。新生RNA转录物5'到3'延伸的方向为转录方向；DNA链上序列和RNA相同，且在RNA转录物5'端5'的序列区称作“上游序列”；DNA链上序列和RNA相同的，且在RNA转录物3'端3'的序列区称作“下游序列”。

当涉及多肽时，术语“基本相同”是指两段多肽序列，当它们最优比对时，比如使用GAP或BESTFIT程序以默认间隔权重比对时，共有至少80%的序列相同，优选至少90%的序列相同，更优选至少95%的序列相同，最优选至少99%的序列相同。优选地，不相同的残基位置是由于保守性氨基酸替换引起的。保守性氨基酸替换是指侧链相似的残基之间的可替换性。例如，具有脂肪族侧链的一组氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸为丝氨酸和苏氨酸；具有含酰胺侧链的一组氨基酸为天冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳香侧链的一组氨基酸为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；具有碱性侧链的一组氨基酸为赖氨酸、精氨酸和组氨酸；具有含硫侧链的一组氨基酸为半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守性氨基酸替换组为：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

如本文所讨论，抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列中微小变异被认为包含在本发明之内，只要氨基酸序列的变异保持至少75%，更优选至少80%、90%、95%，最优选99%。特别地，考虑保守性氨基酸替换。保守性替换是发生在具有相关侧链的同一氨基酸家族内的替换。正常编码的氨基酸一般分为以下几个家族：（1）酸性=天冬氨酸、谷氨酸；（2）碱性=赖氨酸、精氨酸、组氨酸；（3）无极性=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸；以及（4）无电荷极性=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。更优



选家族为：丝氨酸与苏氨酸为脂肪族-羟基家族；天冬酰胺和谷氨酰胺为含酰胺家族；丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸为脂肪家族；以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸为芳香家族。例如有理由相信，亮氨酸同异亮氨酸或缬氨酸、天冬氨酸同谷氨酸、苏氨酸同丝氨酸的单独替换，或者氨基酸同其结构相近的氨基酸的类似替换不会对所生成分子的结合或性质有较大影响，特别是替换没有涉及到框架位点内的氨基酸时。氨基酸改变是否产生功能性肽，可易于通过测试多肽衍生物的特异活性检测。本文对检测方法作详细描述。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可易于由本领域的普通技术人员制备。优选地，片段或类似物的氨基和羧基末端位于功能区的近边界处。可以通过比较公共或专有序列数据库中的核苷酸和/或氨基酸序列数据来识别结构和功能区域。优选地，使用计算机比较法来识别存在于结构和/或功能已知的其他蛋白中的序列基序(sequence motif)或预测的蛋白构象区域。识别出折叠成已知三维结构的蛋白序列的方法已经公知。Bowie等 *Science* 253:164 (1991)。所以，以上例子说明，本领域技术人员可以识别用于确定与本发明一致的结构和功能区域的序列基序和结构构象。

优选的氨基酸替换是能够：(1)降低蛋白分解敏感性，(2)降低氧化敏感性，(3)改变形成蛋白复合物的结合亲和力，(4)改变结合亲和力，以及(4)赋予或改变其类似物其他物理化学或功能性质的替换。类似物可以包括序列不同于天然存在的肽序列的各种突变蛋白质。例如，单个或多个氨基酸替换(优选保守性氨基酸替换)可以发生于天然存在的序列(优选在形成分子间接触的区域之外的多肽部分)中。保守性氨基酸替换应该基本不改变亲代序列(parent sequence)的结构特性(例如，替换氨基酸应该不会破坏亲代序列中存在的螺旋，或破坏亲代序列特征性的其他类型的二级结构)。本领域已识别的多肽二级和三级结构的例子记载在 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton 编辑, W. H. Freeman and Company, 纽约(1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden 和 J. Tooze 编辑, Garland Publishing, 纽约州纽约市(1991)); 和 Thornton 等 *Nature* 354:105 (1991)。

本文使用的术语“多肽片段”是指一段多肽，其氨基末端和/或羧基末端缺失，但其余氨基酸序列同起源于，例如，全长cDNA序列的天然存在的序列中的相应位置相同。片段通常有至少5、6、8或10氨基酸长度，

优选至少 14 氨基酸长度，更优选至少 20 氨基酸长度，通常至少 50 氨基酸长度，以及更优选至少 70 氨基酸长度。本文使用的术语“类似物”是指包括至少 25 个氨基酸片段的多肽，其与导出 (deduced) 的氨基酸序列的一部分基本相同，并且至少具备下列性质之一：(1) 在适宜的结合条件下，与 PLA2 特异结合，(2) 阻止与 PLA2 正确结合的能力，或 (3) 体外或体内抑制表达 PLA2 的细胞生长的能力。通常，相对于天然存在的序列，多肽类似物包含保守性氨基酸替换 (或插入或缺失)。类似物通常为至少 20 氨基酸长度，优选至少 50 氨基酸长度或更长，并且经常可与全长的天然存在的多肽长度相等。

肽类似物通常作为与其模板肽有相似性质的非肽药物在制药工业上使用。这些类型的非肽化合物被称为“肽模仿剂 (peptide mimetics)”或“拟肽物 (peptidomimetics)”。Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber 和 Freidinger *TINS* 392 页 (1985); 和 Evans 等 *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987)。这些化合物通常借助计算机化的分子模型开发。与治疗有效的肽结构相似的肽模仿剂可用于产生等效的治疗或预防效果。一般地，拟肽物在结构上与范例多肽 (paradigm polypeptide, 即具有生化性质或药理活性的多肽)，例如人源抗体相似，但其一个或多个肽键可任选地由下列键替换，所述键选自： $--CH_2NH--$ 、 $--CH_2S--$ 、 $--CH_2-CH_2--$ 、 $--CH=CH--$  (顺式和反式)、 $--COCH_2--$ 、 $--CH(OH)CH_2--$  和  $--CH_2SO--$ ，使用的方法已为本领域所公知。可以使用同型 D-氨基酸系统地替换共同序列中一个或多个氨基酸 (如 D-赖氨酸代替 L-赖氨酸) 以生产更稳定的肽。另外，包含共同序列或基本相同的共同序列变异体的约束肽 (constrained peptide) 也可用本领域公知方法合成 (Rizo 和 Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992))；例如，加入内半胱氨酸残基能够形成分子内二硫桥键，可使肽环化。

“抗体”或“抗体肽”是指完整的抗体，或与完整的抗体竞争特异结合的其结合片段。结合片段通过重组 DNA 技术，或通过酶或化学方法切割完整的抗体产生。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 和单链抗体。除了“双特异性”或“双功能”抗体外的抗体可理解为其各结合位点相同。过量的抗体使与反受体结合的受体数量减少至少大约 20%、40%、60% 或 80%，更经常地在 85% 以上 (根据体外竞争结合测试所得数据) 时，抗体显著地抑制受体与反受体的结合。

术语“表位 (epitope)”包括任何可与免疫球蛋白或 T 细胞受体特异结合的蛋白决定簇。表位决定簇通常由具有化学活性的分子表面基团组成，如氨基酸或糖基侧链，并且通常具有特异的三维结构特性，以及特异的电荷特性。当离解常数 $\leq 1\mu\text{M}$ ，优选 $\leq 100\text{ nM}$ ，最优选 $\leq 10\text{ nM}$ 时，就可以说，抗体与抗原特异结合。

本文使用的术语“试剂”是指化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子、或生物材料制成的提取物。

就本发明而言，所使用的“活性的”或“活性”是指保持天然的或自然存在的 PLA2 多肽的生物和 / 或免疫活性的 PLA2 多肽形式，其中“生物”活性是指由天然或自然存在的 PLA2 多肽引起的生物功能（抑制或激发），而不是指诱导产生针对天然或自然存在的 PLA2 多肽所具有的抗原表位的抗体的能力，“免疫”活性是指诱导产生针对天然或自然存在的 PLA2 多肽所具有的抗原表位的抗体的能力。

“治疗”是指治疗 (therapeutic treatment) 和预防措施，其目标是防止或减缓（减轻）目标病理情况或异常。需要治疗者包括已经具有所述异常者，以及易于患上所述异常者或试图预防所述异常者。

“哺乳动物”是指任何可分类为哺乳动物的动物，包括人，其他灵长类，例如猴子、黑猩猩和大猩猩，家畜和农畜，以及动物园饲养的动物、体育竞技动物、实验室用动物或玩赏动物，例如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔、啮齿动物等等。对治疗来说，哺乳动物优选为人类。

本文使用的“载体”包括在使用的剂量和浓度下对细胞或哺乳动物没有毒性的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。通常生理上可接受的载体为含水 pH 缓冲溶液。生理上可接受的载体的实例包括缓冲液，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量（小于约 10 个残基）多肽；蛋白，例如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖，及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例如 EDTA；糖醇，例如甘露醇或山梨糖醇；盐形式平衡离子，例如钠；和 / 或非离子型表面活性剂，例如 TWEEN<sup>TM</sup>、聚乙二醇 (PEG) 和 PLURONICS<sup>TM</sup>。

木瓜蛋白酶消化抗体可产生两个相同的称为“Fab”片段的抗原结合片段和一个残余的“Fc”片段，前者每个片段带有单个抗原结合部位；后

者的名称反映了其能够容易地结晶。胃蛋白酶处理生成一个" $F(ab')_2$ "片段,该片段具有两个抗原结合部位,并且仍然能够交联抗原。

"Fv"是包含抗体的完整的抗原识别和结合部位的最小抗体片段。这一部分由一个重链可变区和一个轻链可变区通过紧密的非共价键结合的二聚物组成。在此结构中,每个可变区的三个 CDR 相互作用以确定 VH-VL 二聚物表面的抗原结合部位。这六个 CDR 共同赋予此抗体以抗原结合特异性。然而,例如,即使单个可变区(如, Fv 二聚物的 VH 或 VL 部分,或只包括三个特异性针对抗原的 CDR 的半个 Fv)也可能具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力比完整结合部位要低。

Fab 片段也包含轻链恒定区和重链第一恒定区(CH1)。Fab 片段与 Fab' 片段的不同之处在于,前者在重链 CH1 区的羧基末端增加了几个残基,所述重链 CH1 区包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。 $F(ab')_2$  抗体片段最初作为一对其间具有铰链半胱氨酸的 Fab' 片段而产生。抗体片段的其他化学耦合方式也为公知。

"固相"是指一种本文所述抗体可附着于其上的非水性基质。本文所涵盖的固相的例子包括,部分或全部由玻璃形成的物质(如可控孔度玻璃(controlled pore glass)),多糖(如琼脂糖),聚丙烯酰胺,聚苯乙烯,聚乙烯醇和硅酮。在某些实施方案中,根据上下文,固相可以包括检测板的孔;在其他实施方案中,固相为纯化柱(如亲和层析柱)。本术语还包括离散微粒的非连续固相,例如美国专利 No. 4,275,149 中所述。

本文使用的术语"脂质体"表示一种由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小泡,所述表面活性剂可用于将药物(如 PLA2 多肽或其抗体)运送至哺乳动物。脂质体成分通常排列成双分子层的形式,类似于生物膜的脂质排列。

本文使用的术语"小分子"描述一种分子量小于约 500 道尔顿的分子。

本文使用的术语"标记"或"标记的"是指加入可检测标记物,例如,通过加入放射性标记的氨基酸,或者通过附着于可由标记的亲和素(例如,含有荧光标记物或可由光学方法或比色法检测的酶活性的链亲和素)检测的生物素基部分的多肽。在某些情况下,标记或标记物也可有治疗作用。标记多肽和糖蛋白的多种方法在本领域中是公知的且可以使用。标记多肽的实例包括但不限于以下内容:放射性同位素或放射性核素(如  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ), 荧光标记(如 FITC、罗丹明、

铜系磷光体)，酶标记（如辣根过氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶），化学发光，生物素基，可被二次报道分子识别的预先确定的多肽表位（如，亮氨酸拉链对序列，二次抗体结合部位，金属结合区域，表位标记）。在一些实施方案中，通过不同长度的间隔臂附着标记物以减少可能存在的空间位阻。

本文使用的术语“治疗药剂或药物”是指正确给药至患者时产生所需治疗效果的化学化合物或组合物。本文使用的其他化学术语与本领域的常规用法一致，示例可以参见：*The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S.编辑, McGraw-Hill, 圣弗朗西斯科(1985))。

本文使用的“基本纯净”是指目标种类为存在的主要种类（即，以摩尔数计，它在组合物中的含量比其他任何一种都多），优选地，基本纯化的组分是指其中目标种类占所存在的全部大分子种类的至少约 50%（以摩尔数计）的组合物。一般地，基本纯净的组合物应占组合物中所存在的全部大分子种类的约 80% 以上，更优选 85%、90%、95%、以及 99% 以上。最优选地，目标种类纯化到基本同质的程度（使用常规检测方法在组合物中检测不到杂质类），此时组合物主要由单一大分子种类组成。

术语“患者”包括人类和兽类个体。

### 抗 PLA2 抗体

抗体，或其部分、片段、模仿物（mimetics）或衍生物，可以是识别 PLA2 的任何类型的抗体或部分。在某些实施方案中，抗体或其部分优选可以中和 PLA2。在另一些实施方案中，抗体或其部分优选可以减轻与炎症病症相关的综合症，包括但不限于炎症、体液潴留、组织肿胀、疼痛、浮肿、高血压和脑肿胀。

### 抗体结构

已知基本的抗体结构单元包括一个四聚体。各四聚体由两对相同的多肽链组成，每对具有一条“轻”链（大约 25kDa）和一条“重”链（大约 50-70kDa）。各链的氨基末端部分包括由大约 100 到 110 或更多氨基酸组成的可变区，主要负责抗体识别。各链的羧基末端部分形成恒定区，主要负责效应物功能。来自人类的轻链可分为  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链。重链可分为  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$  或  $\epsilon$ ，分别定义抗体的同种型 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻

链和重链内部，可变区和恒定区由约 12 或更多氨基酸组成的“J”区连接，重链还包括约 10 或更多氨基酸组成的“D”区。大体参见，*Fundamental Immunology* 第 7 章 (Paul, W.编辑，第 2 版. Raven Press, 纽约(1989)). 各轻 / 重链对的可变区形成抗体的结合位点。所以，完整的抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中之外，这两个结合位点是相同的。

所有链均显示出大体相同的结构，即相对保守的骨架区 (FR) 连接三个高变区，后者也被称为互补决定区或 CDR。各对两条链上的 CDR 沿骨架区排列，使之可与特异表位结合。从 N-末端到 C-末端，轻链和重链都包括区域 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 和 FR4。氨基酸在各区域上的分配与下列文献中的定义一致：*Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, 马里兰州贝赛斯达 (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia 等 *Nature* 342:878-883 (1989)。

双特异性或双功能抗体是人工杂化的抗体，具有两不同的重 / 轻链对和两个不同的结合位点。双特异性抗体可通过多种方法制备，包括杂交瘤细胞的融合或 Fab' 片段的连接。参见，例如，Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny 等 *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)。相对于制备常规抗体，制备双特异性抗体的劳动强度更大，并且产量和纯度一般较低。只有单一结合位点的片段形式 (如 Fab, Fab' 和 Fv) 中不存在双特异性抗体。

应该领会，此类双功能抗体或双特异性抗体均已被本发明考虑并涵盖于本发明之中。

### 人源抗体和抗体的人源化

所述本发明的实施方案还考虑和涵盖了人源抗体。为人类治疗时，人源抗体避免了与具有鼠或大鼠可变区和 / 或恒定区的抗体有关的某些问题。存在此类鼠或大鼠来源的蛋白可以导致该抗体的快速清除，或者可以导致患者产生针对该抗体的免疫应答。为了避免使用鼠或大鼠来源的抗体，已设想可通过将人源抗体功能引入啮齿动物使得啮齿动物产生完全人源抗体的方法来开发人源化抗体或产生完全人源抗体。

### 人源抗体

产生完全人源抗体的一种方法是通过使用基因工程改造的 XenoMouse®品系的小鼠，在其基因组中含有人源重链和轻链基因。例如，Green 等，*Nature Genetics* 7:13-21(1994)中描述了一种 XenoMouse®小鼠，所述小鼠包含人源重链基因座 (locus) 和  $\kappa$  轻链基因座的 245kb 和 190kb 大小的种系结构片段。通过分别使用人源重链基因座和  $\kappa$  轻链基因座的兆碱基大小的种系结构 YAC 片段，将 Green 等的工作延伸至引入全部人源抗体的超过约 80%。见 Mendez 等，*Nature Genetics* 15:146-56(1997)和美国专利申请系列号 08/759,620，申请日 1996 年 12 月 3 日。而且，已经产生包含全部  $\lambda$  轻链基因座的 XenoMouse®小鼠 (美国专利申请系列号 60/334,508，申请日 2001 年 11 月 30 日)。并且可产生多种同种型的 XenoMouse®小鼠也已经产生 (见，例如 WO 00/76310)。XenoMouse®品系可从 Abgenix, Inc. (Fremont, CA) 购得。

XENOMOUSE®的生产在以下文献中有进一步的讨论和描述：以下美国专利申请系列号，包括 1990 年 1 月 12 日提交的 No. 07/466,008、1990 年 11 月 8 日提交的 No. 07/610,515、1992 年 7 月 24 日提交的 No. 07/919,297、1992 年 7 月 30 日提交的 No. 07/922,649、1993 年 3 月 15 日提交的 No. 08/031,801、1993 年 8 月 27 日提交的 No. 08/112,848、1994 年 4 月 28 日提交的 No. 08/234,145、1995 年 1 月 20 日提交的 No. 08/376,279、1995 年 4 月 27 日提交的 No. 08/430,938、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/464,584、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/464,582、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/463,191、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/462,837、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/486,853、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/486,857、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/486,859、1995 年 6 月 5 日提交的 No. 08/462,513、1996 年 10 月 2 日提交的 No. 08/724,752 和 1996 年 12 月 3 日提交的 No. 08/759,620 以及美国专利包括 No. 6,162,963、No. 6,150,584、No. 6,114,598、No. 6,075,181 和 No. 5,939,598 和日本专利 No. 3 068 180 B2、No. 3 068 506 B2 和 No. 3 068 507 B2。参见 Mendez 等 *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) 和 Green 和 Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998)。另外参见 1996 年 6 月 12 日授权公开的欧洲专利 EP 0 463 151 B1、1994 年 2 月 3 日公开的国际专利申请 WO 94/02602、1996 年 10 月 31 日公开的国际专利申请 WO 96/34096、1998 年 6 月 11 日公开的 WO 98/24893、2000 年 12 月 21 日公开的 WO 00/76310。

在另一种方法中,其他人,包括 GenPharm International, Inc.使用“微基因座 (minilocus)”方法。在微基因座方法中,模拟外源 Ig 基因座是通过包含来自 Ig 基因座的片段(单个基因)实现的。这样,一个或多个 V<sub>H</sub> 基因、一个或多个 D<sub>H</sub> 基因、一个或多个 J<sub>H</sub> 基因、一个 μ 恒定区、以及第二个恒定区(优选 γ 恒定区)形成一个构建体以插入动物体内。这种方法记载在: 颁给 Surani 等的美国专利 5,545,807 和颁给 Lonberg 和 Kay 的美国专利 5,545,806、No. 5,625,825、No. 5,625,126、No. 5,633,425、No. 5,661,016、No.5,770,429、No. 5,789,650、No.5,814,318、No. 5,877,397、No. 5,874,299 和 6,255,458, 颁给 Krimpenfort 和 Berns 的美国专利 5,591,669 和 6,023.010、颁给 Berns 等的美国专利 5,612,205、No. 5,721,367 和 No. 5,789,215 和颁给 Choi 和 Dunn 的美国专利 5,643,763 和 GenPharm International 的美国专利申请系列号,包括 1990 年 8 月 29 日提交的 No. 07/574,748、1990 年 8 月 31 日提交的 No. 07/575,962、1991 年 12 月 17 日提交的 No. 07/810,279、1992 年 3 月 18 日提交的 No. 07/853,408、1992 年 6 月 23 日提交的 No. 07/904,068、1992 年 12 月 16 日提交的 No. 07/990,860、1993 年 4 月 26 日提交的 No. 08/053,131、1993 年 7 月 22 日提交的 No. 08/096,762、1993 年 11 月 18 日提交的 No. 08/155,301、1993 年 12 月 3 日提交的 No. 08/161,739、1993 年 12 月 10 日提交的 No. 08/165,699、1994 年 3 月 9 日提交的 No. 08/209,741。另外参见欧洲专利 546 073 B1、国际专利申请 WO 92/03918、WO 92/22645、WO 92/22647、WO 92/22670、WO 93/12227、WO 94/00569、WO 94/25585、WO 96/14436、WO 97/13852 和 WO 98/24884 和美国专利 5,981,175。进一步参见 Taylor 等, 1992, Chen 等, 1993, Tuailon 等, 1993, Choi 等, 1993, Lonberg 等, (1994), Taylor 等, (1994), 和 Tuailon 等, (1995), Fishwild 等, (1996)。

Kirin 也验证了从小鼠中产生人源抗体的方法,通过微细胞融合,大片段染色体或整条染色体被导入小鼠中。见欧洲专利申请 No. 773 288 和 No. 843 961。

Lidak Pharmaceuticals (现在的 Xenorex) 也已证实,通过向 SCID 小鼠注射来自于人类供体的非恶性成熟外周白血球以进行处理(modify),可以产生人源抗体。处理后的小鼠显示了人类供体受到免疫原刺激时出现的特征性免疫应答,所述免疫应答即产生人源抗体。见美国专利 No. 5,476,996 和 5,698,767。



人抗鼠抗体 (HAMA) 应答使业界开发出嵌合的或者其他形式的人源化的抗体。虽然嵌合抗体具有人源恒定区和鼠源可变区, 但预期可观察到某种人抗嵌合抗体 (HACA) 应答, 特别是在长期或多倍剂量使用抗体的情形下。所以, 期望提供针对 PLA2 的完全人源抗体, 以消除 HAMA 或 HACA 应答的影响和 / 或效果。

### 人源化和呈现 (display) 技术

正如以上所讨论的与人源抗体的产生有关的问题, 产生免疫原性减弱的抗体具有许多优势。某种程度上, 这可以通过选用适当的文库将人源化技术和呈现技术相结合以实现。应该领会, 鼠源抗体或来自于其他物种的抗体可以使用本领域公知的技术人源化或灵长类源化。见, 例如, Winter 和 Harris, *Immunol Today* 14:43-46(1993)和 Wright 等, *Crit, Reviews in Immunol.* 12:125-168(1992)。所研究抗体可通过重组 DNA 技术改造, 使用相应的人源序列替换 CH1, CH2, CH3, 铰链区和 / 或骨架区 (见 WO 92/02190 和美国专利 No. 5,530,101, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,792, 5,714,350 和 5,777,085)。将 Ig 的 cDNA 用于构建嵌合免疫球蛋白基因也已为本领域所公知 (Liu 等, *P.N.A.S.* 84:3439(1987)和 *J. Immunol.* 139:3521(1987))。从产生抗体的杂交瘤或其他细胞中分离 mRNA 并用于产生 cDNA。所研究 cDNA 可选用特异性引物通过聚合酶链反应扩增 (美国专利 No. 4,683,195 和 4,683,202)。另外, 可建立和筛选文库以分离所研究序列。然后将编码抗体可变区的 DNA 序列与人源恒定区序列融合。人源恒定区基因序列可在以下文献中找到: Kabat 等, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," N.I.H. publication no. 91 - 3242 (1991)。人源 C 区基因可从已知克隆中容易地获得。同种型的选择要根据所需效应物功能, 例如补体固定或抗体依赖细胞的细胞毒性活性。优选的同种型为 IgG1, IgG3 和 IgG4。可以使用任一种人源轻链恒定区, 即  $\kappa$  或  $\lambda$ 。然后用常规方法表达嵌合的人源化的抗体。

抗体片段, 例如 Fv、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fab, 可通过裂解完整的蛋白来制备, 例如通过蛋白酶或化学方法裂解。另一方法为设计一种截短型基因

(truncated gene)。例如, 编码部分 F(ab')<sub>2</sub> 片段的嵌合基因包括编码 H 链的 CH1 区和铰链区的 DNA 序列, 然后是翻译终止密码子, 以产生截短型分子。

重链和轻链 J 区的共有序列可用来设计寡核苷酸, 所述寡核苷酸可用作引物以将有限的限制位点引入 J 区, 以便随后将 V 区节段 (segment) 与人源 C 区节段连接。C 区 cDNA 可通过定向诱变修饰, 以在人源序列的类似位置放置限制位点。

表达载体包括质粒、反转录病毒、YAC、EBV 来源的附加体等等。方便的载体是可编码功能完备的人源 CH 或 CL 免疫球蛋白序列的载体, 其中合适的限制位点通过基因改造以使任何 VH 或 VL 序列可以容易地插入和表达。在这样的载体中, 剪接通常发生在插入的 J 区中的剪接供体位点和人源 C 区之前的剪接受体位点之间, 并且还发生在人源 CH 外显子中的剪接区。聚腺苷酸化和转录终止发生在编码区下游的天然染色体位点处。产生的嵌合抗体可以连接于任何强 (strong) 启动子, 包括反转录病毒 LTR, 如 SV-40 早期 (early) 启动子 (Okayama 等, *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983))、劳斯肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus) LTR (Gorman 等, *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)) 和莫洛尼氏小鼠白血病病毒 (moloney murine leukemia virus) LTR (Grosschedl 等, *Cell* 41:885 (1985))。应该领会, 还可以使用天然 Ig 启动子等。

而且, 人源抗体或其他物种来源的抗体可以使用本领域公知的技术通过呈现类技术产生, 包括但不限于噬菌体呈现、反转录病毒呈现、核糖体呈现及其他技术, 得到的分子可进行进一步的成熟, 例如亲合力成熟, 这些技术已为本领域所公知。Wright 和 Harris, *同上*, Hanes 和 Pluchau, *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (核糖体呈现), Parmley 和 Smith, *Gene* 73:305-318 (1988) (噬菌体呈现), Scott, *TIBS* 17:241-245 (1992), Cwirla 等, *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990), Russel 等, *Nucl. Acids Res.* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom 等, *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell 和 McCafferty, *TIBTECH* 10:80-84 (1992), 和美国专利 No. 5,733,743。如果呈现技术用于产生非人源抗体, 则这些抗体可以如上所述进行人源化。

使用这些技术, 可以产生针对表达 PLA2 的细胞、针对 PLA2 本身、针对 PLA2 的各种形式、针对其表位或肽和针对其表达文库的抗体 (见例如美国专利 No. 5,703,057), 所述表达文库可随后用来按上述方式筛选上述活性。

## 抗体制备

通过使用 XenoMouse® 技术, 制备出 PLA2 特异性的完全人源单克隆抗体。主要过程为, 使用 PLA2 或其片段免疫 XenoMouse® 小鼠品系, 从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞 (如 B 细胞), 回收的细胞与骨髓瘤细胞系融合以制备永生杂交瘤细胞系, 对这些杂交瘤细胞系进行筛选和选择以识别出可产生 PLA2 特异性抗体的杂交瘤细胞系。此外, 本文还叙述了这些细胞系所产生的抗体的鉴定, 包括这些抗体的重链和轻链的核苷酸和氨基酸序列分析。

或者, 如果不与骨髓瘤细胞融合产生杂交瘤细胞, 那么, 从经过免疫的小鼠 XENOMOUSE® 品系分离出的回收细胞, 进一步筛选其针对初始抗原的反应性, 初始抗原优选为 PLA2 蛋白。此筛选包括: 使用 PLA2-His 蛋白进行酶联免疫吸附分析 (ELISA), 用与目标抗原结合的已知抗体进行竞争实验, 和在体外结合表达全长 PLA2 的瞬时转染的 CHO 细胞。然后使用 PLA2 特异性溶血蚀斑试验分离出分泌目标抗体的单个 B 细胞 (Babcock 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, i93:7843-7848 (1996))。用于裂解的靶细胞优选为包被有 PLA2 抗原的绵羊红细胞 (SRBC)。在可分泌目标免疫球蛋白的 B 细胞培养物和补体存在的条件下, 蚀斑的形成表明靶细胞有特异性的、PLA2 介导的裂解。蚀斑中央可分离出单个抗原特异性浆细胞, 并且从单个浆细胞中可分离出编码抗体特异性的遗传信息。使用逆转录酶 PCR, 可克隆出编码所分泌抗体的可变区的 DNA。此克隆 DNA 可进一步插入合适的表达载体, 优选载体盒 (vector cassette) 如 pcDNA, 更优选含有免疫球蛋白重链和轻链恒定区的 pcDNA 载体。然后将生成的载体转染到宿主细胞中, 优选 CHO 细胞中, 并在常规培养基中培养, 培养基可改良为适于诱导启动子、选择转化体或扩增编码目标序列的基因。然后分离出编码抗 PLA2 的抗体特异性的遗传物质, 将其导入合适的表达载体, 并将载体转染至宿主细胞中。

一般地, 由以上提到的细胞系产生的抗体具有带有人源  $\kappa$  轻链的完全人源 IgG2 重链或带有人源  $\kappa$  轻链的完全人源 IgG4 重链。抗体具有高亲和力, 当在固相和溶液相中测量时, 其  $K_d$  值通常在约  $10^{-6}$  到约  $10^{-11}$  M 之间。

鉴于亲和力在抗 PLA2 抗体治疗用途中的重要性, 应该理解, 可以通过例如组合方法制备抗 PLA2 抗体, 并且可以测定这些抗体的结合亲和力。可以使用的一个方法为, 从以上述方法制备并且发现对 PLA2 具有强亲和

力的抗体中获取重链 cDNA，从以上述方法制备并且同样发现对 PLA2 具有强亲和力的第二抗体中获取轻链 cDNA，将两者结合产生第三抗体。得到的第三抗体的亲和力可以用本文所述的方法测量，并分离和鉴定具有期望离解常数的抗体。另一种方法是，上述任何抗体的轻链可用作帮助生成重链的工具，当所述重链与此轻链配对时，会显示对 PLA2 的高亲和力，或者，反之亦然。文库中重链可变区可以从天然动物中分离，从超免疫动物中分离，从包含 CDR 区不同的可变重链序列的文库中人工产生，或者通过可在任何重链可变区基因的 CDR 区产生多样性的任何其他方法产生（如随机诱变或定向诱变）。这些 CDR 区，特别是 CDR3，和最初与原始抗体配对的重链在长度或序列相同性上的差异显著。生成的文库随后可用于筛选与 PLA2 结合的高亲和力抗体，以生成与治疗有关的抗体分子，所述抗体分子与原始抗体具有类似的性质（高亲和力和中和作用

（neutralization））。一种使用重链或重链可变区的类似方法可用于生成具有独特轻链可变区的与治疗有关的抗体分子。此外，此新重链可变区或轻链可变区，可随后以如上所述的类似方式用于识别另一个新轻链可变区或重链可变区，进而可产生新抗体分子。

可使用的另一种组合方法为，在种系重链和 / 或轻链上施行诱变，该方法被证实可用于所述根据本发明的抗体，特别是互补决定区（CDR）。得到的抗体的亲和力可以用本文所述的方法测量，并分离和鉴定具有期望离解常数的抗体。一旦选择出优选的结合者，编码相同结合者的序列可用于产生如上所述的重组抗体。在寡核苷酸上施行诱变的适当的方法为本领域技术人员所公知，包括化学诱变（如使用亚硫酸氢钠）、酶错参（enzymatic misincorporation）以及暴露于辐射下。应该领会，所述本发明涵盖与本文明确阐明的抗体基本相同（如本文定义）的抗体，不管通过诱变或任何其他方法产生。此外，本文明确阐明的抗体中发生保守性或非保守性氨基酸替换（如本文定义）生成的抗体，包括在所述本发明的实施方案之中。

可使用的另一种组合方法为，将如上所述抗体的 CDR 区，特别是 CDR3，在衍生自其他可变区基因的骨架区环境（context）中表达。例如，一种抗 PLA2 抗体的重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 可在其他重链可变基因的骨架区环境中表达。同样地，一种抗 PLA2 抗体的轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 可在其他轻链可变基因的骨架区环境中表达。另外，所述 CDR 区的种系序列可在其他重链或轻链可变区基因的环境中表达。可检测得到

的抗体的特异性和亲和力，并可产生新抗体分子。

应该注意的是，根据本发明实施方案的抗体可以在除杂交瘤细胞系以外的其他细胞系中表达。编码特定抗体的序列可用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。转化可以使用将多核苷酸导入宿主细胞的任何已知方法进行，包括例如，将多核苷酸包入病毒（或病毒载体）再用病毒（或载体）转导宿主细胞，或者使用本领域公知的转染方法，如以下文献中所示：美国专利 4,399,216、4,912,040、4,740,461 和 4,959,455。使用的转化方法取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞的方法已为本领域所公知，包括葡聚糖（dextran）介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺（polybrene）介导的转染、原生质体融合、电穿孔、在脂质体中封装多核苷酸、以及将 DNA 直接微注射至核中。

可作为表达宿主使用的哺乳动物细胞系已为本领域所公知，包括可由美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection, ATCC）获得的许多永生细胞系，包括但不限于中国仓鼠卵巢（Chinese hamster ovary, CHO）细胞、人宫颈癌传代细胞（HeLa cell）、幼仓鼠肾细胞（baby hamster kidney, BHK）、猴肾细胞（monkey kidney cells, COS）、人肝细胞癌细胞（human hepatocellular carcinoma cell, 如 Hep G2），以及很多其他细胞系。通过确定哪株细胞系表达水平高并且产生的抗体具有基本的 PLA2 结合性质，来选择特别优选的细胞系。

根据本发明实施方案的抗体能够结合 PLA2。此外，本发明的抗体还可用于检测患者样品中的 PLA2，从而可用作诊断剂，如下文所述。另外，基于已知的 PLA2 与炎症的关系，可以预期所述抗体会在治疗炎症中起到治疗效果。

### 抗体治疗的附加规范（criteria）

如本文所述，PLA2 抗体的功能对其至少一部分作用模式来说显得非常重要。所谓功能，意思是，举例说明，PLA2 抗体与 PLA2 作用时的活性。因此，就某方面来讲，有关产生抗体作为针对 PLA2 的治疗候选物就很期望抗体能够具有效应物功能，包括补体依赖的细胞毒性（CDC）和抗体依赖细胞的细胞毒性（ADCC）。有多种功能相同的同种型抗体，包括但不限于：鼠源 IgM，鼠源 IgG2a，鼠源 IgG2b，鼠源 IgG3，人源 IgM，人源 IgG1，人源 IgG3 和人源 IgG4。应该注意的是，产生的抗体无需在一

开始就具有某种同种型，而是抗体产生时可具有任何同种型，并于其后使用本领域公知的常规技术转换同种型。这些技术包括使用直接重组技术（**direct recombinant technique**，参见例如美国专利 4,816,397），细胞间融合技术（**cell-cell fusion technique**，参见例如美国专利 5,916,771 和 No. 6,207,418），以及其他技术。

在细胞间融合技术中，制备具有任一所需同种型重链的一株骨髓瘤或其他细胞系并制备具有轻链的另一株骨髓瘤或其他细胞系。然后使这些细胞融合，便可分离出表达完整抗体的细胞系。

举例来说，本文讨论的一种 PLA2 抗体为人源抗 PLA2 IgG2 抗体。如果此抗体具有所需的同 PLA2 分子的结合能力，它就可以容易地转换同种型，生成人源 IgM，人源 IgG1，人源 IgG3 或人源 IgG4 同种型，同时仍然具有相同的可变区（它限定了抗体的特异性和部分亲和力）。这些分子即可固定补体，参与 CDC。

因此，由于产生的候选抗体具有如上所讨论的所需“结构”属性，经过同种型转换，它们通常可具有至少某种目标“功能”属性。

### 表位绘制

#### 免疫印迹分析法

本文所述抗体与 PLA2 的结合可用多种方法测定。例如，PLA2 可进行 SDS-PAGE（十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳）和通过免疫印迹法分析。SDS-PAGE 可在还原剂存在或不存在的条件下进行。这样的化学修饰可以导致半胱氨酸残基的甲基化。因此，可以测定本文所述 PLA2 抗体是否与 PLA2 的线性表位结合。

#### 表面增强的激光解吸 / 电离

所述 PLA2 抗体表位的表位绘制还可以使用 SELDI（蛋白指纹图谱技术）进行。SELDI ProteinChip® 阵列用于确定蛋白-蛋白相互作用位点。抗原被特异性地捕捉到抗体上，所述抗体通过初始的温育和洗涤以共价形式固定于 Protein Chip 阵列表面。结合抗原可以通过激光诱导的解吸程序检测，并直接分析测定其质量。这样的结合抗原的片段被称为蛋白的“表位”。

SELDI 程序可直接检测复合分子组合物中单个组分，并定量绘制所述

单个组分相对于其他组分的量,且快速、灵敏度高、可调整规模(*scalable*)。SELDI 使用多种表面化学物质的阵列捕捉和呈现(*present*)绝大多数的单个蛋白分子,以通过激光诱导的解吸程序检测。SELDI 程序的成功部分归因于在表面("芯片")上多种功能的微型化和集成化,两者分别依赖于不同的技术。SELDI BioChip(生物芯片)和其他种类的 SELDI 探针为表面"增强的",从而可主动参与待评估的单个目标分子(如蛋白)或分子种群(*population*)的捕捉、纯化(分离)、呈现、检测和鉴定。

只装载有原始样品的单个 SELDI 蛋白 BioChip 可以读数几千次。来自 LumiCyte 的 SELDI 蛋白 BioChip 上每 1 平方厘米可容纳多达 10,000 个可寻址蛋白接合(*docking*)位置。每个位置可显示几十种蛋白的存在。当比较各位置的蛋白组成信息并将独特的信息集结合起来时,得到的组合图谱可显示特征集(*set*)图像,共同应用于确定特殊图案或分子"指纹"。不同的指纹可关联于健康状况的不同的阶段,疾病发作或与施用适当治疗方法相关的疾病衰退。

SELDI 程序可分为四部分更加详细地叙述。首先,一种或多种所研究的蛋白以直接来源于原始物质、而未经过样品制备及样品标记的形式捕捉或"接合"于 ProteinChip 阵列上。第二步,通过减小化学和生物分子"噪音"来提高"信噪"比。减小"噪音"是通过洗去不需要的物质而在芯片上选择性保留目标物来实现的。然后,捕捉的一种或多种目标蛋白通过快速、灵敏的激光诱导程序(SELDI)读数,提供目标物的直接信息(分子量)。最后,通过在芯片上进行一种或多种结合反应或修饰反应鉴定蛋白结构和功能,从而可以对阵列中任何一个或多个位置的目标蛋白进行原位鉴定。

### 噬菌体呈现

本文所述 PLA2 抗体的表位可通过将 ProteinChip 阵列暴露于呈现在丝状噬菌体(*Filamentous phage*)的 12 聚体随机肽组合文库(*New England Biolabs*)来确定。

噬菌体呈现是一种选择技术,其中,一段肽通过与噬菌体的外壳蛋白融合来表达,导致融合的蛋白在病毒粒子的表面呈现。淘选按照下列步骤进行:将噬菌体呈现肽文库在以目标物包被的板或管中温育,洗去未结合的噬菌体,洗脱特异性结合的噬菌体。然后将洗脱的噬菌体扩增,并经过另外的结合和扩增循环,以富集结合序列库。三或四个循环之后,通过在

抗体包被的孔中进行噬菌体 ELISA 法来进一步检测单个克隆结合的结合情况，并使用阳性克隆的特异性 DNA 测序来鉴定。

针对本文所述 PLA2 抗体的淘选进行多个循环之后，可将结合的噬菌体洗脱，并进行进一步研究以识别和鉴定结合的肽。

### PLA2 促效剂和拮抗剂

所述本发明的实施方案还涉及 PLA2 蛋白的变体，所述变体既可作为 PLA2 促效剂（模仿剂）也可作为 PLA2 拮抗剂。PLA2 蛋白变体可通过诱变产生，例如，单点突变（discrete point mutation）或截短 PLA2 蛋白。一种 PLA2 蛋白促效剂可以与自然存在的 PLA2 蛋白形式的生物活性基本一致，或保留其中一组活性。一种 PLA2 蛋白拮抗剂可以抑制自然存在的 PLA2 蛋白形式的一种或多种活性，例如通过与包括 PLA2 蛋白的细胞信号级联的下游或上游成员竞争性结合。因此，用限制功能的变体处理可得到特殊的生物学效果。在一个实施方案中，使用具有自然存在的蛋白形式的一组生物活性的变体处理受试者，相对于使用自然存在的 PLA2 蛋白形式处理，受试者的副作用更小。

可用作 PLA2 促效剂（模仿剂）或 PLA2 拮抗剂的 PLA2 蛋白变体，可通过筛选 PLA2 蛋白突变株，如截短型突变株组合文库寻找具有促效剂或拮抗剂活性的蛋白来识别。在一个实施方案中，PLA2 变体多样化文库通过在核酸水平上的组合突变产生，并由多样化基因文库编码。一个 PLA2 变体多样化文库可以通过，例如将合成的寡核苷酸混合物通过酶连接入基因序列的方法生成，这样一组简并的潜在 PLA2 序列可作为单个多肽表达，或者用另一种方法，作为包含所述 PLA2 序列组的更大的融合蛋白表达（如噬菌体呈现）。多种方法可用于从简并寡核苷酸序列生成潜在 PLA2 变体文库。可以在自动 DNA 合成仪上化学合成简并基因序列，然后将合成基因连接入适当的表达载体中。使用一组简并基因可在一组混合物中提供编码一组所需的潜在 PLA2 变体序列的所有序列。合成简并寡核苷酸的方法已为本领域所公知（见，例如，Narang, *Tetrahedron* 39:3 (1983); Itakura 等, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984); Itakura 等, *Science* 198:1056 (1984); Ike 等, *Nucl. Acid Res.* 11:477 (1983)）。

### 设计和生成其他疗法



而且，基于生成的和鉴定的与 PLA2 有关的抗体的活性，设计除抗体部分以外的其他方式也比较容易。所述方式包括但不限于，高级抗体疗法，如双特异性抗体、免疫毒素和放射性同位素标记疗法，生成多肽疗法和基因疗法，特别是内抗体（intrabody）、反义疗法和小分子。

随着以补体固定为所需属性的高级抗体疗法的产生，通过使用例如双特异性抗体、免疫毒素，或放射性同位素标记药物，或许可以回避细胞杀伤对补体的依赖。

例如，生成的双特异性抗体可以包括 (i) 连接在一起的两个抗体，一个对 PLA2 有特异性，另一个对第二种分子有特异性，(ii) 单个抗体，其中一条链对 PLA2 有特异性，另有第二条链对第二种分子有特异性，(iii) 单链抗体，同时对 PLA2 和另一种分子有特异性。这些双特异性抗体可以使用公知的技术制备；例如，有关 (i) 和 (ii)，参见例如 Fanger 等 *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) 以及 Wright 和 Harris, *supra.*，有关 (iii)，参见例如 Traunecker 等 *Int. J. Cancer* (增补本) 7:51-52 (1992)。各情况下，使第二特异性针对重链活化受体，包括但不限于，CD16 或 CD64 (参见例如 Deo 等 18:127 (1997)) 或 CD89 (参见例如 Valerius 等 *Blood* 90:4485-4492 (1997))。依据上述方法制备的双特异性抗体极有可能杀死表达 PLA2 的细胞，特别是本发明的 PLA2 抗体在其中起作用的细胞。

关于免疫毒素，可以使用本领域公知的技术修饰抗体，使之用作免疫毒素。参见例如 Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993)。另外参见美国专利 5,194,594。有关放射性同位素标记的抗体的制备，也可使用本领域公知的技术容易地制备出此种经过修饰的抗体。参见例如 Junghans 等 *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (第二版, Chafner 和 Longo 编辑, Lippincott Raven (1996))。另外参见美国专利 4,681,581、No. 4,735,210、No. 5,101,827、No. 5,102,990 (RE 35,500)、No. 5,648,471 和 No. 5,697,902。各免疫毒素和放射性同位素标记的分子都有可能杀死表达 PLA2 的细胞，特别是本发明的抗体在其中起作用的细胞。

在生成治疗肽方面，通过利用与 PLA2 及其抗体，例如本文所述抗体有关的结构信息（如以下有关小分子的讨论），或者通过筛选肽文库，可生成针对 PLA2 的治疗肽。肽治疗剂的设计和筛选在下列相关文献中讨论：Houghten 等，*Biotechniques* 13:412-421 (1992)，Houghten, *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985)，Pinalla 等，*Biotechniques* 13:901-905 (1992)，Blake

和 Litzi-Davis, *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992)。还可以类似方式制备与肽部分相关的免疫毒素和放射性标记的分子,如以上有关抗体的讨论。

假如 PLA2 分子(或某种形式,如剪接变体或替换形式)在疾病过程中是功能活性的,则还可以通过常规技术设计基因和反义治疗剂。这些形式(modality)可用于调节 PLA2 的功能。有关抗体,如本文所述,可帮助设计和使用与之相关的功能检测。反义治疗剂的设计和方案在国际专利申请 No. WO 94/29444 中详细讨论。基因疗法的设计和方案已为公知。然而,特别地,使用涉及内抗体(intrabody)的基因治疗技术经证明特别具有优越性。见,例如,Chen 等, *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994)和 Marasco, *Gene Therapy* 4:11-15 (1997)。基因治疗剂的总体设计和相关注意事项还在国际专利申请 No. WO 97/38137 中讨论。

还可以预想小分子治疗剂。如本文所述,可以设计药物调节 PLA2 的活性。从 PLA2 分子结构及其与其他分子,如本文所述的抗体的相互作用等方面收集的知识,如本文所述,可用于合理设计附加的治疗形式。在这点上,合理的药物设计技术,例如 X 射线晶体衍射、计算机辅助(或协助)分子建模(CAMM)、定量或定性结构活性关系(QSAR)及类似技术可用于集中药物发现研究。合理设计使得可以预测蛋白或合成结构,所述结构可与此分子或其用于修饰或调节 PLA2 活性的特殊形式相互作用。这些结构可以化学合成或用生物系统表达。此方法在 Capsey 等, *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)) 中已有研究。此外,还可以设计和合成组合文库,并用于筛选程序,例如高通量筛选研究。

### 治疗剂给药和制剂

包括但不限于抗体及其片段的抗 PLA2 化合物适合于掺入治疗有机体的药物中,所述有机体需要一种可调节 PLA2 的化合物。这些药理学活性的化合物可以按照制剂学的常规方法加工制成药剂给药于有机体,例如动物和包括人类在内的哺乳动物。在某些实施方案中,活性成分可经过或不经过修饰加入到药用产品中。更多的实施方案包括通过几种途径制备本文所述的传递药理学活性化合物的药物或治疗剂。例如但不限于,具有编码抗体或其片段的序列的 DNA、RNA 和病毒载体可用于某些实施方案中。另外,编码抗体或其片段的核酸可以单独给药或与其他活性成分共同施用。

应该知道, 本文所述的治疗实体可以与适当的载体、赋形剂、稳定剂及其他可以掺入制剂用以改善转移、递送、耐受等性能的试剂混合施用。药学上可接受的载体包括适合于胃肠外、肠内(如口服)或局部使用并且不与本发明的药理学活性成分发生有害反应的有机或无机载体物质。适当的药学上可接受的载体包括但不限于水, 盐溶液, 醇, 阿拉伯胶, 植物油, 苯甲醇, 聚乙二醇, 明胶, 碳水化合物例如乳糖、直链淀粉或淀粉, 硬脂酸镁, 滑石, 硅酸, 粘性石蜡, 芳香油, 脂肪酸甘油单酯和甘油二酯, 季戊四醇脂肪酸酯, 羟基甲基纤维素, 聚乙烯吡咯烷酮等等。更多的载体、赋形剂和稳定剂包括缓冲剂如 TRIS HCL、磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐和其他有机酸盐; 抗氧化剂如抗坏血酸; 小分子量(小于约 10 个残基)肽如聚精氨酸, 蛋白如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸; 单糖、二糖和其他碳水化合物包括纤维素及其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂如 EDTA; 糖醇如甘露醇或山梨醇; 平衡离子如钠和/或非离子表面活性剂如 TWEEN、PLURONICS 或聚乙二醇。更多适当的载体记载在 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15 版, Easton:Mack Publishing Company, 1405-1412 页和 1461-1487 页(1975)和 *The National Formulary XIV*, 14 版, Washington, American Pharmaceutical Association (1975)。

抗体给药途径可根据已知方法, 包括, 例如但不限于, 局部、透皮、胃肠外、胃肠内、经气管(transbronchial)和透过肺泡(transalveolar)。胃肠外给药途径包括但不限于, 电注射或直接注射或输注, 例如直接注入中心静脉导管、静脉内、脑内、肌内、腹膜内、皮内、动脉内、鞘内或损伤区(intralesional)途径。抗体优选通过输注、弹丸注射(bolus injection)或如下说明的持久释放系统连续给药。在一个优选的实施方案中, 给药途径可以为皮下注射。在另一实施方案中, 通过肾动脉给药抗体。胃肠内给药途径包括但不限于口服和直肠。经气管和透过肺泡给药途径包括但不限于吸入(不管通过口还是鼻内)。

当用来体内给药时, 抗体制剂优选为无菌。这可以通过在冻干和再生之前或之后, 使用过滤除菌膜过滤来容易地实现。抗体通常以冻干形式保存或保存于溶液中。另外, 治疗组合物可无热原, 并存在于具有适当 pH 值、等渗性和稳定性的胃肠外可接受的溶液中。治疗抗体组合物通常放入具有无菌存取孔的容器内, 例如静脉注射溶液袋或具有塞子的小瓶, 塞子

可被皮下注射针头穿过。

注射用无菌组合物可以按照常规制药惯例配制，如 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18 版, Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)) 中所述。药物制品可灭菌处理，如果必要可与助剂混合，例如润滑剂，防腐剂，稳定剂，润湿剂，乳化剂，影响渗透压的盐类，缓冲液，抗氧化剂，着色剂、调味剂和/或香料等等，所述助剂不与活性化合物发生有害反应。例如，可能需要将活性化合物溶解或悬浮于载体中，例如水或自然存在的植物油，如芝麻油、花生油或棉籽油，或者合成脂肪载体如油酸乙酯等等。

具有本发明的药理学活性化合物、适于胃肠外给药的合适组合物包括但不限于，药学上可接受的无菌等渗溶液。所述溶液包括但不限于，可注射入中心静脉导管、静脉内、肌内、腹膜内、皮内或皮下注射的盐溶液和磷酸盐缓冲盐溶液。

具有本发明的药理学活性化合物、适于胃肠内给药的合适组合物包括但不限于，药学上可接受的口服散剂、丸剂或液体，以及直肠给药的栓剂。

适宜的缓释制品的例子包括含有所述多肽的固体疏水聚合物的半透性基质，其中所述基质是成型品 (shaped article)、涂膜 (film) 或微胶囊形式的。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶 (如聚(甲基丙烯酸-2-羟乙基酯) 记载于 Langer 等, *J. Biomed Mater. Res.*, (1981) 15:167-277 和 Langer, *Chem. Tech.*, (1982) 12:98-105, 或聚乙烯醇、聚交酯 (美国专利 3,773,919, EP 58,481)、L-谷氨酸和  $\gamma$ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物 (Sidman 等, *Biopolymers*, (1983) 22:547-556)、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯 (Langer 等, *supra*)、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON Depot™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球) 以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸 (EP 133,988)。

聚合物例如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能够释放分子长达 100 天以上，而一些水凝胶释放蛋白质的周期较短。当封装的蛋白质长时间停留在体内时，它们可能会因为在 37°C 下暴露在水分中而变性或聚集，导致失去生物活性和可能改变免疫原性。根据所涉及的机制，可以设计合理的策略以保持蛋白质的稳定性。例如，如果发现聚集机制是通过二硫化物的互换 (disulfide interchange) 而形成分子间 S-S 键，那么可以通过修饰硫

基残基、从酸性溶液中冻干、控制含水量、使用适当的添加剂、以及开发特殊的聚合物基质组合物实现稳定。

缓释组合物还包括脂质体包裹的本发明的抗体。包含这种抗体的脂质体使用公知方法制备：美国专利 DE 3,218,121; Epstein 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985) 82:3688-3692; Hwang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980) 77:4030-4034; 欧洲专利 EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; 142,641; 日本专利申请 83-118008; 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 以及欧洲专利 EP 102,324。

治疗用的抗体的有效量取决于，例如，治疗目标、给药途径和患者的状况。抗体的剂量将由主治医师考虑已知影响药物作用的各种因素进行确定，所述因素包括疾病的严重程度和类型，患者的体重、性别、饮食、给药时间和途径，以及其它药物治疗和其它有关的临床因素。因此，治疗学家须滴定剂量并按需改进给药途径以获得最佳的治疗效果。通常，临床医师将给药抗体直至达到实现所需效果的剂量。治疗有效剂量可由体外或体内方法确定。所述治疗的进程易于通过常规方法或本发明所述的方法监控。

所述化合物的治疗功效和毒性可通过在细胞培养物或实验动物中用标准药理学方法确定，例如，ED50 (群体中 50% 治疗有效的剂量)。由治疗动物模型或替代模型所得的数据可用于用公式表示 (formulate) 包括人类在内的其它有机体的剂量使用范围。所述化合物的剂量优选落在包括 ED50 而无毒性的循环浓度 (circulating concentration) 范围内。该范围内剂量的变化取决于 eVectin (含 pleckstrin(C 激酶主要底物)同源区的蛋白家族 B)、杂合体、结合伙伴 (binding partner) 或其片段的类型、所采用的剂型、有机体的敏感度以及给药途径。

多种抗体或其片段的标准剂量浓度可在约 0.1 ~ 100 mg/kg。所需剂量浓度包括，例如 0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1.0 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、3.0 mg/kg、3.5 mg/kg、4.0 mg/kg、4.5 mg/kg、5.0 mg/kg、5.5 mg/kg、6.0 mg/kg、6.5 mg/kg、7.0 mg/kg、7.5 mg/kg、8.0 mg/kg、8.5 mg/kg、9.0 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、35 mg/kg、40 mg/kg、45 mg/kg、50 mg/kg、55 mg/kg、60 mg/kg、65 mg/kg、70 mg/kg、75 mg/kg、80 mg/kg、85 mg/kg、90 mg/kg、95 mg/kg 和 100 mg/kg 或更高。一个优选剂量为 1 ~ 10 mg/kg。

在一些实施方案中，抗体或其片段的剂量使组织或血液浓度或上述两者为约  $0.1\mu\text{M} \sim 500\text{mM}$ ，优选为约  $1 \sim 800\mu\text{M}$ ，并且更优选大于约  $10\mu\text{M} \sim 500\mu\text{M}$ 。优选剂量为，例如需使组织浓度或血液浓度或上述两者达到  $10\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $30\mu\text{M}$ 、 $35\mu\text{M}$ 、 $40\mu\text{M}$ 、 $45\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $55\mu\text{M}$ 、 $60\mu\text{M}$ 、 $65\mu\text{M}$ 、 $70\mu\text{M}$ 、 $75\mu\text{M}$ 、 $80\mu\text{M}$ 、 $85\mu\text{M}$ 、 $90\mu\text{M}$ 、 $95\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $110\mu\text{M}$ 、 $120\mu\text{M}$ 、 $130\mu\text{M}$ 、 $140\mu\text{M}$ 、 $145\mu\text{M}$ 、 $150\mu\text{M}$ 、 $160\mu\text{M}$ 、 $170\mu\text{M}$ 、 $180\mu\text{M}$ 、 $190\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $220\mu\text{M}$ 、 $240\mu\text{M}$ 、 $250\mu\text{M}$ 、 $260\mu\text{M}$ 、 $280\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ 、 $320\mu\text{M}$ 、 $340\mu\text{M}$ 、 $360\mu\text{M}$ 、 $380\mu\text{M}$ 、 $400\mu\text{M}$ 、 $420\mu\text{M}$ 、 $440\mu\text{M}$ 、 $460\mu\text{M}$ 、 $480\mu\text{M}$  和  $500\mu\text{M}$ 。在替代实施方案中，可采用使组织浓度大于  $800\mu\text{M}$  的剂量。还可持续输注抗体、杂合体、结合伙伴或其片段以在组织中维持稳定的浓度，该浓度由血液水平测量。

可调整剂量和给药以提供足够水平的活性部分或维持所需效果。本发明实施方案包括短效和长效药用组合物。因此，实施方案包括如下方案，其中药用组合物约每 1、2、3、4、5、6 天、或每周给药、或者每 2 周、每 3 周、每 4 周、每 5 周、每 6 周、每 7 周或每 8 周给药一次。根据具体制剂的半衰期和清除速度，本发明的药用组合物可给药每天约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 次或更多次。

其它治疗剂可在给药抗 PLA2 抗体之前、同时或之后给药。所述治疗剂可用于治疗疾病症状或可减少抗 PLA2 抗体的副作用。上述治疗剂还可用于提高抗 PLA2 抗体的活性。可使用任何类型的治疗剂，包括但不限于，例如，抗生素、利尿剂、麻醉剂、止痛剂、抗炎剂和胰岛素。通常用于治疗炎症并可与抗体结合使用的治疗剂的实例包括诸如可的松等甾类抗炎剂和非甾类抗炎药物，例如对乙酰氨基酚、阿司匹林、布洛芬和萘普生等。

### 诊断用途

本发明的实施方案还可用于检测，特别是体外诊断检测，例如，用于确定患者样品中 PLA2 的水平。所述检测可用于诊断与 PLA2 的过度表达相关的疾病。在某些实施方案中，疾病为炎症病症。患者样品可为，例如，体液，优选血液，更优选血清、关节液、组织溶胞产物和由疾病组织制备的提取物。本发明其它的实施方案可用于诊断炎症病症和相关疾病，并确定其阶段。监控 PLA2 的水平可用作患者对治疗应答的替代测量方法并可用作监控患者疾病严重程度的方法。与其它可溶性标志物相比，PLA2 的

水平升高表明有炎症存在。患者样品中所存在的 PLA2 抗原的浓度可使用专门测定存在的抗原量的方法测定。所述方法包括 ELISA 法, 其中, 例如, 本发明的抗体可方便地固定在不溶性基质上, 如聚合物基质上。或者, 可采用使用抗 PLA2 抗体的免疫组织化学染色法测定样品中 PLA2 的水平。使用可为疾病发展或治疗的各阶段提供统计显著结果的一群 (population) 样品, 可指出可看作是疾病各阶段特征的抗原浓度范围。

在一例实施方案中, 从受试者处采得血液样品并测定样品中 PLA2 抗原的浓度以评估所研究对象中疾病的阶段, 或鉴定受试者对疗程的应答。由此得到的浓度用于鉴定该值落入的浓度范围。上述鉴定的范围与多群诊断对象中鉴定的疾病发展阶段或治疗阶段相关联, 从而提供研究对象所处的阶段。

可在样品中直接测量基因扩增和/或表达, 例如, 根据本发明提供的序列, 使用适宜标记的探针通过常规的 DNA 印迹法 (Southern blotting) 和 RNA 印迹法 (Northern blotting) 以定量 mRNA 的转录 (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)), 或者通过点渍法 (DNA 分析) 或原位杂交。或者, 可采用识别特异性双链体的抗体, 所述双链体包括 DNA 双链体、RNA 双链体和 DNA-RNA 杂合双链体或 DNA 蛋白双链体。可依次标记抗体并进行检测, 其中双链体结合到表面上, 使得在表面上形成双链体后, 可探测到与双链体结合的抗体的存在。

例如, 包括抗体片段在内的抗体可用于定性或定量探测 PLA2 蛋白的表达。如上所述, 抗体优选具有可探测的, 例如荧光标记, 并且可通过光学显微镜、流式细胞计、荧光计或其它本领域已知的技术监控结合作用。如果扩增的基因编码细胞表面蛋白, 如生长因子, 上述技术将是特别适用的。所述结合检测根据本领域已知的进行。

对与 PLA2 蛋白结合的抗体进行原位探测可通过, 例如, 免疫荧光或免疫电子显微镜进行。就此目的而言, 从患者身上采集组织样品, 并加入标记抗体, 优选使抗体覆盖生物样品。该方法还可测定标志基因产物在所检查组织中的分布。本领域的普通技术人员将领会多种组织学方法可易于进行原位探测。

测定差异基因表达数量的最灵敏和最灵活的方法之一是 RT-PCR, 该方法可用于在不同样品群中比较正常组织和经过或未经过药物治疗的肿瘤组织中 mRNA 的水平, 以鉴定基因表达的模式, 区分密切相关的 mRNA 并

分析 RNA 的结构。

第一步是从靶样品中分离 mRNA。原材料通常是分别从疾病组织中和相应的正常组织中分离的全部 RNA。因此，mRNA 可取自，例如，疾病组织冷冻或存档的并由石蜡包埋和固定（例如，福尔马林固定）的样品，以与同类型的正常组织比较。mRNA 的提取方法已为本领域所公知，并且公开在分子生物学的标准教科书上，包括 Ausubel 等，*Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997)。从石蜡包埋的组织中提取 RNA 的方法公开在，例如 Rupp 和 Locker, *Lab Invest.*, 56:A67 (1987)，以及 De Andrés 等, *BioTechniques*, 18:42044 (1995)。具体而言，RNA 的分离可使用从，例如 Qiagen 等商业制造商购得的纯化试剂盒、缓冲装置和蛋白酶，按照制造商的说明书进行。例如，取自培养细胞的全部 RNA 可使用 Qiagen RNeasy 的微柱进行分离。取自组织样品的全部 RNA 可使用 RNA Stat-60 (Tel-Test) 进行分离。

由于 RNA 不能用作 PCR 的模板，因此使用 RT-PCR 分析差异基因表达的第一步是将 RNA 模板逆转录为 cDNA，然后在 PCR 反应中对其进行指数扩增。两种最常用的逆转录酶是禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶

(AMV-RT) 和鼠白血病病毒逆转录酶 (MMLV-RT)。逆转录步骤通常使用特异性引物、随机六聚体或寡脱氧胸苷酸引物引导，这取决于表达概况 (expression profiling) 的条件和目标。例如，提取的 RNA 可根据制造商的说明书使用 GeneAmp RNA PCR 试剂盒 (Perkin Elmer, CA, USA) 进行逆转录。然后可在随后的 PCR 反应中，将得到的 cDNA 用作模板。

虽然 PCR 步骤可使用多种热稳定的 DNA 依赖的 DNA 聚合酶，但通常采用 Taq DNA 聚合酶，所述聚合酶具有 5'-3' 核酸酶活性，但缺乏 3'-5' 内切核酸酶活性。因此，TaqMan PCR 通常使用 Taq 或 Tth 聚合酶的 5'-核酸酶活性，以水解与其靶扩增子相结合的杂合探针，但是也可使用具有相当的 5' 核酸酶活性的任何酶。两种寡核苷酸引物用于生成 PCR 反应特有的扩增子。第三寡核苷酸或探针设计成探测位于两 PCR 引物之间的核苷酸序列。探针不能由 Taq DNA 聚合酶延长，并用报道 (reporter) 荧光染料和淬灭剂荧光染料标记。当两种染料在探针上的位置非常接近时，任何报道染料的激光诱导发射光谱通过淬灭染料淬灭。在扩增反应过程中，Taq DNA 聚合酶以依赖于模板的方式切割探针。得到的探针片段在溶液中分离，并且释放的报道染料发出的信号不受第二荧光团淬灭效应的影响。对



于每个新合成的分子均释放一个报道染料分子，并且探测未淬灭报道染料可为数据的定量解释提供基础。

可使用市售装置进行 TaqMan RT-PCR，例如，ABI PRIZM 7700TM Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)或 Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)。在一个优选实施方案中，5'核酸酶方法是在实时定量 PCR 设备上进行的，如 ABI PRIZM 7700TM Sequence Detection System™。系统由热循环器、激光、电荷耦合设备(CCD)、照相机和计算机组成。系统在热循环器上的 96 孔板式中扩增样品。在扩增过程中，通过光纤对全部 96 个孔实时采集激光诱导的荧光信号，并在 CCD 上检测。系统包括运行仪器的软件和分析数据的软件。

5'-核酸酶的检测数据最初表示为 Ct 或阈值周期 (threshold cycle)。如上所述，每个周期内记录荧光值，该值代表在扩增反应中扩增至所述点的产品的量。当首次记录统计显著的荧光信号时，该点即为周期阈值(Ct)。当比较疾病组织细胞中和正常细胞中的 RNA 的表达时， $\Delta Ct$  的值用作核酸样品中特定靶序列的起始拷贝相对数量的定量度量。

为将误差和样品对样品变异产生的影响降到最低，通常使用内部 (internal) 标准进行 RT-PCR。理想的内部标准在不同组织之间以恒定水平表达，并且不受实验治疗的影响。标准化基因表达模式最常用的 RNA 为有持家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和 $\beta$ -肌动蛋白的 mRNA。

还可使用微阵技术识别或确认差异基因表达。在该方法中，将所研究的核苷酸序列种植或排列在微芯片底物上。然后用取自所研究细胞或组织的特异性 DNA 探针对排列的序列进行杂交。

在微阵技术的一个具体实施方案中，在密阵中，将 cDNA 克隆的经 PCR 扩增的插入片段加入底物。优选将至少 10,000 核苷酸序列加入底物。以每芯片 10,000 元件固化在芯片上的微排列基因，适用于苛刻条件下的杂交。可通过逆转录提取自所研究组织的 RNA 来引入荧光核苷酸，从而产生荧光标记的 cDNA 探针。应用于芯片的标记 cDNA 探针在阵列上与各 DNA 点选择性杂交。芯片经严格清洗以除去非特异性结合的探针后，用共焦激光显微镜扫描。定量各排列元件的杂交使得可以评估相应的 mRNA 丰度 (abundance)。通过双色荧光，由两 RNA 源产生并分别标记的 cDNA 探针成对杂交至阵列。从而同时测定对应于各指定基因的，取自两源的转

录物的相对丰度。对多数基因，微型化规模的杂交可对其表达模式提供方便快速的评估。所述方法已显示出探测微量转录物所需的敏感性，所述转录物在每个细胞的少数拷贝上表达，并且该方法显示以至少约 2 倍不同的表达水平再现探测(Schena 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(20)L106-49)。核酸杂交的方法论以及微阵列技术已为本领域所公知。

### 单克隆抗体的鉴定

单克隆抗体可在多种检测方法中用作高度特异性探针，以关联功能特性与特异性结构决定簇 (determinant)，使得 mAb 成为验证药物靶的重要工具。在蛋白质印迹法、流式细胞计和免疫组织化学中使用抗体试剂鉴定蛋白表达模式是一种标准惯例。mAb 良好的特异性使得能够区分密切相关的分子，并已由下列方法证明：细菌和病毒株的血清分型，(Bash, M.C. 等, “Genetic and immunologic characterization of a novel serotype 4, 15 strain of *Neisseria meningitidis*” *FEMS Immunol Med Microbiol* 29, 169-176 (2000); Jensen, T.H. 等, “Probing the structure of HIV-1 Rev by protein footprinting of multiple monoclonal antibody-binding sites” *FEBS Lett* 414, 50-54 (1997))，蛋白特异性翻译后变体的探测(Martegani, 等, “A. Structural variability of CD44v molecules and reliability of immunodetection of CD44 isoforms using mAbs specific for CD44 variant exon products” *Am J Pathol* 154, 291-300 (1999))，以及具有改变构象的蛋白的区分(Drbal 等, “A novel anti-CD18 mAb recognizes an activation-related epitope and induces a high-affinity conformation in leukocyte integrins” *Immunobiology* 203, 687-698 (2001))。表位结合的多样性可进一步表示为两种不同的 mAb，所述 mAb 针对介导完全不同的功能活性的相同靶，例如，一种 mAb 可以是拮抗剂，而另一种没有活性。Sattentau 等, “Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection” *Science* 234, 1120-1123 (1986); Pierres 等, “Clonal analysis of B- and T-cell responses to Ia antigens. I. Topology of epitope regions on I-Ak and I-Ek molecules analyzed with 35 monoclonal alloantibodies” *Immunogenetics* 14, 481-495 (1981)。重要的是，不仅作为试剂，而且作为人类疾病的治疗剂，mAb 的实用性不断增加。Spigel 等, “HER2 overexpressing metastatic breast cancer” *Curr Treat Options Oncol* 3, 163-174 (2002); Sandborn, 等,

**“Biologic therapy of inflammatory bowel disease” *Gastroenterology* 122, 1592-1608 (2002).**

现有产生 mAb 的方法很多。应用于啮齿动物，通常为实验室小鼠的标准株系的标准杂交瘤技术，产生数十组到数百组啮齿动物氨基酸序列的 mAb。虽然啮齿动物源的 mAb 可用作试剂，但通常生产的治疗剂对人类的效果较差，因为其可能有免疫原性。通过嵌合或人源化的抗体工程产生的抗体，虽然人源含量较高，并且在人类中引起免疫应答的可能性较低，但通常以牺牲效能或起效速度为代价。产生适用于人类治疗剂的一种更有利的途径是产生完全人源的抗原特异性 mAb。重要的是，所述完全人源的 mAb 可用作靶证实的试剂和治疗引导的候选物。产生完全人源抗体最普遍的两种技术是噬菌体呈现法和转基因小鼠法。使用多种呈现技术表达的幼稚 (naive) 人源抗体文库可为抗原特异性抗体片段的来源，尽管该片段通常需要随后进行体外工程以符合治疗性 mAb 所要求的活性标准。Watkins 等，“Introduction to antibody engineering and phage display” *Vox Sang* 78, 72-79 (2000)。通过对产生完全人源抗体的转基因小鼠进行基因工程，可使用杂交瘤技术直接回收适宜用作试剂和治疗剂的亲和力成熟的抗原特异性 mAb。Mendez 等，“Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice” *Nat Genet* 15, 146-156 (1997); LaRoche 等，“Platelet-derived growth factor D: tumorigenicity in mice and dysregulated expression in human cancer” *Cancer Res* 62, 2468-2473 (2002); Ishida 等，“Production of Human Monoclonal and Polyclonal Antibodies in TransChromo Animals” *Cloning Stem Cells* 4, 91-102 (2002); Davis 等，“Transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer” *Cancer Metastasis Rev* 18, 421-425 (1999)。

不管采取何种途径产生最初的抗体库，结合特异性的数量是有限的。不管是否将整组抗体用于高通过量的功能筛选，还是其容量限制是否限定了可在功能实验中接受筛选的抗体数量，鉴定并随后降低抗体库中结合特异性的丰度可能是有利的。并且，有效选择具有独特的结合特异性抗体的方法可用于根据结合竞争性将功能活性绘制成箱 (bin)。

常规的鉴定抗体结合特异性的途径是表位作图法。Baerga-Ortiz 等，“Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by

H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein” *Protein Sci* 11, 1300-1308 (2002); McCullough 等, “Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus-neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies” *Immunology* 58, 421-428 (1986)。虽然该技术可以高分辨率识别各抗体与其抗原结合的位点, 但有可能费时费力, 并且处理量低。就历史观点而言, 标记抗体和过量的未标记抗体之间与抗原基于 ELISA 的结合竞争已用于测定两种抗体是否竞争。McCullough 等, *supra* (1986)。虽然基于 ELISA 的竞争检测法缺乏表位作图法的精确性, 但易于进行并且可在一天或两天内完成。然而, 当有大量样品时, 所述方法就变得很麻烦, 并且需要大量纯化的抗体。

为此, 开发了一种高通过量的新方法, 即多重竞争抗体箱 (Multiplexed Competitive Antibody Binning, MCAB) 法, 该方法仅使用少量抗体和抗原。MCAB 法使得一组抗体根据其对抗原的结合竞争以高通过量装箱, 并且已成功用于常规的抗体筛选和鉴定。所述检测方法基于靶分子上抗体竞争结合模式的相似性, 并采用 Luminex® 光谱编码的玻珠和探测技术以进行高度多重性检测。MCAB 法灵敏度足够高, 可用于以高通过量的方式筛选和鉴定取自杂交瘤繁殖早期的抗体, 其中抗体少量存在于上清液中。该方法通过使用呈现技术也可适用于所产生的重组抗体片段。

该方法能够根据对抗原结合的交叉竞争将一大组复杂的单克隆抗体分类至不同的箱中。在一些实施方案中, MCAB 法适用于在识别抗原阳性抗体后即刻进行, 以提供信息用于促进 (advance) 抗体候选物进行进一步检验。或者, MCAB 法可用于在筛选功能活性后, 将抗体分类为结合组。

MCAB 技术采用来自 XenoMouse® G2 和 G4 小鼠的完全人源 mAb, 所述小鼠株系针对人源抗体基因座转基因并分别生成完全人源 IgG<sub>2</sub>κ 和 IgG<sub>4</sub>κ 抗体。Mendez 等, *supra* (1997)。用蛋白抗原使所述小鼠免疫并随后产生杂交瘤的方法通常可产生 100 多种抗原特异性、高亲和力的 mAb。本发明所述的 MCAB 法引入多重化策略, 即使用基于玻珠的技术以检测由 Luminex® (Fulton 等, *supra* (1997)) 开发的抗体 (Ab) 竞争和特异性捕捉以及探测剂。同时, 将各 mAb 与选自 100 种市售玻珠的独特光谱编码的玻珠相结合, 使得各 mAb 在单溶液相多重检测中与多达 99 种其它的 mAb 竞争。该方法能使用未经纯化的杂交瘤上清液并可较早引入抗体产生过程

中。

当单克隆抗体本身用作证实企图发现基因组或蛋白质组靶的工具时，MCAB法是特别有价值的。Quinn-Senger等，*supra* (2002)；Walke等，*supra* (2001)。在上述情况下，初次和二次结合筛选后可能没有特定的功能检测，能用于从数十种或数百种抗原特异性抗体中选择出候选物。因为给定抗体的生物功能取决于其在靶分子上结合的表位，(Blanpain等，“Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies” *Mol Biol Cell* 13, 723-737 (2002)；Corada等，“Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability” *Blood* 97, 1679-1684 (2001))，因此以下方法是有用的，即根据结合竞争性将抗体分组至不同的箱中，然后促进各箱的抗体亚类进行功能检测。非竞争箱的确定也使得待测抗体针对协同活性结合。Kawashima等，“The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors” *Hum Immunol* 59, 1-14 (1998)。

挑选出的抗体和方法的实施方案在以下实施例中说明：

### 实施例

本文所提供的以下实施例，包括进行的实验和获得的结果，仅出于说明目的，不得解释为对所述的本发明实施方式的限制。

#### 实施例 1

##### PLA2 抗原制备

重组 PLA2 蛋白使用 26kDa 的标记物谷胱甘肽 (Glutathionine) S 转移酶 (GST) 制备，通过使用含有谷胱甘肽的亲基质 (affinity matrix)，GST 与重组 PLA2 融合以帮助从大肠杆菌表达载体中纯化。纯化蛋白在本领域所公知的温和、非变性条件下洗脱。进一步实验检测纯化后是否仍保持酶活性，并总结如下。在标记物和重组 PLA2 之间插入一段内肽酶酶切位点序列，以除去标记物。

## 实施例 2

### 抗 PLA2 抗体

主要与 PLA2 结合的单克隆抗体由以下步骤制备：使用 GST-PLA2 融合蛋白免疫 XenoMouse®小鼠（Abgenix Inc, Fremont, CA）以激发免疫反应。两品系小鼠，hlgG2 品系（组 1）和 hlgG4 品系（组 2），在爪垫处使用约 0.6mg/ml 不含内毒素的 GST-PLA2 免疫，所述 GST-PLA2 从大肠杆菌表达载体纯化。两组小鼠（每组 10 只）在 30 天时间共给予 8 次加强免疫，并在第 15、22 和 30 天采血。见表 2。使用的佐剂为：第一次加强免疫使用 Titermax Gold 佐剂（Catalog # T-2684, lot # 12K1599, Sigma, 50/50 体积比）；第 2 到 7 次加强免疫使用磷酸铝凝胶佐剂（Alum）（Catalog # 1452-250, Batch 8919, Superfos Biosector, 5 $\mu$ l/小鼠）和 CpG（ODN 1826 的 D-PBS 溶液，2mg/ml, 10 $\mu$ g/小鼠）；最后一次加强免疫使用 D-PBS。针对 PLA2 蛋白片段的单克隆抗体使用杂交瘤技术的标准方法由 PLA2 蛋白片段免疫的 XenoMouse®动物制备。

表 2

组 1 和组 2 的 PLA2 免疫时间表

目标= PLA2；免疫方式=爪垫；抗原= PLA2			
天	实验操作	用量	佐剂
1	第 1 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	Titermax Gold
5	第 2 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	Alum + CpG
8	第 3 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	Alum + CpG
12	第 4 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	Alum + CpG
15	采血	N/A	N/A
16	第 5 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	Alum + CpG
19	第 6 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	Alum + CpG
22	采血	N/A	N/A
23	第 7 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	Alum + CpG
26	第 8 次加强免疫	10 $\mu$ g/小鼠	D-PBS
30	融合	N/A	N/A

## 实施例 3

### ELISA 法实例

为检测抗 PLA2 效价，PLA2 抗原首先经过生物素化，再包被于板上以备 ELISA 检测。简言之，15-500 $\mu$ g PLA2 抗原稀释于 1mL pH 值为 8.6

的 PBS 中。将 10 $\mu$ L 10mg/mL 的硫代 NHS-生物素（溶于 DMSO 的生物素原液）加至 1mL PLA2 抗原溶液中，室温搅拌下温育 1 小时。温育后，加入 100 $\mu$ L 饱和 Tris 溶液终止反应，离心，至少洗涤 4 次以将游离生物素与生物素化的 PLA2 抗原分离。生物素化 PLA2（1 $\mu$ g/mL）包被于 Sigma 链亲和素板上，室温放置 1 小时。对照链亲和素板不进行包被，以用作对照。

用蒸馏水洗板五次。平行的两组杂交瘤培养上清液使用以 1:100 初始稀释再以 1:2 稀释的 2% 牛乳/PBS 滴定。最后一孔留空作为对照。用蒸馏水洗涤链亲和素板五次。将与羊抗人 IgG Fc 特异性 HRP 缀合的抗体加入至终浓度为 1 $\mu$ g/mL，室温下放置 1 小时。用蒸馏水洗涤 5 次，然后加入 TMB 使链亲和素板显色 30 分钟，加入 1M 磷酸终止 ELISA 反应。由 450nm 的光密度测定杂交瘤培养上清液的特定效价。

#### 实施例 4

##### 针对 PLA2 的完全人源抗体的二次筛选

##### Luminex®检测

为进一步确认能够产生完全人源抗 PLA2 抗体，将 PLA2 抗原包被于 Luminex®微珠（MiraiBio, Inc., Alameda, CA）表面，以进行多分析物生物测定检验。

简言之，将缀合微珠混合物以 50 $\mu$ L/孔加至过滤板上，抽滤（aspirate）。抽滤后，将样品和对照以 50 $\mu$ L/孔加至过滤板，在平板振荡器（plate shaker）上暗处温育 20 分钟。温育后，使用 100mL/孔的洗涤缓冲液洗涤过滤板两次。最后，加入 80 $\mu$ L/孔的检测抗体混合物，平板振荡器上暗处温育 20 分钟。

包被的微珠由选自下列的标记抗体探测：人  $\gamma$ 、人  $\kappa$ 、人  $\lambda$ 、人 IgM、鼠  $\gamma$  和鼠  $\lambda$ 。轻柔的旋转搅拌（vortex）微珠原液，使用下述公式计算所需的微珠混合物的体积： $(n+6) \times 50\mu\text{L}$ （其中  $n$ =样品数目）。然后，微珠稀释于封闭缓冲液中至浓度为每孔 2500 珠或  $0.5 \times 10^5/\text{mL}$ 。过滤板中每孔加入 200 $\mu$ L 洗涤缓冲液以预先湿润，抽滤。

温育后，使用 Luminex®仪为板读数，该仪器利用显微流（microfluidics）使微珠单行排列，并用激光照射显示微珠的内部颜色和表面颜色。选择与微珠结合的完全人源抗体进行进一步分析。

## 实施例 5

### 抗 PLA2 抗体结构分析

为分析与 PLA2 结合的完全人源抗体结构，从相应的杂交瘤中克隆出编码形成抗体的重链和轻链片段的基因。基因克隆和测序按照以下步骤进行：

从来自免疫 XenoMouse®小鼠的约  $2 \times 10^5$  个杂交瘤细胞中，使用 Fast-Track 试剂盒 (Invitrogen) 分离聚(腺苷酸<sup>+</sup>) mRNA。产生随机引物 cDNA 后进行 PCR 实验。人 V<sub>H</sub> 或人 V<sub>K</sub> 家族特异性可变区引物 (Marks 等, 1991) 或通用人 V<sub>H</sub> 引物, MG-30 (CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG SEQ ID NO:32) 用于连接对人特异性的引物。

C<sub>γ</sub>2 恒定区 (MG-40d; 5' GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA 3' SEQ ID NO: 33);

C<sub>γ</sub>1 恒定区 (HG1; 5' CAC ACC GCG GTC ACA TGG C 3' SEQ ID NO: 34); 或

C<sub>γ</sub>3 恒定区 (HG3; 5' CTA CTC TAG GGC ACC TGT CC 3' SEQ ID NO: 35);

或人 C<sub>K</sub> 恒定区 (h<sub>K</sub>P2; 如 Green 等, 1994 先前所述)。杂交瘤中人源单克隆抗体来源的重链和 κ 链转录物序列, 可通过对 PCR 产物直接测序得到, 所述 PCR 产物使用上述引物由聚(腺苷酸<sup>+</sup>) RNA 产生。还使用 TA 克隆试剂盒 (Invitrogen) 将 PCR 产物克隆进入质粒 pCRII 中。另外, 两种链均使用 Prism 染料-终止子 (dye-terminator) 测序试剂盒和 ABI 377 测序仪进行测序。全部序列使用 MacVector 和 Geneworks 软件程序与 "V BASE 序列路径 (sequence directory)" (Tomlinson 等, MRC Centre for Protein Engineering, 剑桥, 英国) 比对分析。

抗体克隆和 CDR 区序列概括在下表 3-7 中。

表 3

抗 PLA2 单抗重链序列数据



抗体	VH	V 序列	# Ns	N	D1	D1 序列	# Ns	N
2.8	VH3-23 (40-333)	GCGA	2	AA	D3-16 (336-341)	GGGGGA	5	CTGGA
2.29	VH5-51 (46-339)	GCGA	1	T	D1-26 (341-351)	TGGGACCTACT (SEQ ID NO: 36)	3	CCT
1.12	VH1-2 (49-344)	GAGA	3	TAG	D5-5 (348-362)	GGATACAGCTATGGT (SEQ ID NO: 37)	3	CTT
1.15	VH6-1 (49-352)	CAAG	4	GAGA	D6-19 (357-372)	GTATAGCGGTGGCTGG (SEQ ID NO: 38)	5	AACTT
1.2	VH3-23 (61-356)	GAAA	8	GGGTGT GA	D5-12 (365-372)	CTACGATT	2	TT
2.14	VH4-31 (58-356)	GAGA	3	GGT	D6-6 (360-374)	TATAGTAGCTCGTCC (SEQ ID NO: 39)	1	G
2.2	VH3-30 (25-320)	GAGA	1	G	D6-13 (322-336)	ATAGCAGCAGCTGGT (SEQ ID NO: 40)	5	TCGTC
2.26	VH5-51 (61-355)	CGAG	7	CCCCC C	D6-19 (363-374)	GGGTATAGCAGT (SEQ ID NO: 41)	10	TCCTTTTAAA (SEQ ID NO: 42)
2.1	VH3-33 (61-352)	GTGC	N.A	- N.A -	- N.A -	- N.A -	8	AAAGGGGT
2.13	VH3-48 (61-356)	GAGA	4	GGGT	D1-7 (361-370)	CTGGA ACTAC (SEQ ID NO: 43)	7	GAAGGGG
1.4	VH1-2 (26-320)	GAGA	3	TAG	D5-5 (324-338)	GGATACAGCTATGGT (SEQ ID NO: 44)	3	CTT
1.11	VH3-23 (49-344)	GAAA	3	GGG	D2-21 (348-354)	GGTGACT	8	ACGATTTT
1.17	VH5-51 (49-344)	GAGA	5	GAGAC	D1-26 (350-354)	GTGGG	0	
1.1	VH5-51 (58-351)	GCGA	6	GGGCGA	D3-16 (358-363)	GGGGGA	0	
1.26	VH3-33 (49-337)	ACTG	6	GTATAG	D6-19 (344-356)	CAGTGGCTGGTAC (SEQ ID NO: 45)	4	CGGG
2.10	VH3-48 (61-356)	GAGA	4	GGGT	D1-7 (361-370)	CTGGA ACTAC (SEQ ID NO: 46)	7	GAAGGGG
2.28	VH4-39 (49-344)	TGCG	N.A	- N.A -	- N.A -	- N.A -	2	CC
2.27	VH3-33 (61-354)	GCGA	N.A	- N.A -	- N.A -	- N.A -	6	AGGGGT
2.21	VH3-33 (46-340)	CGAG	4	GGGG	D1-1 (345-353)	AACTGGAAC	7	CCCCGGG
1.9	VH3-15 (61-359)	TACC	3	CGG	D3-16 (363-382)	TATGATTACGTTTGGGGGA G (SEQ ID NO: 47)	5	CCATG
1.28	VH1-2 (49-344)	GAGA	3	TAG	D5-5 (348-362)	GGATACAGCTATGGT (SEQ ID NO: 48)	3	CTT
1.22	VH3-30 (46-340)	CGAG	4	GGGT	D4-23 (345-352)	CTACGGTG	0	
1.19	VH3-33 (46-339)	GCGA	N.A	- N.A -	- N.A -	- N.A -	10	AGGGACTGGA (SEQ ID NO: 49)
1.16	VH1-2 (49-344)	GAGA	3	TAG	D5-5 (348-362)	GGATACAGCTATGGT (SEQ ID NO: 50)	3	CTT
1.13	VH3-33 (46-339)	GCGA	6	CAGGGG	D2-2 (346-354)	ATAGCAGCT	7	CGTAGAA
1.10	VH1-8 (49-340)	GTGC	8	AAGAAG GG	D7-27 (349-356)	AACTGGGG	3	GTC
1.6	VH5-51 (46-341)	GAGA	3	TAC	D1-26 (345-350)	GGGAGC	2	CC
2.6	VH3-33 (46-339)	GCGA	5	AGGGG	D5-12 (345-352)	GCCACTAT	0	

表3(续)

抗PLA2单抗重链序列数据(续)

抗体	JH	J序列	恒定区	CDR1 氨基酸序列	CDR2 氨基酸序列	CDR3 氨基酸序列
2.8	JH4b (347-394)	ACTAC G	G4 (395-503)	GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 51)	FISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 52)	KGDWNYEDY (SEQ ID NO: 53)
2.29	JH4b (355-397)	TTTGAC	G4 (398-513)	GYSFTSYWIG (SEQ ID NO: 54)	IYPGSDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 55)	LGPTPFDY (SEQ ID NO: 56)
1.12	JH6b (366-427)	TTACTA	G2 (428-496)	GYTFTDYYIH (SEQ ID NO: 57)	WIHPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 58)	DRDTAMVFYYYYYAMDV (SEQ ID NO: 59)
1.15	JH6b (378-433)	CTACTA	G2 (434-477)	GDSVSSNSAAWN (SEQ ID NO: 60)	RTYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO: 61)	GEYSGGWNFYYYYGMDV (SEQ ID NO: 62)
1.2	JH2 (375-427)	CTACTG	G2 (428-541)	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 63)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 64)	EGVTTIFYWYFDL (SEQ ID NO: 65)
2.14	JH5b (376-421)	TGGTTC	G4 (422-454)	GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO: 66)	YIYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 67)	EVIVARPWFDL (SEQ ID NO: 68)
2.2	JH6b (342-388)	CGGTAT	G4 (389-499)	GFTFSIYGMH (SEQ ID NO: 69)	IISYGGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 70)	EIAAAGSSGMDV (SEQ ID NO: 71)
2.26	JH4b (385-424)	GACTA C	G4 (425-524)	GYSFTSYWIG (SEQ ID NO: 72)	IYPGSDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 73)	PPPGIAVPFKDY (SEQ ID NO: 74)
2.1	JH4b (361-403)	TTTGAC	G4 (404-419)	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 75)	IIWYDGSYRFYADSVKG (SEQ ID NO: 76)	RGFDY (SEQ ID NO: 77)
2.13	JH6b (378-439)	TTACTA	G4 (440-472)	GFTFSSYSMN (SEQ ID NO: 78)	YISSGSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 79)	EGLELRRGYYYYYGMMDV (SEQ ID NO: 80)
1.4	JH6b (342-403)	TTACTA	G2 (404-500)	GYTFTGYMH (SEQ ID NO: 81)	WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 82)	DRDTAMVFYYYYYALDV (SEQ ID NO: 83)
1.11	JH2 (363-415)	CTACTG	G2 (416-515)	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 84)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 85)	EGVTTIFYWYFDL (SEQ ID NO: 86)
1.17	JH4b (355-397)	TTTGAC	G2 (398-531)	GYSFTSYWIG (SEQ ID NO: 87)	IYPGSDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 88)	QRRGFDY (SEQ ID NO: 89)
1.1	JH4b (364-406)	TTTGAC	G2 (407-538)	GYSFTSYWIA (SEQ ID NO: 90)	IYPGSDSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	GRGGFDY (SEQ ID NO: 92)
1.26	JH3b (361-406)	GCTTTT	G2 (407-507)	GFTFSTYGMH (SEQ ID NO: 93)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 94)	AVAGTGAFDI (SEQ ID NO: 95)
2.10	JH6b (378-439)	TTACTA	G1 (440-455)	GFTFSSYSMN (SEQ ID NO: 96)	YISSGSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 97)	EGLELRRGYYYYYGMMDV (SEQ ID NO: 98)
2.28	JH4b (347-388)	TTGACT	G4 (389-515)	GGSISSGGYYWG (SEQ ID NO: 99)	SIYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 100)	LDY
2.27	JH4b (361-403)	TTTGAC	G4 (404-526)	GFTFSNYGIH (SEQ ID NO: 101)	VIWYDGSYKFYADSVKG (SEQ ID NO: 102)	RGFDS (SEQ ID NO: 103)
2.21	JH3b (361-406)	GCTTTT	G4 (407-517)	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 104)	AIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 105)	GGTGTGAFDI (SEQ ID NO: 106)
1.9	JH4b (388-430)	TTTGAC	G2 (431-521)	GFIFSNAWMS (SEQ ID NO: 107)	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 108)	GMITFGGAMFDF (SEQ ID NO: 109)
1.28	JH6b (366-427)	TTACTA	G2 (428-511)	GYTFNDYYMH (SEQ ID NO: 110)	WIHPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 111)	DRDTAMVFYYYYYAMDV (SEQ ID NO: 112)
1.22	JH4b (353-397)	ACTTTG	G2 (398-522)	GFTFRSYGMH (SEQ ID NO: 113)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 114)	GVYGDYFDY (SEQ ID NO: 115)
1.19	JH6b (350-400)	ACTAC G	G2 (401-525)	GFTFSNYGMH (SEQ ID NO: 116)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 117)	RDWNYGMDV (SEQ ID NO: 118)
1.16	JH6b (366-427)	TTACTA	G2 (428-484)	GYTFTDYYMH (SEQ ID NO: 119)	WISPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 120)	DRDTAMVFYYYYYAMDV (SEQ ID NO: 121)
1.13	JH6b (362-421)	ACTACT	G2 (422-513)	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 122)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 123)	QGIAARRNYYYYSGMDV (SEQ ID NO: 124)
1.10	JH4b (360-403)	CTTTGA	G2 (404-514)	GYTFTSYDIN (SEQ ID NO: 125)	WMDPNSGHTGYAQKFQG (SEQ ID NO: 126)	EGNWGSFDY (SEQ ID NO: 127)
1.6	JH4b (353-394)	TTGACT	G2 (395-520)	GYSFTNYWIG (SEQ ID NO: 128)	FIYPGSDSDTRYSPSFEG (SEQ ID NO: 129)	HTGALDY (SEQ ID NO: 130)
2.6	JH3b (353-400)	ATGCTT	G4 (401-517)	GITFSSYGMH (SEQ ID NO: 131)	VIWYDGSNKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 132)	RGPLYAFDI (SEQ ID NO: 133)

表 4  
抗 PLA2 单抗重链分类序列数据

SEQ ID NO	抗体	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
134			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
15	2.7	VH5-51	D3-16	JH3b	GVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTNYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
135			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
17	2.9	VH5-51	D6-6	JH3b	EVQLVQSGAGVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIN	WVRQMPGKGLEWMG
27	2.25	"	"	"	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFISYWIA	WVRQMPGKGLEWMG
30	2.4	"	"	"	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WLRQMPGKGLEWMG
136			种系		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
23	2.19	VH3-33	D1-1	JH3b	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
137			种系		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
21	2.15	VH3-33	D1-7	JH3b	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
138			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
9	1.18	VH5-51	D6-19	JH4b	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTNYWIN	WVRQMPGKGLEWMG
139			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
5	1.7	VH5-51	D2-2	JH6b	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFISYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
13	1.27	"	"	"	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
140			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
3	1.5	VH5-51	D2-8	JH6b	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFISYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
141			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
19	2.12	VH5-51	D1-7	JH3b	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYNFITYWIA	WVRQMPGKGLEWMG
142			种系		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
25	2.23	VH3-33	D3-3	JH4b	QVQLEESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
143			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
29	1.3	VH5-51		JH6b	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTIYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
144			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
11	1.21	VH5-51		JH3b	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIS	WVRQMPGKGLEWMG
145			种系		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
7	1.14	VH5-51	D1-26	JH4b	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSITSYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
31	2.16	"	"	"	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIN	WVRQMPGKGLEWMG

表 4 (续)

抗 PLA2 单抗重链分类序列数据 (续)

抗体	CDR2	FR3	CDR3	J
	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	GG##AFDI	WGQGTMTVTVSSA
2.7	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCAR	GGVGAFDI	WGQGTMTVTVSSA
	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	SSS#AFDI	WGQGTMTVTVSSA
2.9	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	STSSAFDI	WGQGTMTVTVSSA
2.25	IIPGDS DARYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	TTSDAFDI	WGQGTMTVTVSSA
2.4	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	STS#AFDI	WGQGTMTVTVSSA
	VIWYDGS NKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	##TG##AFDI	WGQGTMTVTVSSA
2.19	AIWYDGS NKWYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	GGTGTPGA FDI	WGQGTMTVTVSSA
	VIWYDGS NKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	##WNYAFDI	WGQGTMTVTVSSA
2.15	VIWYDGS NKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	RDWNYAFDI	WGQGTMTVTVSSA
	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	##L#FDY	WGQGTMTVTVSSA
1.18	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	HRLGFDY	WGQGTMTVTVSSA
	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	SW#YGM DV	WGQGTMTVTVSSA
1.7	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	SWTYAL DV	WGQGTMTVTVSSA
1.27	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	SWTYGM DV	WGQGTMTVTVSSA
	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	#WCYGM DV	WGQGTMTVTVSSA
1.5	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	HWSYGM DV	WGQGTMTVTVSSA
	IIPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC##	TGT#AFDI	WGQGTMTVTVSSA

2.12	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAL	TGTRAFEI	WGQGTMTVSSA
	VIWYDGSNKYYADSVKGG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	##TIFGVVIDY	WGQGLVTVSSA
2.23	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	DGPIFGVVMGY	WGQGLVTVSSA
	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	##YYGMDV	WGQGTTVTVSSA
1.3	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADQSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	HDSYGMDV	WGQGTTVTVSSA
	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	###AFDI	WGQGTMTVSSA
1.21	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	HREAFDI	WGQGTMTVSSA
	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	HSGSYFDY	WGQGLVTVSSA
1.14	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	HSGSSFYD	WGQGLVTVSSA
2.16	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	HVRSPFDY	WGQGLVTVSSA

表 5

## 抗 PLA2 单抗轻链序列数据

抗体	VL	V 序列	#Ns	N	JL	J 序列	恒定区
2.26	A27 (49-334)	GCTCAC	1	A	JK5 (336-373)	GATCAC	IGKC (374-485)
2.1	A30 (34-319)	ACCCTC	0		JK4 (320-355)	TCACCT	IGKC (356-491)
1.15	A30 (34-317)	TTACCC	2	GC	JK4 (320-355)	TCACCT	IGKC (356-491)
1.2	B3 (28-331)	CTCCTC	0		JK1 (332-367)	GGACGT	IGKC (368-503)
2.6	A27 (52-341)	ACCTCC	6	GTGCAG	JK2 (348-379)	TTTTGG	IGKC (380-515)
1.26	A27 (49-335)	CTCACC	0		JK5 (336-373)	GATCAC	IGKC (374-524)
1.11	B3 (46-349)	CTCCTC	0		JK1 (350-385)	GGACGT	IGKC (386-521)
1.17	A3 (49-349)	CTCCTC	0		JK4 (350-385)	TCACCT	IGKC (386-498)
1.20	L2 (49-335)	GCCTCC	6	GTGCAG	JK2 (342-373)	TTTTGG	IGKC (374-511)
1.23	L2 (49-333)	TGGCCT	0		JK5 (334-370)	ATCAC	IGKC (371-489)
2.22	A3 (49-347)	AACTCC	0		JK3 (348-385)	ATTAC	IGKC (386-521)
2.28	O18 (49-332)	TCTCCC	0		JK5 (333-370)	GATCAC	IGKC (371-408)
1.1	B3 (46-343)	ATAGTA	4	GTCC	JK1 (348-385)	GTGGAC	IGKC (386-521)
1.6	B3 (49-352)	TTCCTC	0		JK4 (353-388)	TCACCT	IGKC (389-524)
1.9	B3 (49-352)	CTCCTC	0		JK1 (353-388)	GGACGT	IGKC (389-526)
1.22	A30 (37-323)	CCCTCC	1	T	JK4 (325-358)	ACTTTC	IGKC (359-505)
1.19	A27 (52-341)	ACCTCC	6	GTGCAG	JK2 (348-379)	TTTTGG	IGKC (380-513)
1.16	A2 (37-337)	TTCCTC	0		JK4 (338-373)	TCACCT	IGKC (374-510)
1.10	B3 (52-355)	TTCCTC	0		JK1 (356-391)	GGACGT	IGKC (392-527)
1.28	A2 (49-349)	TTCCTC	0		JK4 (350-385)	TCACCT	IGKC (386-520)
2.18	A3 (34-330)	CAAAC	0		JK5 (331-367)	ATCAC	IGKC (368-503)

表 5 (续)

## 抗 PLA2 单抗轻链序列数据 (续)

抗体	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1 氨基酸序列	CDR2 氨基酸序列	CDR3 氨基酸序列
2.26	118-153	199-219	316-342	RASQSVSSRYLA (SEQ ID NO: 146)	GASSRAT (SEQ ID NO: 147)	QYYGSSQIT (SEQ ID NO: 148)
2.1	103-135	181-201	298-324	RASQGISNDLA (SEQ ID NO: 149)	AASSLQS (SEQ ID NO: 150)	LQHNSYPLT (SEQ ID NO: 151)
1.15	103-135	181-201	298-324	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 152)	AASSLQS (SEQ ID NO: 153)	LQHNIYPLT (SEQ ID NO: 154)
1.2	97-147	193-213	310-336	KSSQSVLYSSNNKNYLT (SEQ ID NO: 155)	WASTRES (SEQ ID NO: 156)	QYYSTPRT (SEQ ID NO: 157)
2.6	121-156	202-222	319-348	RASQSVSSRYLA (SEQ ID NO: 158)	GASSRAA (SEQ ID NO: 159)	QQCDYSPPCS (SEQ ID NO: 160)
1.26	118-153	199-219	316-342	RASQSVRKSRYLA (SEQ ID NO: 161)	GASSRAT (SEQ ID NO: 162)	QYYDYSPIT (SEQ ID NO: 163)
1.11	115-165	211-231	328-354	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 164)	WASTRES (SEQ ID NO: 165)	QYYSTPRT (SEQ ID NO: 166)
1.17	118-165	211-231	328-354	RSSQSLQSNQYKYLE (SEQ ID NO: 167)	LGSNRAS (SEQ ID NO: 168)	MQALQTPLT (SEQ ID NO: 169)

1.20	118-150	196-216	313-342	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 170)	GASTRAT (SEQ ID NO: 171)	QQYNNWPPCS (SEQ ID NO: 172)
1.23	118-150	196-216	313-339	RASQSVSRILA (SEQ ID NO: 173)	GASTRAT (SEQ ID NO: 174)	QQYHNWPIT (SEQ ID NO: 175)
2.22	118-165	211-231	328-354	RSSQSLHSDGKTYLY (SEQ ID NO: 176)	LGSNRAS (SEQ ID NO: 177)	MQALQTPFT (SEQ ID NO: 178)
2.28	118-150	196-216	313-339	QASQDISNYLN (SEQ ID NO: 179)	DASNLET (SEQ ID NO: 180)	QQYDNLPT (SEQ ID NO: 181)
1.1	115-165	211-231	328-354	KSSQSVLYSSNNKYFLA (SEQ ID NO: 182)	WASTRES (SEQ ID NO: 183)	QQYYSSPWT (SEQ ID NO: 184)
1.6	118-168	214-234	331-357	KSSQSVLYRSNNKNFLA (SEQ ID NO: 185)	WASTRES (SEQ ID NO: 186)	QQHYSIPLT (SEQ ID NO: 187)
1.9	118-168	214-234	331-357	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 188)	WASTRDS (SEQ ID NO: 189)	QQYYSTPRT (SEQ ID NO: 190)
1.22	106-138	184-204	301-327	RASQGIRNDLA (SEQ ID NO: 191)	AASSLQS (SEQ ID NO: 192)	LQHNSYPPT (SEQ ID NO: 193)
1.19	121-156	202-222	319-348	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 194)	GASSRAT (SEQ ID NO: 195)	QHYGSLPPCS (SEQ ID NO: 196)
1.16	106-153	199-219	316-342	KSSQSLLYSDGKTYLY (SEQ ID NO: 197)	EVSNRFS (SEQ ID NO: 198)	MQSIQLPLT (SEQ ID NO: 199)
1.10	121-171	217-237	334-360	KSSQSVLFRSNNRNYLA (SEQ ID NO: 200)	WASTRES (SEQ ID NO: 201)	QQYYSIPT (SEQ ID NO: 202)
1.28	118-165	211-231	328-354	KSSQSLHSDGKTYLY (SEQ ID NO: 203)	EVSNRFS (SEQ ID NO: 204)	MQSIQLPLT (SEQ ID NO: 205)
2.18	103-150	196-216	313-336	RSSQSLHSDGKTYLY (SEQ ID NO: 206)	LGSNRAS (SEQ ID NO: 207)	MQALQTIT (SEQ ID NO: 208)

表 6  
抗 PLA2 单抗轻链分类序列数据

SEQ ID NO.	抗体	V	J	FR1	CDR1	FR2
209			种系	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
26	2.23	O12	JK5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RTSQSISNYLN	WFQOKPGKAPILLIY
22	2.15	"	"	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISNYLN	WYQQKPGKAPKFLIY
210			种系	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
6	1.7	A27	JK4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RPSQSVRSNYLT	WYQQKPGQAPRLLIY
14	1.27	"	"	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVRSNYLT	WYQQKPGQAPRLLIY
4	1.5	"	"	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVRSGYLA	WYQQRPGQAPRFLIY
211			种系	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGIKNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY
10	1.18	A30	JK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGIKNDLD	WCQQKPGKAPKRLIY
212			种系	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISC	RSSQSLHNSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY
12	1.21	A3	JK1	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISC	RSSQSLHNSNGYNFLD	WYLQKPGQSPQLLIY
213			种系	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
16	2.7	A27	JK3	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQIIRSSLA	WYQEKPGQAPRLLIY
214			种系	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
28	2.25	O12	JK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
18	2.9	"	"	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
215			种系	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISC	RSSQSLHNSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY
24	2.19	A3	JK5	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISC	RSSQSLHNSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY
8	1.14	"	"	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISC	RSSQSLHNSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY
216			种系	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQQKPGK###PKL
20	2.12	O12	JK3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSIGSYLN	WYQQKPGKPGKGPKL

表 6 (续)  
抗 PLA2 单抗轻链分类序列数据 (续)

抗体	CDR2	FR3	CDR3	J
	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QSYSTPIT	FGQGTREIKR
2.23	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	HQSYSIPIIT	FGQGTREIKR
2.15	AASSLQS	GAPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QSYSTPIT	FGQGTREIKR
	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QYGSSTPLT	FGGGTKVEIKR
1.7	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTVSRLEPEDFAVYYC	QYGSSTPLT	FGGGTKVEIKR
1.27	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QYGSSTPLT	FGGGTKVEIKR
1.5	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QYGSSTPLT	FGGGTKVEIKR
	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPPT	FGQGTREIKR
1.18	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNNYPPT	FGQGTREIKR
	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC	MQALQTPPT	FGQGTREIKR
1.21	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC	MQALQTPPT	FGPGTKVEIKR
	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QYGSSTPPT	FGPGTKVDIKR
2.7	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QYGSSTPPT	FGPGTKVDIKR
	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QSYSTPPT	FGQGTREIKR
2.25	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QSYNTPT	FGQGTREIKR
2.9	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QSYSTPPT	FGQGTREIKR
	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC	MQALQTIT	FGQGTREIKR
2.19	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRMEAEDVGYYC	MQALQTIT	FGQGTREIKR
1.14	LGSYRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDAGVYFC	MQGLKTIT	FGQGTREIKR
	LIYAASS	LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT	YQCQSYSTPPT	FGPGTKVDIKR
2.12	LIYAAS	LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLQPEDFAT	YQCQSFNTPT	FGPGTKVDIKR

表7

抗 PLA2 单抗序列汇总

抗体	抑制哺乳动物	抑制细菌	同种型	IC <sub>50</sub> (nM)	箱	VH	DH	JH	VK	JK
1.18	1	0	hIgG2	0.78	1	VH5-51	D6-19	JH4b	A30	JK1
2.4	1	1	hIgG4	0.91	1	VH5-51	D6-6	JH3b		
2.25	1	1	hIgG4	1.36	1	VH5-51	D6-6	JH3b	O12	JK1
2.9	1	0	hIgG4	1.44	1	VH5-51	D6-6	JH3b	O12	JK1
1.5	1	1	hIgG2	2.36	1	VH5-51	D2-8	JH6b		
1.21	1	0	hIgG2	3.64	1	VH5-51		JH3b	A3	JK1
1.14	1	1	hIgG2	3.9	1	VH5-51	D1-26	JH4b	A3	JK5
2.16	1	0	hIgG4	4.17	1	VH5-51	D1-26	JH4b		
1.7	1	0	hIgG2	4.73	1	VH5-51	D2-2	JH6b	A27	JK4
2.12	1	1	hIgG4	4.82	1	VH5-51	D1-7	JH3b	O12	JK3
1.3	1	1	hIgG2	6.07	1	VH5-51		JH6b		
1.8	1	1	hIgG2	6.56	1					
1.27	1	0	hIgG2	9.4	1	VH5-51	D2-2	JH6b	A27	JK4
2.15	1	0	hIgG4	14.33	2	VH3-33	D1-7	JH3b	O12	JK5
2.23	1	0	hIgG4	14.4	2	VH3-33	D3-3	JH4b	O12	JK5
2.19	0	1	hIgG4		2	VH3-33	D1-1	JH3b	A3	JK5
2.7	0	1	hIgG4		1	VH5-51	D3-16	JH3b	A27	JK3
2.24	0	1	hIgG4							

## 实施例 6

### 筛选 PLA2 酶的功能性抑制剂

为识别阻断 PLA2 功能活性的抗体,将在 96 孔板中检测酶活性的基本方案修改后用于在 384 孔板中筛选。对先前在 ELISA 方法中发现的可阻断酶结合的五十八 (58) 种备选抗体作筛选。识别出几种阻断 PLA2 功能活性的抗体。

### 基本的酶检测方法

简言之,下列三种组分混合于黑色 384 孔板中:(1) 20 $\mu$ l 去离子水或 KLH 上清或实验培养基;(2) 20 $\mu$ l 酶稀释于去离子水;(3) 20 $\mu$ l Bis-BODIPY®-FLC<sub>11</sub>-PC 底物稀释于 3 倍的分析缓冲液。将板盖好,室温下温育特定时间。温育后,可选择性地加入 20 $\mu$ l 40mM EDTA 终止反应,将板置于  $\alpha$ -Fusion (Packard)上使用 FITC 滤镜、top read 模式读数(激发光波长 = 485nm; 发射光波长 = 530nm)。

### 检测方法的改进

进行初始实验确定底物的检测极限和 KLH 废弃上清液的影响。市售的猪 PLA2 用作测试底物的阳性对照品,图 1A 显示了与 0.5 单位酶温育的滴定量的底物的剂量-反应曲线。为检测 KLH 上清液的影响,每孔中温育 0.5 单位酶,130nM 底物和 20 $\mu$ l (或没有) KLH 上清液。在多个时间点读数,温育 30 分钟时的数据显示于图 1B 中。KLH 上清液对检测的影响最小。

**细菌表达的 PLA2。**细菌表达的酶的活性在使用 Fxa 裂解后比裂解前高约四 (4) 倍 (数据未显示)。使用 Fxa 将 GST 标记从细菌表达的 GST-酶融合蛋白上切割下来。简言之,将 GST-酶融合蛋白与 1 单位 Fxa 在 1 倍的 Fxa 缓冲液中室温下温育过夜。

滴定量的 Fxa 裂解的细菌表达的酶与 400nM Bis-BODIPY®底物温育。在多个时间点读数,温育 10 分钟时的数据显示于图 2A 中。为检测 KLH 上清液的影响,每孔中温育 0.4 $\mu$ g Fxa 裂解的酶,400nM 底物和 20 $\mu$ l (或没有) KLH 上清液。来自 G2 和 G4 的 20 $\mu$ l/孔的 KLH 废弃上清液可轻微抑制酶活性 (图 2B)。图示为温育 10 分钟时的数据。

### 竞争实验

本实验方法检测抑制剂的能力用竞争实验测试。简言之,加入 20 $\mu$ l/孔测试杂交瘤上清液,再将 20 $\mu$ l 酶稀释于去离子水中。将板盖好,4 $^{\circ}$ C 温育过夜。温育后,加入 20 $\mu$ l Bis-BODIPY® FLC<sub>11</sub> PC 底物。将板盖好,室温下温育 60 分钟。温育后,加入 20 $\mu$ l 40mM EDTA 终止反应,将板在  $\alpha$ -Fusion 上使用 FITC 滤镜读数。

将免疫小鼠的小鼠血清平行测定两次。每孔中将血清 (20 $\mu$ l 或没有) 与 0.2 $\mu$ g Fxa 裂解的细菌表达的酶和 0.4 $\mu$ M 底物共同温育。温育后 30 分钟将板读数。发现 G2 和 G4 血清都可抑制酶活性。在其他时间点读数得到类似结果。

### 筛选确认

在单个 384 孔板上检测 58 种杂交瘤上清液与哺乳动物 PLA2 酶,及其与 Fxa 裂解的细菌 PLA2 酶。哺乳动物酶进行重复检测而细菌酶只单点检



测。还包括每种酶的对照孔。

哺乳动物和细菌表达的两类酶都在对照孔中得到较好的检测窗 (assay window)。对于 Fxa 裂解的细菌细胞, 将 150ng 酶与 400nM 底物共同温育。对于哺乳动物酶, 将 0.5 $\mu$ l CHO 上清液与 400nM 底物共同温育。

测试杂交瘤上清液抑制酶活性的情况。杂交瘤上清液 (20 $\mu$ l/孔) 与 0.5 $\mu$ l CHO 上清液或 150ng Fxa 裂解的细菌酶温育过夜。加入底物至终浓度为 400nM, 将板温育, 在 30 分钟和 60 分钟读数。60 分钟后加入 EDTA 再次读数。给出加入 EDTA 后 60 分钟时的数据。表 8 概括了可抑制哺乳动物和细菌表达的酶的试样 (hits)。阻断酶活性的试样可抑制 20~74% 酶活性。识别了几种可阻断哺乳动物和细菌 PLA2 功能活性的抗体。

表 8

抑制酶活性的试样

克隆	哺乳动物	细菌
1.3	抑制	抑制
1.5	抑制	抑制
1.7	抑制	-
1.8	抑制	抑制
1.14	抑制	抑制
1.18	抑制	-
1.21	抑制	-
1.27	抑制	-
2.4	抑制	抑制
2.7	-	抑制
2.9	抑制	-
2.12	抑制	抑制
2.15	抑制	-
2.16	抑制	-
2.19	-	抑制
2.23	抑制	-
2.24	-	抑制
2.25	抑制	抑制

### 实施例 7

#### 通过荧光检测法测量 PLA2 活性

对荧光检测法进行优化以测量依赖于  $\text{Ca}^{+2}$  的分泌性 PLA2。Bis-BODIPY® FL C<sub>11</sub>-PC (Molecular Probes, Euguen, OR) 用作底物。由于 BODIPY® FL 的荧光团接近于邻近的磷脂酰基链, 导致荧光的自猝灭,

BODIPY® FL 标记的脂肪酸的磷脂酶 A1 或 A2 介导 (mediate) 释放, 可缓解这一情况。通过在荧光计上使用荧光素滤镜 (激发光波长 485nm, 发射光波长 535nm) 测量荧光增强的量, 从而测定 PLA2 活性。

简言之, 在 96 孔板中加入 75 $\mu$ l/孔的溶于 1.33 倍分析缓冲液的 0.532 $\mu$ M 底物。加入 5 $\mu$ l/孔的溶于 20% DMSO 的检测化合物, 随后加入 20 $\mu$ l 的溶于 Tris-Cl 缓冲液 (pH7.6) 的 5 倍 PLA2 酶。室温下温育 5 分钟, 加入 10 $\mu$ l EDTA 至终浓度为 10mM 用以终止反应混合物。在微量板荧光计上使用荧光素滤镜 (激发光波长 485nm, 发射光波长 535nm) 测量荧光。在加入 EDTA 终止反应后的 15 到 30 分钟内进行测量。

### 实施例 8

#### 抗 PLA2 单抗功能检测

先前识别的与 PLA2 结合并阻断 PLA2 酶活性的纯化抗体, 使用前述的 PLA2 功能检测方法以作进一步鉴定。发现四种抗体 (单抗 1.18, 2.4, 2.25 和 2.9) 抑制 PLA2 功能, 其 IC<sub>50</sub> 值 < 2nM。所有所述抗体均能阻断在哺乳动物和细菌细胞中表达的酶。

然后将发现可阻断 PLA2 酶的抗体在哺乳动物 CHO 细胞 (CHO-PLA2-MTX) 中表达。

基于 IC<sub>50</sub> 值的亲和力排序。进行两项单独的实验, 6 点剂量曲线和 12 点剂量曲线, 为抗体的亲和力排序。来自两条剂量曲线的数据相一致。来自 12 点剂量曲线的数据显示于下表 9 中。

表 9

基于 IC<sub>50</sub> 值的排序

同种型内排序			所有同种型排序		
抗体	同种型	IC <sub>50</sub> (nM)	抗体	同种型	IC <sub>50</sub> (nM)
1.18	hIgG2	0.78	1.18	hIgG2	0.78
1.5	hIgG2	2.36	2.4	hIgG4	0.91
1.21	hIgG2	3.64	2.25	hIgG4	1.36
1.14	hIgG2	3.90	2.9	hIgG4	1.44
1.7	hIgG2	4.73	1.5	hIgG2	2.36
1.3	hIgG2	6.07	1.21	hIgG2	3.64
1.8	hIgG2	6.56	1.14	hIgG2	3.90
1.27	hIgG2	9.40	2.16	hIgG4	4.17
2.4	hIgG4	0.91	1.7	hIgG2	4.73
2.25	hIgG4	1.36	2.12	hIgG4	4.82

2.9	hIgG4	1.44	1.3	hIgG2	6.07
2.16	hIgG4	4.17	1.8	hIgG2	6.56
2.12	hIgG4	4.82	1.27	hIgG2	9.40
2.15	hIgG4	14.33	2.15	hIgG4	14.33
2.23	hIgG4	14.40	2.23	hIgG4	14.40

针对哺乳动物酶和细菌酶对每种抗体测定六点剂量反应曲线。图 3 显示每种抗体最高实验剂量时的抑制百分率。图示的是四次重复的结果。均数的标准差 (SEM) 如图所示。

### 实施例 9

#### 抗 PLA2 单抗的 Biacore® 结合

为识别何种抗体结合抗原 PLA2 的亲合力最高, 使用配有研究级 CM5 传感器芯片的 Biacore® 2000 生物传感器 (Biacore, Piscataway, NJ) 在 25 °C 下进行分析。在固定中, HBS-P 用作工作缓冲液 (running buffer); 在结合研究中, HBS-P 与各 12mg/mL 的 BSA 和葡聚糖用作样品和工作缓冲液。

简言之, 将抗体上清液稀释 1/10, 抗体在 IgG 表面被单个捕获。一分钟洗涤步骤之后, 在各表面依次注入 (一分钟缔合, 五分钟解离) 缓冲液和 PLA2 (300nM)。从 -20 到 0 秒测量捕获水平, 用 100mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的 6 秒脉冲冲洗使表面再生。

从初始筛选, 上清液可以分为三类: (1) 高抗体效价, 高抗原识别 (>50 RU 抗体被捕获, >10 RU 抗原反应); (2) 高抗体效价, 低抗原识别 (>50 RU 抗体被捕获, <10 RU 抗原反应); (3) 低抗体效价, 低或可变抗原识别 (<50 RU 抗体被捕获, <10 RU 抗原反应)。各抗体所获得的捕获水平和结合反应显示于下表 10 中。

表 10

抗体捕获水平和 PLA2 结合反应

上清液	捕获水平(RU)	反应(RU)
1.1	963	181
1.2	968	64
1.3	639	53
1.4	948	36
1.5	484	70
1.6	761	141
1.7	918	118

1.8	1020	134
1.9	752	75
1.10	1020	237
1.11	124	12
1.12	466	24
1.13	788	64
1.14	573	74
<b>1.15</b>	<b>607</b>	<b>2</b>
1.16	729	38
1.17	534	72
<b>1.18</b>	<b>90</b>	<b>6</b>
1.19	625	42
<b>1.20</b>	<b>248</b>	<b>3</b>
1.21	415	61
1.22	342	47
<b>1.23</b>	<b>977</b>	<b>2</b>
1.24	446	20
<i>1.25</i>	<i>3</i>	<i>1</i>
1.26	809	41
1.27	700	78
<b>1.28</b>	<b>146</b>	<b>7</b>
2.1	458	25
<b>2.2</b>	<b>418</b>	<b>0</b>
<b>2.3</b>	<b>432</b>	<b>7</b>
2.4	334	40
2.5	195	28
2.6	547	13
2.7	612	126
<b>2.8</b>	<b>108</b>	<b>0</b>
2.9	304	20
2.10	506	74
<i>2.11</i>	<i>14</i>	<i>0</i>
2.12	720	98
2.13	331	47
<b>2.14</b>	<b>201</b>	<b>0</b>
2.15	997	37
2.16	212	26
<b>2.17</b>	<b>366</b>	<b>0</b>
2.18	622	43
2.19	708	52
2.20	311	72
2.21	815	40
<b>2.22</b>	<b>61</b>	<b>6</b>
<b>2.23</b>	<b>392</b>	<b>7</b>
<b>2.24</b>	<b>141</b>	<b>1</b>
2.25	226	18
2.26	423	51
2.27	364	22
2.28	522	21
<b>2.29</b>	<b>89</b>	<b>0</b>

对于第 II 类（粗体显示）和第 III 类（斜体显示）抗体上清液使用第

II 类的 1/10 稀释液和第 III 类的 1/2 稀释液再次筛选。延长捕获时间，注入 750nM PLA2 以检测结合。在此条件下所获得的捕获水平和结合反应显示于表 11 中。只有显示 PLA2 结合反应 >10 RU 的上清液才考虑备选进行高分辨率分析。

表 11

由 1/2 (第 III 类) 和 1/10 (第 II 类) 稀释液获得的

抗体捕获水平和 750nM PLA2 结合反应

上清液	捕获水平(RU)	反应 (RU)
1.15	1460	0
1.18	165	14
1.20	630	0
1.23	1550	0
1.25	281	0
1.28	452	16
2.2	941	2
2.3	1050	18
2.8	449	9
2.11	150	0
2.14	567	4
2.17	851	21
2.22	123	16
2.23	939	35
2.24	379	0
2.29	278	5

基于单个抗体的捕获水平对数据进行标准化，并全部拟合于 1:1 交互作用模型。发现抗体 1.1, 1.10, 1.16, 2.18, 2.19 和 2.20 是高亲和力抗体。测定的动力学常数概括于表 12 中。

亲和力由解离速率和缔合速率的比值计算。带有下列划线的解离速率没有在数据拟合过程中变动。中等分辨率筛选的上清液在下表 12 中以粗体显示。

表 12

抗体上清液中按亲和力排序的抗体

上清液	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD(nM)	Rmax (RU)
<b>2.18</b>	<b>1.68E+04</b>	<u>1.00E-05</u>	<b>0.60</b>	<b>0.27</b>
<b>1.10</b>	<b>8.45E+04</b>	<u>5.69E-05</u>	<b>0.67</b>	<b>0.30</b>
<b>1.16</b>	<b>1.84E+04</b>	<u>1.65E-05</u>	<b>0.90</b>	<b>0.25</b>
1.15	4.51E+03	<u>1.00E-05</u>	2.2	0.25

<b>1.1</b>	<b>7.98E+04</b>	<b>2.53E-04</b>	<b>3.2</b>	<b>0.25</b>
<b>2.19</b>	<b>1.86E+04</b>	<b>1.15E-04</b>	<b>6.2</b>	<b>0.26</b>
<b>2.20</b>	<b>1.24E+05</b>	<b>9.96E-04</b>	<b>8.0</b>	<b>0.27</b>
1.6	7.65E+04	6.92E-04	9.0	0.25
1.7	4.74E+04	4.51E-04	9.5	0.23
2.26	6.14E+04	5.99E-04	9.8	0.20
2.4	3.90E+04	4.03E-04	10	0.25
2.7	9.96E+04	1.04E-03	10	0.24
1.21	5.71E+04	6.30E-04	11	0.24
2.12	4.50E+04	6.56E-04	15	0.25
1.5	4.87E+04	7.13E-04	15	0.25
2.10	4.89E+04	7.85E-04	16	0.25
1.14	4.39E+04	7.91E-04	18	0.24
1.12	1.31E+04	2.38E-04	18	0.29
2.13	4.74E+04	8.64E-04	18	0.25
1.24	1.46E+04	2.93E-04	20	0.25
1.9	2.81E+04	5.71E-04	20	0.26
2.16	4.09E+04	8.75E-04	21	0.24
1.22	7.31E+04	1.67E-03	23	0.19
2.25	2.53E+04	5.76E-04	23	0.25
1.28	1.73E+04	4.31E-04	25	0.25
1.17	6.18E+04	1.55E-03	25	0.22
2.5	5.97E+04	1.56E-03	26	0.25
1.27	3.45E+04	9.22E-04	27	0.25
1.8	2.97E+04	8.32E-04	28	0.33
1.11	3.13E+04	9.28E-04	30	0.29
2.22	5.02E+04	1.67E-03	33	0.27
1.13	2.73E+04	9.85E-04	36	0.21
1.4	9.90E+03	3.97E-04	40	0.25
1.3	2.44E+04	9.92E-04	41	0.25
1.18	3.86E+04	1.92E-03	50	0.27
2.1	1.50E+04	8.11E-04	54	0.25
2.9	2.02E+04	1.10E-03	55	0.25
1.19	2.14E+04	1.29E-03	60	0.22
1.26	1.30E+04	8.46E-04	65	0.25
2.27	1.84E+04	1.31E-03	71	0.24
2.21	1.16E+04	8.99E-04	78	0.28
2.8	1.43E+04	1.35E-03	94	0.25
2.28	6.50E+03	6.43E-04	99	0.42
2.15	8.88E+03	9.02E-04	100	0.21
2.6	5846	6.39E-04	110	0.26
1.2	1.76E+04	2.03E-03	120	0.25
2.23	8.27E+03	9.69E-04	120	0.26
2.29	7.28E+03	1.50E-03	210	0.47
1.20	5.75E+03	1.27E-03	220	0.25
2.24	7.94E+03	1.84E-03	230	0.26
2.17	4.07E+03	9.79E-04	240	0.27
2.3	5.19E+03	1.48E-03	290	0.25
2.2	212E+03	1.19E-03	560	0.25
1.23	1.11E+03	9.67E-04	770	0.25
2.14	3.20E+03	4.18E-03	1300	0.25
1.25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2.11	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

## 实施例 10

### 多重竞争性抗体分箱 (MCAB) 检测方法

使用多重竞争性抗体分箱 (Multiplexed Competitive Antibody Binning, MCAB) 检测方法, 基于与抗原结合的交叉竞争, 将单克隆抗体分装在不同的箱中。MCAB 检测方法基于两个单克隆抗体与单个抗原分子的一个表位的竞争性结合。美国专利申请系列号 10/309,419, 申请日 2002 年 12 月 2 日, 标题 “Antibody Characterization Based on Binding Characteristics,” 公开号 US-2003-0157730-A1。应用 MCAB 方法之前, 先通过 ELISA 或其他方法识别和确认原代杂交瘤培养上清液中抗体的抗原反应性。每一种抗原免疫活性抗体用于形成抗体-抗原复合物, 其中的抗体称为“基准”抗体。另外, 每种抗体用作“探测”抗体以根据竞争性决定分箱。Luminex® 技术使得探测抗体同时与所有的基准抗体-抗原复合物竞争, 为本检测方法提供了多重性。

连接鼠抗 hIgG 单克隆抗体与 Luminex® 微珠。简言之, 将来自一组抗原反应性杂交瘤的每种杂交瘤上清液 (作为基准抗体) 取一部分, 与连接有鼠抗 hIgG 单克隆抗体且具有独特光谱编码的微珠温育, 方法如 Luminex® 100 用户手册 (版本 1.7) 中所述。活化后, 微珠与鼠抗 hIgG 单抗 (Pharmingen, San Diego, CA) 连接, 并在室温下温育 2 小时, 或在 4°C 下温育过夜。温育后, 阻断包被的微珠, 然后使用 Coulter 细胞计数器计数。

表位分箱。然后将连有微珠的基准抗体混合并均分至 96 孔板的孔中。各孔中均加入抗原以形成抗体-抗原复合物。将上清液中的每种抗体 (现作为探测抗体) 加至单个孔中。最后, 加入生物素化的鼠抗 hIgG 单抗, 随之加入链亲和素-PE 以检测探测抗体的结合情况。

简言之, 每种微珠-鼠抗 hIgG 复合物分别与基准抗体在旋转器 (rotator) 上 4°C 温育过夜。捕获基准抗体后, 微珠标记的鼠抗 hIgG-基准抗体复合物汇集到一起, 立即加至 96 孔过滤板的每个孔中, 抽滤。然后每孔加入 50ng 抗原, 室温下温育 1 小时。洗涤后, 每孔加入 100 到 500ng/ml 的探测抗体, 室温下温育 2 小时。结合的探测抗体使用 1μl/ml 的生物素化抗体检测, 所述生物素化抗体为与用于捕获基准抗体的单克隆鼠抗 hIgG 相同的抗体的生物素化形式。最后, 加入 0.5μg/ml 链亲和素-PE, 室温下

温育 30 分钟。

同时还进行无抗原的平行检测作为每种单抗结合的背景对照。然后使用 Luminex® 100 扫描每孔收集的微珠，以定量测定任何给定探测抗体与每一多重抗原 - 基准抗体 - 微珠复合物的结合程度。以相对荧光单位表示的阳性信号表明探测抗体能够与结合有基准抗体的抗原相结合，因此抗体对不竞争结合。与背景等同的信号表明探测抗体不能与结合有基准抗体的抗原相结合，抗体对竞争结合，因此属于同一箱。同一箱中的抗体有相同的或重叠的表位。

体外检测中从一组针对 PLA2 的抗体中识别出十七 (17) 种有效中和抗体。通过 MCAB 检测的表现识别出两箱中和抗体。(见表 13)。箱 1 包含 14 种抗体，箱 2 包含 3 种抗体。中和 PLA2 活性的 17 个抗体只产生 2 种种系 VH 基因。频率最高的基因，VH5-51 种系基因在被分析的 17 种抗体中的 14 种中表达，并只限于箱 1。功能性抗体的选择和分箱显示了特定箱中的抗体表达相同的 IgV<sub>H</sub>，某些情况下表达相同的 V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> 重排。

表 13

抗 PLA2 单抗序列 / 分箱总结

克隆	VH	DH	JH	VK	JK	箱
2.19.1	VH3-33	D1-1	JH3B	A3	JK5	2B
2.15.1	VH3-33	D1-7	JH3B	O12	JK5	2A
2.23.1	VH3-33	D3-3	JH4B	O12	JK5	2C
2.7.1	VH5-51	D3-16	JH3B	A27	JK3	1
2.9.1	VH5-51	D6-6	JH3B	O12	JK1	1
2.25.1	VH5-51	D6-6	JH3B	O12	JK1	1
2.4.1	VH5-51	D6-6	JH3B			1
1.18.1	VH5-51	D6-19	JH4B	A30	JK1	1
1.7.1	VH5-51	D2-2	JH6B	A27	JK4	1
1.27.1	VH5-51	D2-2	JH6B	A27	JK4	1
1.5.1	VH5-51	D2-8	JH6B			1
2.12.1	VH5-51	D1-7	JH3B	O12	JK3	1
2.23.1	VH5-51	D3-3	JH4B	O12	JK5	1
1.3.1	VH5-51		JH6B			1
1.21.1	VH5-51		JH3B	A3	JK1	1
1.14.1	VH5-51	D1-26	JH4B	A3	JK5	1
2.16.1	VH5-51	D1-26	JH4B			1

绘制高分辨率表位图谱。从两箱中各选出两种独特的抗体绘制其高分辨率表位图谱，以验证分箱结果。使用 SPOTs 技术 (Sigma Genosys, Inc.) 对重叠肽进行肽扫描，以绘制表位图谱。简言之，将 PLA2 的全部 157 氨



氨基酸序列作为一系列重叠的 12 聚体寡肽定制合成，偏移量为两个残基，从而在尼龙膜（Sigma Genosys, Inc.）上产生阵列排布的重叠肽集合（library）。在蛋白质印迹法的标准条件下，检测抗体与阵列排布的寡肽的结合情况。通过 ELISA 法中使用与 HRP 接合（conjugate）的二次抗体，继而通过增强化学发光（ECL），测定单抗与膜结合肽的结合情况。显示结合的斑点与包含表位的寡肽对应。抗 PLA2 单抗 2.12、2.25、2.15 和 2.23 显示可通过斑点印迹识别线性表位。

抗 PLA2 单抗 2.15.1 和 2.23.1 定位（map）于箱 2，两者结合于同一线性表位，GPAENK（SEQ ID NO:2 中的氨基酸 119-124）。抗 PLA2 单抗 2.12.1 和 2.25.1 均定位于箱 1。抗 PLA2 单抗 2.12.1 定位于较大表位，PQFLCEPD（SEQ ID NO:2 中的氨基酸 153-160），而抗 PLA2 单抗 2.25.1 定位于最小的表位，PQFL（SEQ ID NO:2 中的氨基酸 153-156），而该表位被包含于抗 PLA2 单抗 2.21.1 的表位之中，从而证实了 MCAB 检测结果的最基本的分子基础。箱 1 和箱 2 中的抗 PLA2 单抗具有保守性 V<sub>H</sub> 基因使用。例如，箱 1 中的抗体均使用 V<sub>H</sub>5-51 但具有不同的 CDR3 序列和轻链组成。箱 2 中的抗体均使用 V<sub>H</sub>3-33，具有不同的 CDR3 序列和轻链组成。已经观察到，基于结合竞争性的分箱及功能性检测中的抗体活性，与对其他、但非所有的抗原目标的可变区组成之间具有相关性（数据未列出）。

全部种系中只有部分成员显示可用于形成相应的互补位，对于每个抗原表位，有限数量的 L 和 H 链基因可配对形成特异性互补位。箱 1 中的单抗被发现共享相同的重链和轻链基因使用。尽管轻链上的 CDR3 和 FR2 长度存在差异，两者均与重叠表位结合。箱 2 中的单抗共享相同的重链和轻链基因使用。尽管轻链上的 CDR3 和 FR2 长度存在差异，两者均与同一表位结合。

### 实施例 11

#### 使用抗 PLA2 单抗 12.2 淘选噬菌体呈现随机肽文库

针对抗 PLA2 单抗 2.12，对与 M13 噬菌体的次要外壳蛋白（pIII）融合的 12 聚体随机肽 Ph.D.-12<sup>TM</sup> 噬菌体呈现文库（phage display library）（New England BioLabs）进行淘选。使用 ELISA 法选择可特异性结合者，并对其测序。然后将可特异性结合者的肽序列与 PLA2 抗原序列比对。可与抗 PLA2 单抗 2.12 特异性结合者的肽序列的比对显示于图 4 中。已经确

定与 PLA2 序列残基 153-156 比对得到的共有序列 PXFL 列入 SEQ ID NO:2 中。

### 实施例 12

#### 体外转录 / 翻译

测试四种单克隆抗体与连接有 Luminex®微珠的体外转录 (IVT) 产物的结合情况。所有构建体均表达为 6Xhis 标记的融合蛋白。观察到与全长 IVT 产物结合的情况,但未观察到与片段 1-36PLA2His 和 1-63PLA2His 结合的情况,说明表位在氨基酸 63 以后、分子的 C 末端区。

表 14

箱 1 中抗体的重链比对

SEQ ID NO.	抗体	FR1	CDR1
217	VH5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYWIG
218	2.25	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFISYWIA
219	2.12	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYNFITYWIA

抗体	FR2	CDR2
VH5-51	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPGSDTRYSPSFQG
2.25	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPGSDARYSPSFQG
2.12	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPGSDTRYSPSFQG

抗体	FR3	CDR3
VH5-51	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	WGQGTMTVSSA
2.25	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	TTQDTMTVSSA
2.12	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAL	WGQRTMETVSSA

表 15  
箱 1 中抗体的  $\kappa$  链比对

SEQ ID NO.	抗体	FR1	CDR1
220	O-12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISSYLN
221	2.25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISSYLN
222	2.12*	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSIGSYLN

抗体	FR2	CDR2
O-12	WYQQKPGKA###PKLLIY	AASSLQS
2.25	WYQQKPGKA###PKLLIY	AASSLQS
2.12*	WYQQKPGKPGKGPKEIY	AASSLQT

抗体	FR3	CDR3	J
O-12	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYSTPPT	FGQGTKVEIKR
2.25	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYNTPPT	FGQGTKVEIKR (JK1)
2.12*	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLRPEDFATYYC	QQSFNTPPT	FGPGTKVDIKR (JK3)

\*2.12 显示序列复制并在 FR2 中插入 3 个残基

### 实施例 13

#### 抗 PLA2 抗体和抗体结合物用于治疗炎症

PLA2 抗原的特异性抗体，如抗 PLA2 抗体，可用于表达这些抗原的心血管靶细胞，例如在治疗动脉粥样硬化和再狭窄中用作降脂剂。

使用抗 PLA2 抗体治疗小鼠。为确定抗 PLA2 抗体治疗心血管损伤的体内效果，血管损伤模型的基因剔除小鼠每隔预先确定的一段时间注射一次有效量的抗 PLA2 抗体。通过在颈动脉绑扎箍带，继而产生 PLA2 的炎性渗液，诱导小鼠体内的血管损伤。由此，出现与动脉粥样硬化和再狭窄患者情况相似的颈动脉壁发炎和加厚。在抗 PLA2 抗体治疗期间，定期对小鼠进行检查以确定血管损伤情况。结果发现血管损伤程度明显减轻。

### 实施例 14

#### 使用抗 PLA2 抗体治疗人类

为确定抗 PLA2 抗体治疗患有诸如动脉粥样硬化和再狭窄等炎症性疾病的人类患者的体内效果，所述人类患者每隔预定的时间注射一次有效量的完全人源抗 PLA2 抗体。治疗过程中对人类患者作定期检查以确定炎症程度是否明显减轻。

发现使用抗 PLA2 抗体治疗的患有动脉粥样硬化的患者，与未治疗患

者和/或使用对照抗体治疗的患者相比，其脂质水平较低。使用的对照抗体包括与测试的抗 PLA2 抗体同种型相同的抗体，并且所述对照抗体可能没有结合 PLA2 的能力。

### 实施例 15

#### 使用抗 PLA2 抗体结合物治疗

为了确定抗 PLA2 抗体结合物的体内作用效果，患有诸如动脉粥样硬化或再狭窄等炎症性疾病的人类患者或动物，每隔一预定时间注射一次有效量的抗 PLA2 抗体结合物。在一个实施方案中，施用的抗 PLA2 抗体结合物为美登素（maytansine）- 抗 PLA2 抗体结合物或放射性同位素 - 抗 PLA2 抗体结合物。治疗期间对人类患者或动物定期检查，以确定炎症是否减轻，尤其是血管损伤程度是否明显减轻。

结果发现，患有动脉粥样硬化或再狭窄并且经过美登素 - 抗 PLA2 抗体结合物或放射性同位素 - 抗 PLA2 抗体结合物治疗的人类患者或动物，与患有动脉粥样硬化或再狭窄并且经过诸如对照美登素 - 抗体或对照放射性同位素 - 抗体等对照抗体结合物治疗的对照患者或动物相比，其血管损伤和炎症水平较低。可以使用的对照美登素 - 抗体包括含有美登素的结合物，所述美登素连接有与抗 PLA2 抗体的同种型相同的抗体，但更特定地不具有结合 PLA2 抗原的能力。可以使用的对照放射性同位素 - 抗体包括含有放射性同位素的结合物，所述放射性同位素连接有与抗 PLA2 抗体的同种型相同的抗体，但更特定地不具有结合 PLA2 抗原的能力。

### 实施例 16

#### 抗 PLA2 抗体用作诊断剂

##### 检测样品中的 PLA2 抗原

开发了一种酶联免疫吸附测定法（ELISA）用以检测样品中的 PLA2 抗原。该检测方法中，用针对抗原的一次完全人源单克隆抗体吸附微量滴定板的孔数小时，例如 96 孔微量滴定板或 384 孔微量滴定板。固定的抗体充当可能存在于试样中的任何此抗原的捕捉抗体。将孔洗涤并以牛乳蛋白或白蛋白等封闭剂处理，以防止分析物的非特异性吸附。

随后，孔使用怀疑含有此抗原的试样处理，或者使用含有标准量此抗原的溶液处理。此样品可以是，例如，从怀疑具有一定水平的循环抗原的

受试者处采得的血清样品，所述抗原被认为是病理学的诊断特征。

洗去试样或标准溶液之后，孔使用与生物素结合标记的二次完全人源单克隆抗 PLA2 抗体处理。标记的抗 PLA2 抗体充当检测抗体。洗去多余的二次抗体之后，孔使用亲和素结合的辣根过氧化酶（HRP）和适当的显色底物处理。通过与标准样品得到的标准曲线相比确定试样中的抗原浓度。

本 ELISA 检测法为检测试样中的 PLA2 抗原提供了高特异性和高灵敏度的检测方法。

### 确定患者的 PLA2 抗原浓度

开发了夹心（sandwich）ELISA 法以定量测定人血清中 PLA2 水平。用于夹心 ELISA 法中的两种完全人源单克隆抗 PLA2 抗体可识别出 PLA2 分子上的不同表位（数据未列出）。该 ELISA 法按如下步骤进行：将溶于包被缓冲液（0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6）的 50μl 捕捉抗 PLA2 抗体以 2μg/ml 浓度包被于 ELISA 板（Fisher）上。4℃温育过夜后，板使用 200μl 封闭缓冲液（0.5% BSA, 0.1%吐温 20, 0.01%硫柳汞溶于 PBS）在 25℃下处理 1 小时。使用 0.05%溶于 PBS 的吐温 20（洗涤缓冲液，WB）洗板（三次）。正常或患者血清（Clinomics, Bioreclamation）稀释于含 50%人血清的封闭缓冲液中。加有血清样品的板在 4℃下温育过夜，使用 WB 洗涤，然后加入 100μl/孔生物素化的检测抗 PLA2 抗体，在 25℃下温育 1 小时。洗涤后，板中加入 HRP-链亲和素温育 15 分钟，如前洗涤，然后使用 100μl/孔溶于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的邻苯二胺（Sigma 显影液）处理以显示颜色。用 50μl/孔的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（2M）终止反应，使用酶免疫分析仪（ELISA plate reader）在 492nm 分析。使用四参数曲线拟合程序通过与纯化的 PLA2 抗原稀释液对比来计算血清样品中 PLA2 抗原的浓度。

### 判断患者炎症性疾病的病期

应该知道，基于以上实施例所阐明和讨论的结果，通过使用本发明的实施方案，可以根据 PLA2 抗原的表达水平来判断受试者心血管损伤的病期。对于给定的损伤类型，血液样品采自被诊断处于疾病发展不同阶段，和/或疾病治疗不同阶段的受试者。存在于血样中的 PLA2 抗原的浓度通过一种方法确定，所述方法可特异性测定存在的该抗原的量。所述方法包括一种 ELISA 法，例如以上实施例中所述方法。使用可为病情进展或治疗

的各个阶段提供统计上显著结果的抽样总体，可确定作为各个阶段的特征的抗原浓度范围。

为确定所研究受试者的疾病发展阶段，或确定受试者对一个疗程的反应，从受试者身上采得血样，并测定存在于样品中的 PLA2 抗原的浓度。如此获得的浓度用于确定该值落在哪个浓度范围。如此确定的范围与在多种诊断的受试者群体中确定的疾病发展阶段或治疗阶段相互关联，从而可提供所研究受试者的病期。

以上说明书被认为足以使本领域技术人员实施本发明。本文所述发明的实施方案不局限于具体列举的构思的范围，因为具体列举的实施方案仅出于对本发明某方面的说明目的，任何功能等效的构思均涵盖于本发明的范围之内。本文列举了某些资料并不等于承认本文中的描述不足以使发明的任一方面包括其最佳方式得到实施，也不能被解释为权利要求范围限于引用的材料中的具体说明。

#### 等同声明

前述说明书及实施例详细叙述了本发明的优选实施方案，并叙述了发明者预期的最佳方法。然而应该理解的是，无论前述内容以文本形式表现的如何详细，本发明仍可以多种方式实施，并且应根据修改的权利要求及其任何等同物解释本发明。

<110> 阿布格尼克斯公司  
 莱克斯康遗传物质公司  
 G. M. 兰德斯  
 M. 哈克-弗兰德肖  
 L. 陈  
 Y. R. 李  
 M. L. 梁  
 X. 冯  
 X. 贾  
 M. R. 诺斯瑞尼

<120> 针对磷脂酶 A2 的抗体

<130> ABGENIX. 072A

<140> 未知

<141> 2003-12-01

<150> n/a

<151>

<160> 222

<170> FastSEQ, Windows 版, 版本 4.0

<210> 1

<211> 1020

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

ggccttccaa agtgctggga ttacaggegt gagtcaccgc gcccgccaa ataaaataaa 60
atgttaaagc aaattcagga ctaccctcc tccaagtctt ctgttccctt tgggcgccca 120
ggtgagcggg ggaggggctg ggggagtaal aacatcaaaa gagcgcttt tcctccetta 180
ttccgaggag acttccctgg gctgactcc cggctctgtc cccagcgcgc cgcggcctct 240
ggagcccctt cagtgaccaa gatacagaga tcaggacgcc ttgctgcgcg cccagggtgcc 300
cgcccctagc tggctctgct tgggccgcga gggaaggtga ggtcgggggc ggagccgggg 360
cgtgacagcc ggggtgtgtg tccgccgggc ttggtgcctc cgggtggcct gcagcaccgt 420
cccacctctg ccacctccg atggggccgc tacctgtgtg cctgccaatc atgtgtctcc 480
tgctactgcc gtcgctgctg ctgctgctgc ttctacctgg ccccggtcc ggcgaggcct 540

```

ccaggatatt acgtgtgcac cggcgtggga tcttggaaact ggcaggaact gtgggttgtg 600  
 ttgttccccg aacccccatc gcctatatga aatatggttg cttttgtggc ttgggaggcc 660  
 atggccagcc ccgcgatgcc attgactggt gctgceatgg ccacgactgt tgttacactc 720  
 gagctgagga ggccggctgc agcccccaaga cagagcgccta ctcttggcag tgcgtcaatc 780  
 agagcgtcct gtgcccggacc gcagagaaca aatgcccaaga actgtttgtgc aagtgtgacc 840  
 aggagattgc taactgctta gcccaactg agtacaactt aaagtacctc ttctaccccc 900  
 agttcctatg tgagccggac tcgcccgaagt glgactgact accttgactt gaaatgctet 960  
 ttltgcacaag gaaataaagc gtctctcag taatgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020

<210> 2

<211> 165

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

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

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人



&lt;400&gt; 3

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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 4

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

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 5

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

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 6

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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 7

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

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 8

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



Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 11  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 11

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

<210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 12

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
                           85                          90                          95  
 Leu Gln Thr Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                           100                          105                          110  
 Arg

<210> 13  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 13  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1                          5                          10                          15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
                           20                          25                          30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                           35                          40                          45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
                           50                          55                          60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                          70                          75                          80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                           85                          90                          95  
 Ala Arg Ser Trp Thr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
                           100                          105                          110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala  
                           115

<210> 14  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 14  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                          5                          10                          15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn  
                           20                          25                          30  
 Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                           35                          40                          45

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

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

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

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Ile Arg Arg Ser  
 20 25 30

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

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

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

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

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



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

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

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

<210> 20

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

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

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

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

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

&lt;400&gt; 22

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

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 23

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Trp Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Thr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
                   100                   105                   110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala  
                   115                   120

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 24

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

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 25

Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Asp Gly Pro Ile Phe Gly Val Val Met Gly Tyr Trp Gly Gln  
                   100                   105                   110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
                   115                   120

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 26

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

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 27

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

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 28

```

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

```

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 29

```

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

```

Val Thr Val Ser Ser Ala  
115

<210> 30  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人

<220>  
<221> 变体  
<222> 102  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 30  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Trp Ile Gly Trp Leu Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60  
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Ser Thr Ser Xaa Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110  
Val Thr Val Ser Ser Ala  
115

<210> 31  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 31  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

```

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

```

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<222> 21

<223> n = 次黄嘌呤核苷

<400> 32

caggtgcagc tggagcagtc ngg

23

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> 人

<400> 33

gctgaggag tagagtctg agga

24

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> 人

<400> 34

cacaccggg tcacatggc

19

<210> 35

<211> 20



<212> DNA	
<213> 人	
<400> 35	
ctactetagg gcacctgtcc	20
<210> 36	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 36	
tgggacctac t	11
<210> 37	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 37	
ggatacagct atggt	15
<210> 38	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 38	
gtatagcggg ggctgg	16
<210> 39	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 39	
tatagtagct cgtcc	15
<210> 40	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 40	

---

atagcagcag ctggt	15
<210> 41	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 41	
gggtatagca gt	12
<210> 42	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 42	
tccttttaa	10
<210> 43	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 43	
ctggaactac	10
<210> 44	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 44	
ggatacagct atggt	15
<210> 45	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 45	
cagtgctgg tac	13
<210> 46	
<211> 10	

---

<212> DNA	
<213> 人	
<400> 46	
ctggaactac	10
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 47	
tatgattacg tttgggggag	20
<210> 48	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 48	
ggatacagct atggt	15
<210> 49	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 49	
agggactgga	10
<210> 50	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 50	
ggatacagct atggt	15
<210> 51	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 人	
<400> 51	

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Asn  
 1 5 10

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 52

Phe Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 53

Lys Gly Asp Trp Asn Tyr Glu Asp Tyr  
 1 5

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 55

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 56

Leu Gly Pro Thr Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 58

Trp Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 59

Asp Arg Asp Thr Ala Met Val Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 60

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn

1                    5                                    10

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<400> 61

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val

1                    5                                    10                                    15

Lys Ser

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 62

Gly Glu Tyr Ser Gly Gly Trp Asn Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1                    5                                    10                                    15

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1                    5                                    10

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 64

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 65

Glu Gly Val Thr Thr Ile Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu

1                    5                    10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 66

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser

1                    5                    10

<210> 67

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 67

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1                    5                    10                    15

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 68

Glu Val Ile Val Ala Arg Pro Trp Phe Asp Pro

1                    5                    10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 69

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Gly Met His

1                    5                    10

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 70

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15  
Gly

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 71

Glu Ile Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Met Asp Val

1                    5                    10

<210> 72

<211> 10



<212> PRT

<213> 人

<400> 72

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 73

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
1                   5                   10                   15  
Gly

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 74

Pro Pro Pro Gly Ile Ala Val Pro Phe Lys Asp Tyr  
1                   5                   10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His  
1                   5                   10

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 76

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Tyr Arg Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 77

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 77

Arg Gly Phe Asp Tyr

1                    5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 78

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn

1                    5                    10

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 79

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 80

Glu Gly Leu Glu Leu Arg Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1                    5                    10                    15

Val

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 81

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His

1                    5                    10

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 82

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 83

Asp Arg Asp Thr Ala Met Val Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp

1                    5                    10                    15

Val

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser  
1                   5                   10

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 85

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1                   5                   10                   15  
Gly

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 86

Glu Gly Val Thr Thr Ile Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu  
1                   5                   10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 87

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 88

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 89

Gln Arg Arg Gly Phe Asp Tyr  
 1                    5

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 90

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ala  
 1                    5                    10

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 91

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 92

Gly Arg Gly Gly Phe Asp Tyr

1                    5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 93

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Met His

1                    5                    10

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 94

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 95

Ala Val Ala Gly Thr Gly Ala Phe Asp Ile

1                    5                    10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 96







<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 105

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 106

Gly Gly Thr Gly Thr Pro Gly Ala Phe Asp Ile  
 1                    5                    10

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 107

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser  
 1                    5                    10

<210> 108

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<400> 108

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Val Lys Gly

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 109

Gly Met Ile Thr Phe Gly Gly Ala Met Phe Asp Phe

1                      5                      10

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 110

Gly Tyr Thr Phe Asn Asp Tyr Tyr Met His

1                      5                      10

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 111

Trp Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1                      5                      10                      15

Gly

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 112

Asp Arg Asp Thr Ala Met Val Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

1                      5                      10                      15

Val



<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 117

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 118

Arg Asp Trp Asn Tyr Gly Met Asp Val  
 1                    5

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 119

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His  
 1                    5                    10

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 120

Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 121

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 121

Asp Arg Asp Thr Ala Met Val Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp  
 1                    5                    10                    15  
 Val

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 122

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His  
 1                    5                    10

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 123

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 124

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 124

Gln Gly Ile Ala Ala Arg Arg Asn Tyr Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val  
 1                    5                    10                    15

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 125

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn

1                    5                    10

<210> 126

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 126

Trp Met Asp Pro Asn Ser Gly His Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 127

Glu Gly Asn Trp Gly Ser Phe Asp Tyr

1                    5

<210> 128

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 128

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly

1                    5                    10

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 129

Phe Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 130

His Thr Gly Ala Leu Asp Tyr  
 1                    5

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 131

Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His  
 1                    5                    10

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 132

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 133

Arg Gly Pro Leu Tyr Ala Phe Asp Ile

1 5

<210> 134

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 101, 102

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 134

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Xaa Xaa Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala

115

<210> 135

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体



<222> 102

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 135

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

<210> 136

<211> 121

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 99, 100, 103, 104, 105

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 136

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



<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 138

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

<210> 139

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 101

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 139

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

Ala Arg Ser Trp Xaa Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115

<210> 140

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 99

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 140

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

<210> 141

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 97, 98, 102

<223> Xaa = 任何氨基酸

&lt;400&gt; 141

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

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 变体

&lt;222&gt; 99, 100

&lt;223&gt; Xaa = 任何氨基酸

&lt;400&gt; 142

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

100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120  
  
 <210> 143  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 99, 100  
 <223> Xaa = 任何氨基酸  
  
 <400> 143  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Xaa Xaa Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115

<210> 144  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 99, 100, 101  
 <223> Xaa = 任何氨基酸

&lt;400&gt; 144

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

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 145

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

&lt;210&gt; 146

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 146

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala

1                    5                    10

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 147

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1                    5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 148

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Gln Ile Thr

1                    5

<210> 149

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 149

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Asp Leu Ala

1                    5                    10

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> 人



<400> 150

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 151

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 152

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly

1 5 10

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 153

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 154

Leu Gln His Asn Ile Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 155

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 155

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1                    5                    10                    15

Thr

<210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 156

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1                    5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 157

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr

1                    5

<210> 158

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 158

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala

1                    5                    10

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 159

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala

1 5

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 160

Gln Gln Cys Asp Tyr Ser Pro Pro Cys Ser

1 5 10

<210> 161

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 161

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Lys Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 162

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 163

Gln Gln Tyr Asp Tyr Ser Pro Ile Thr  
1 5

<210> 164

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 164

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ala

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 165

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 166

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr  
1 5

<210> 167

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 167

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gln Ser Asn Gly Tyr Lys Tyr Leu Glu

---

1	5	10	15
<210> 168			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 168			
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser			
1	5		
<210> 169			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 169			
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr			
1	5		
<210> 170			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 170			
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala			
1	5	10	
<210> 171			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 171			
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr			
1	5		
<210> 172			

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 172

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Cys Ser  
1                    5                    10

<210> 173

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 173

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ile Leu Ala  
1                    5                    10

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 174

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr  
1                    5

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 175

Gln Gln Tyr His Asn Trp Pro Ile Thr  
1                    5

<210> 176

<211> 16

<212> PRT

<213> 人



<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 181

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Ile Thr

1 5

<210> 182

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 182

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Tyr Phe Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 183

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 183

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 184

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 185



<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 185  
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Lys Asn Phe Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Ala

<210> 186  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 186  
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1                    5

<210> 187  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 187  
 Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Leu Thr  
 1                    5

<210> 188  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 188  
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Ala

<210> 189

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 189

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser

1                    5

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 190

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr

1                    5

<210> 191

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 191

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Ala

1                    5                    10

<210> 192

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 192

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1                    5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 193

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr  
1 5

<210> 194

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 194

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 195

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 195

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 196

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 196

Gln His Tyr Gly Ser Leu Pro Pro Cys Ser  
1 5 10

<210> 197

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 197

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 198

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 199

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 200

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 200

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Arg Ser Asn Asn Arg Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 201

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 201

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 202

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Arg Thr

1 5

<210> 203

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 203

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 204

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 204

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 205

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 206

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

&lt;400&gt; 206

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 1                    5                    10                    15

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 207

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
 1                    5

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 208

Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr  
 1                    5

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 209

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

100

105

&lt;210&gt; 210

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 210

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

&lt;210&gt; 211

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 211

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

100

105

&lt;210&gt; 212

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 212

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

&lt;210&gt; 213

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 213

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



85 90 95  
 Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 214

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 214

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

<210> 215

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 215

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



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

<210> 218

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 218

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

<210> 219

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 219

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Thr Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

<210> 220

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 44, 45, 46

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 220

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

<210> 221

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 44, 45, 46

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 221

```

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

```

<210> 222

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 222

```

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

```

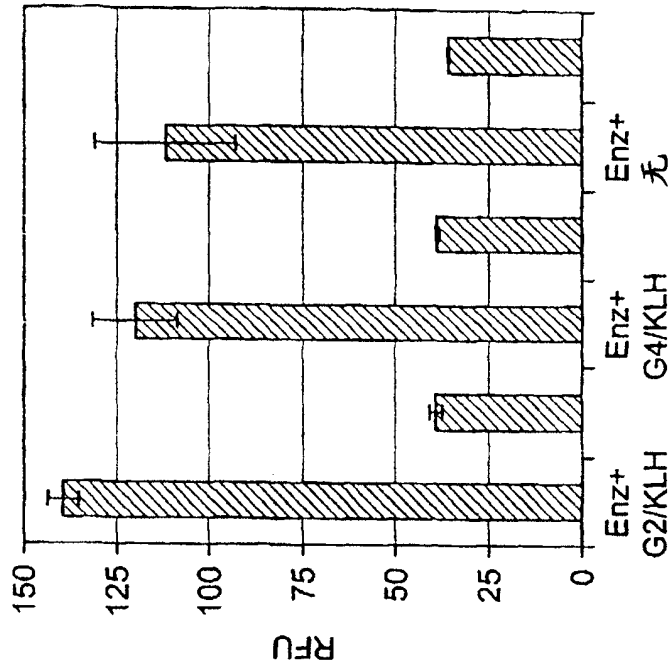


图 1B

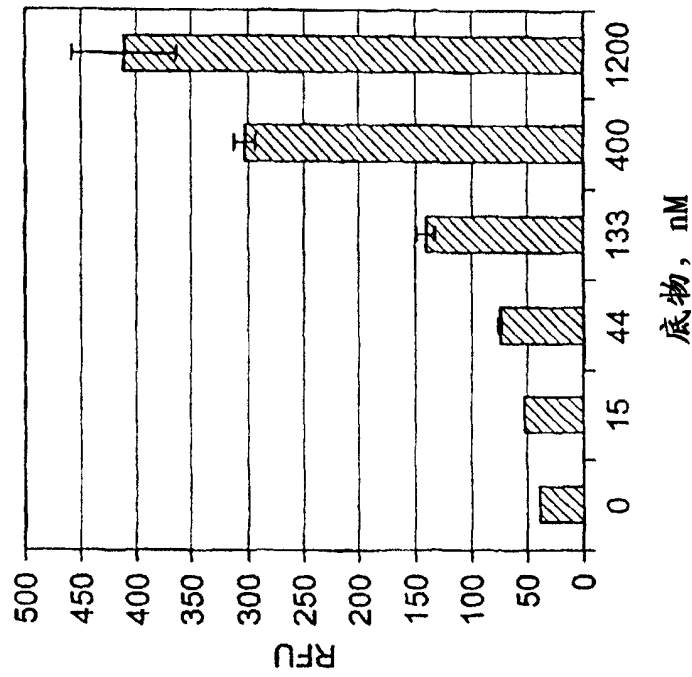


图 1A

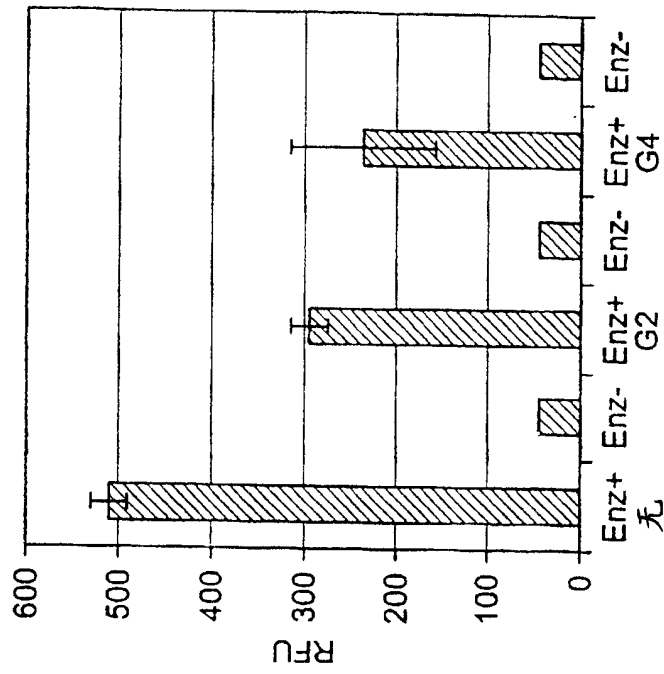


图 2B

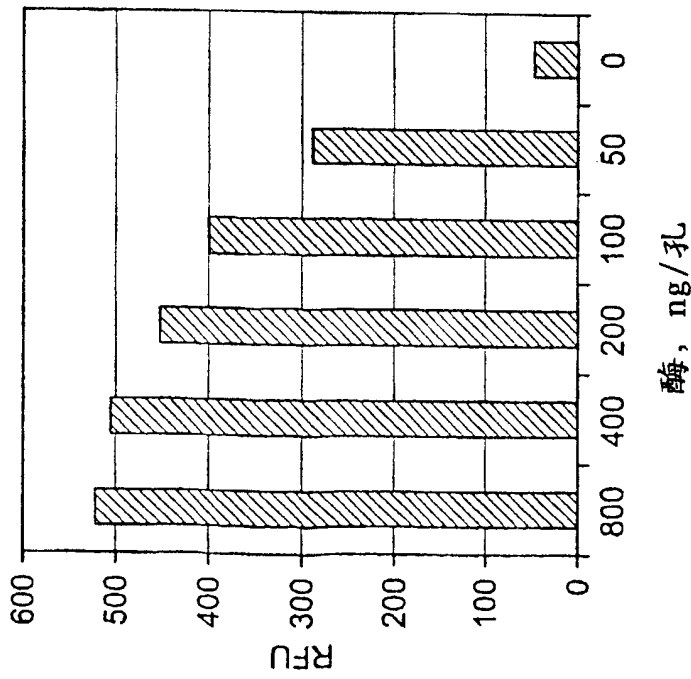
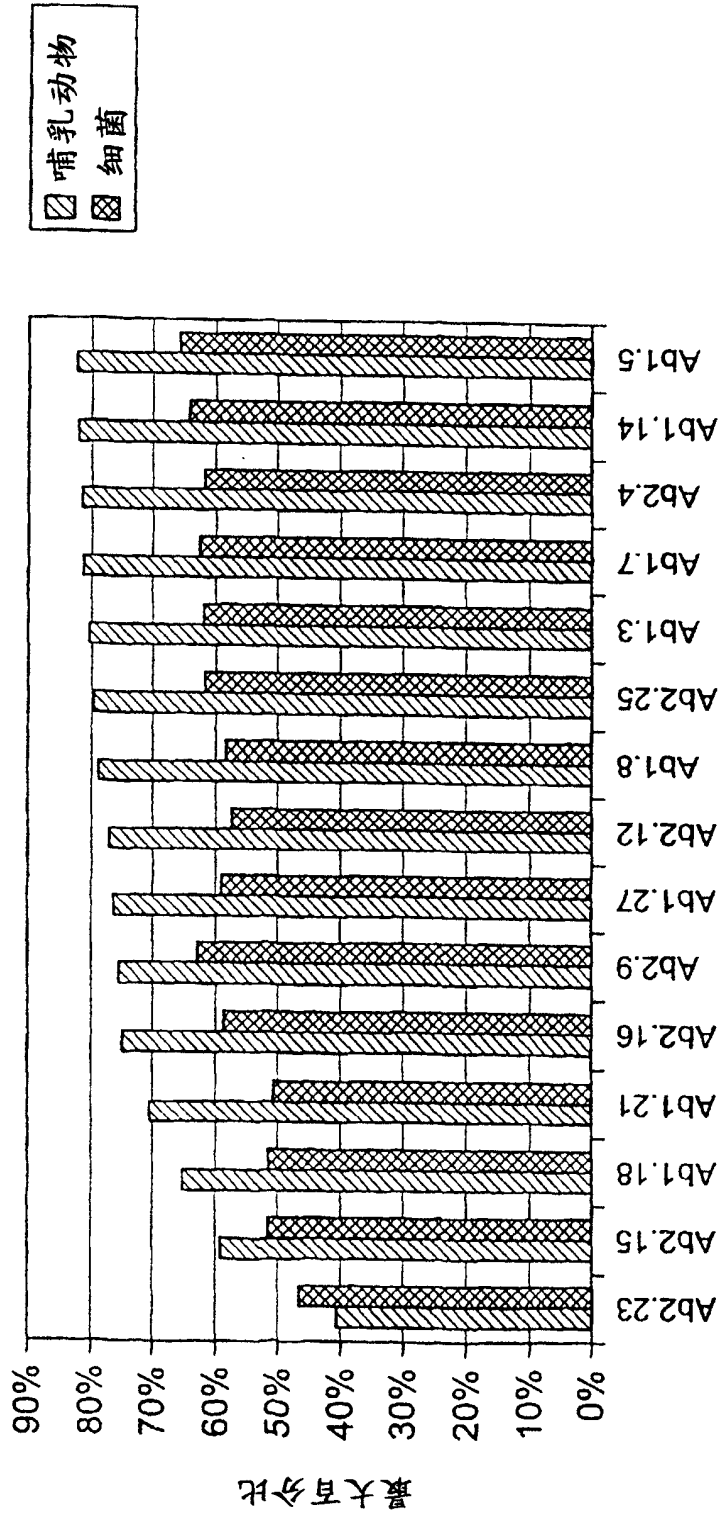


图 2A



3



