



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105849129 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201480039387.X

(22)申请日 2014.05.30

(30)优先权数据

61/829,973 2013.05.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.01.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2014/050507 2014.05.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/190441 EN 2014.12.04

(71)申请人 醇活有限公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72)发明人 E·埃斯科巴-卡布瑞拉

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

G07K 16/46(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

G07K 16/00(2006.01)

G07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

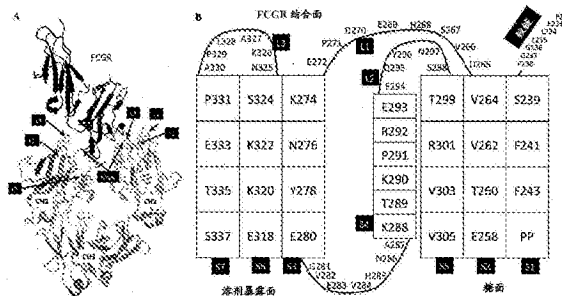
权利要求书5页 说明书48页 附图35页

(54)发明名称

具有降低的或沉默的效应子功能的异多聚体

(57)摘要

本文提供了具有降低的或沉默的效应子功能的异多聚体。在一个实施方案中提供了一种异多聚体构建体,其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,每个Fc多肽包括经修饰下游铰链区,其中:所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括至少一个氨基酸修饰,所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fcγ受体和C1q蛋白的结合。还提供了产生此类异多聚体构建体的方法,以及通过降低效应子功能来降低抗体构建体的ADCC的方法。



1. 一种异多聚体,其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,每个Fc多肽包括经修饰下游铰链区,其中:

a. 所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括所述至少一个氨基酸修饰,

b. 所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一至Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且

c. 所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

2. 根据权利要求1所述的异多聚体,其中

a. 所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区中的至少一个氨基酸修饰增加所述经修饰下游铰链区中的净正电荷,并且所述第二Fc多肽区中的至少一个氨基酸修饰增加负电荷总数或者相对于野生型铰链区是电中性的;或者

b. 所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区中的至少一个氨基酸修饰增加经修饰下游铰链区中的净负电荷,并且所述第二Fc多肽中的至少一个氨基酸修饰增加正电荷总数。

3. 根据权利要求1或2所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰下游铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。

4. 一种异多聚体,其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,每个Fc多肽包括经修饰铰链区,其中:

a. 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括至少一个氨基酸修饰,其在约生理pH条件下增加所述第一Fc多肽的经修饰铰链区中的净电荷,

b. 所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且

c. 所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的对所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

5. 根据权利要求4所述的异多聚体,其中所述净电荷的增加是第一Fc多肽上净正电荷的增加。

6. 根据权利要求5所述的异多聚体,其中所述净正电荷的增加是所述第一Fc多肽上带正电荷的氨基酸总数的增加,或者所述第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数的减少。

7. 根据权利要求4所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽的经修饰铰链区上的至少一个氨基酸修饰增加所述第一Fc多肽上带正电荷的氨基酸总数,并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区上的至少一个氨基酸修饰增加所述第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数或者是电中性的。

8. 根据权利要求4所述的异多聚体,其中所述净电荷的增加是所述第一Fc多肽上净负电荷的增加。

9. 根据权利要求8所述的异多聚体,其中所述净负电荷的增加是所述第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数的增加,或者带正电荷的氨基酸总数的减少。

10. 根据权利要求8或9所述的异多聚体,其中当净负电荷是带负电荷的氨基酸总数的增加时,所述第二Fc多肽上的至少一个氨基酸修饰增加正电荷总数。

11. 根据权利要求4至10中任一项所述的异多聚体,其中与母体IgG Fc构建体相比,与所述第二Fc多肽中的至少一个氨基酸修饰组合的所述第一Fc多肽的经修饰铰链区中的至

少一个氨基酸修饰增加所述IgG Fc构建体的总正电荷。

12. 根据权利要求4至11中任一项所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。

13. 根据权利要求4至12中任一项所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。

14. 根据权利要求4至13中任一项所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽的经修饰铰链区中的至少一个氨基酸修饰是在所述下游铰链区中。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体对于Fc $\gamma$ RIIaH的K<sub>D</sub>大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIaR的K<sub>D</sub>大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIb的K<sub>D</sub>大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaF的K<sub>D</sub>大于6 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaV的K<sub>D</sub>大于6 $\mu$ M,以及对于Fc $\gamma$ RIa的K<sub>D</sub>大于6.5nM。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体与不包括所述氨基酸修饰的相应IgG Fc构建体相比介导降低的效应子功能。

17. 根据权利要求16所述的异多聚体,其中通过EC<sub>50</sub>测量,所述IgG Fc构建体介导小于70%、小于50%、小于30%或小于10%的效应子功能。

18. 根据权利要求16所述的异多聚体,其中通过最大细胞裂解测量,所述IgG Fc构建体介导小于10%、小于5%、小于2%或小于1%的效应子功能。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的异多聚体,其中所述效应子功能选自ADCC、ADCP、CDC或其任意组合。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括L234和/或L235处的氨基酸修饰。

21. 根据权利要求20所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括选自L234K、L234R、L234A、L235K、L235R和L235A的氨基酸修饰。

22. 根据权利要求20或21所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的一个还包括E233处的氨基酸修饰。

23. 根据权利要求22所述的异多聚体,其中所述E233处的氨基酸修饰选自E233A、E233K和E233R。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽二者的经修饰铰链区包括L234和/或L235处的氨基酸修饰。

25. 根据权利要求24所述的异多聚体,其中所述L234和/或L235处的氨基酸修饰选自L234A、L234K、L234R、L234D、L234E、L235K、L235R、L235E、L235A和L235D。

26. 根据权利要求24或25所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和/或所述第二Fc多肽的经修饰铰链区还包括E233处的氨基酸修饰。

27. 根据权利要求26所述的异多聚体,其中一个或全部两个氨基酸修饰独立地为E233A或E233D。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K、E233A/L234R/L235R、E233K/L234R/L235R或E233K/L234A/L235K。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽或所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235A、L234D/L235E、E233A/L234D/L235E或

E233A/L234K/L235A。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的异多聚体, 其中:

a. 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235A;

b. 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E;

c. 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234R/L235R并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234D/L235E;

d. 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E; 或者

e. 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234A/L235K并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234K/L235A。

31. 根据权利要求1至29中任一项所述的异多聚体, 其中:

a. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/E233K;

b. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/D265S并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/D265S;

c. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K;

d. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/K322A并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/K322A;

e. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/P329W并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/P329W;

f. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322A并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A; 或者

g. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。

32. 一种异多聚体, 其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc, 其中:

a. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰E269Q/D270N并且所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰E269K/D270R; 或者

b. 所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L235K/A327K并且所述第二Fc多肽在铰链区或下游铰链区中不包括修饰;

并且其中所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的异多聚体, 其中所述IgG Fc构建体是未糖基化的。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的异多聚体, 其中所述IgG Fc构建体是去糖基化的。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的异多聚体, 其中所述IgG Fc构建体在热谱图中

的熔化起点大于或等于68℃。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度大于或等于相应母体CH2区的熔化温度。

37. 根据权利要求1至35中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比相应母体CH2区的熔化温度高约1℃至2℃。

38. 根据权利要求1至35中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比相应母体CH2区的熔化温度高约2℃至3℃。

39. 根据权利要求1至38中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体包括变体CH3区,所述变体CH3区包括当所述异多聚体被表达时与同二聚体Fc区相比促进异二聚体Fc区形成的氨基酸修饰。

40. 根据权利要求39所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的一个包括CH3氨基酸修饰T366L/N390R/K392M/T394W,并且另一个Fc多肽包括CH3氨基酸修饰L351Y/S400E/F405A/Y407V。

41. 根据权利要求40所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和/或所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰T350V。

42. 根据权利要求39至41中任一项所述的异多聚体,其中使用基于电荷的纯化方法从包括同二聚体Fc区的表达产物中解析包括异二聚体Fc区的异多聚体。

43. 根据权利要求1至42中任一项所述的异多聚体,其中所述异多聚体还包括与所述IgG Fc构建体融合的至少一个抗原结合构建体。

44. 根据权利要求1至43中任一项所述的异多聚体,其中所述至少一个抗原结合构建体选自Fab片段、scFv、sdAb、抗原结合肽、Fc融合蛋白或者能够与所述抗原结合的蛋白质或其片段。

45. 根据权利要求43或44所述的异多聚体,其包括一个抗原结合构建体。

46. 根据权利要求43或44所述的异多聚体,其包括两个抗原结合构建体。

47. 根据权利要求1至46中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体与一个或更多个毒性药物分子连接。

48. 根据权利要求1至46中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体与一个或更多个异源多肽连接。

49. 根据权利要求48所述的异多聚体,其中所述一个或更多个异源多肽选自酶和毒素。

50. 根据权利要求1至49中任一项所述的异多聚体,其中所述IgG是IgG1。

51. 一种核酸,其编码根据权利要求1至45中任一项所述的异多聚体的所述第一Fc多肽或所述第二Fc多肽。

52. 一种宿主细胞,其包括根据权利要求51所述的核酸。

53. 一种制备根据权利要求1至50中任一项所述的异多聚体的方法,所述方法包括以下步骤:(a)培养根据权利要求52所述的宿主细胞;以及(b)从所述宿主细胞培养物中回收所述异多聚体。

54. 根据权利要求53所述的方法,其还包括使用基于电荷的纯化方法分离所述异多聚体的步骤。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述基于电荷的纯化方法是离子交换色谱。

56. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至50中任一项所述的异多聚体和药学上可接受的载体。

57. 一种治疗疾病的方法,其包括向有此需要的患者提供有效量的根据权利要求56所述的药物组合物。

58. 根据权利要求1至50中任一项所述的异多聚体在制备用于治疗疾病的药物中的用途。

59. 根据权利要求1至50中任一项所述的异多聚体用于治疗有此需要的患者中的疾病的用途。

60. 一种降低抗体构建体的效应子功能的方法,其包括:

对第一Fc多肽和第二Fc多肽的下游铰链区进行修饰,其中;

所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括至少一个氨基酸修饰,

所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且

所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述修饰导致可忽略的与Fc受体的结合。

## 具有降低的或沉默的效应子功能的异多聚体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年5月31日提交的美国临时申请No.61/829,973的权益,为了所有目的,该申请通过引用整体并入本文。

[0003] 介绍

### 2.1发明领域

[0004] 本发明涉及治疗性抗体设计领域,特别是涉及包含异二聚体Fc区的多肽,所述异二聚体已被修饰以沉默由Fc区介导的效应子功能。

[0005] 2.2发明背景

[0006] 已经开发了治疗性抗体来治疗多种疾病适应症。在这些情况中的一些中,治疗性抗体的效力至少部分地是由于抗体Fc区介导一种或更多种效应子功能的能力。这些效应子功能是由于抗体和抗体-抗原复合物与免疫系统的细胞相互作用以刺激多种应答,包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)(于以下中综述:Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997);Ward和Ghetie,Therapeutic Immunol.2:77-94(1995);以及Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991))。多种抗体效应子功能是由与抗体的Fc区结合的Fc受体(FcR)介导的。FcR由其对于免疫球蛋白同种型的特异性定义,IgG抗体的Fc受体称为Fc $\gamma$ R,IgE抗体的Fc受体称为Fc $\epsilon$ R,IgA抗体的Fc受体称为Fc $\alpha$ R,等等。抗体的Fc区还介导独立于抗原结合而起作用以及赋予循环中的持久性和通过胞吞作用穿过细胞屏障转移的能力的功能,例如与FcRn结合(Ward和Ghetie,Therapeutic Immunology 2:77-94(1995))。

[0007] 但是,对于某些疾病适应症,抗体的Fc区介导的效应子功能可能造成不良副作用,因此,已经努力来设计具有降低的或沉默的效应子功能的抗体。

[0008] 最近的出版物描述了用于设计具有降低的或沉默的效应子活性的抗体的策略(参见Strohl,WR(2009),Curr Opin Biotech 20:685-691,以及Strohl,WR和Strohl LM,“Antibody Fc engineering for optimal antibody performance”In Therapeutic Antibody Engineering,Cambridge:Woodhead Publishing(2012),第225-249页)。这些策略包括通过通过糖基化修饰,使用IgG2/IgG4骨架,或者在抗体Fc区的铰链区或CH2区引入突变。

[0009] 此外,美国专利公开No.2011/0212087(Strohl)描述了在Fc区中具有变化的抗体和其他含Fc的分子,所述变化降低了与Fc $\gamma$ R(Fc $\gamma$ 受体)的结合以及导致的活性,并且可用于治疗多种疾病和病症。

[0010] 国际专利公开No.WO 2006/105338(Xencor)描述了具有最佳性能的Fc变体,其制备方法,包含具有最佳性能的Fc变体的Fc多肽,以及使用具有最佳性能的Fc变体的方法。

[0011] 美国专利公开No.2012/0225058(Xencor)描述了母体IgG Fc构建体的Fc变体,其中所述Fc变体表现出改变的与一种或更多种Fc $\gamma$ R的结合,其中所述Fc变体包括在所述母体IgG Fc构建体的Fc区中的至少一个氨基酸的插入。

[0012] 美国专利公开No.2012/0251531(Genentech)描述了包含Fc变体的工程化多肽及其用途,更特别地,表现出降低的效应子功能的Fc变体。这些变体还被描述为对患有可以用抗体治疗的疾病的患者具有益处,对于所述抗体,期望降低通过抗体引起的效应子功能。

[0013] Strop等((2012)J.Mol.Biol.420:204-219)描述了在人IgG1和IgG2的核心铰链区和CH3区引物电荷突变以提高双特异性抗体的形成。

[0014] 发明概述

[0015] 本文提供了一种异多聚体,所述异多聚体包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,每个Fc多肽包括经修饰下游铰链区,其中:所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括至少一个氨基酸修饰,并且所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

[0016] 在某些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽的经修饰下游铰链区中的至少一个氨基酸修饰增加经修饰下游铰链区中的净正电荷,并且第二Fc多肽中的至少一个氨基酸修饰增加负电荷总数或者相对于野生型铰链区是电中性的;或者第一Fc多肽的经修饰下游铰链区中的至少一个氨基酸修饰增加经修饰下游铰链区中的净负电荷,并且第二Fc多肽的经修饰下游铰链区中的至少一个氨基酸修饰增加正电荷总数。

[0017] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰下游铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。

[0018] 本文提供了一种异多聚体,其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,每个Fc多肽包括经修饰下游铰链区,其中:所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括至少一个氨基酸修饰,其在约生理pH条件下增加所述第一Fc多肽的经修饰铰链区中的净电荷,并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

[0019] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中净电荷的增加是第一Fc多肽上净正电荷的增加。在一些实施方案中,所述净正电荷的增加是第一Fc多肽上带正电荷的氨基酸总数的增加,或者第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数的减少。在某些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽的经修饰铰链区上的至少一个氨基酸修饰增加所述第一Fc多肽上带正电荷的氨基酸总数,并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区上的至少一个氨基酸修饰增加所述第二Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数或者是电中性的。

[0020] 在一个实施方案中,净电荷的增加是第一Fc多肽上净负电荷的增加。在某些实施方案中,净负电荷的增加是第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数的增加,或者带正电荷的氨基酸总数的减少。在某些实施方案中,当净负电荷是带负电荷的氨基酸总数的增加时,第二Fc多肽上的至少一个氨基酸修饰增加正电荷总数。

[0021] 在一些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中与不包括铰链区修饰的相应母体IgG Fc构建体相比,与第二Fc多肽中的至少一个氨基酸修饰组合的第一Fc多肽的经修饰铰链区中的至少一个氨基酸修饰增加IgG Fc构建体的总正电荷。

[0022] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。



[0023] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。

[0024] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽和第二Fc多肽的经修饰铰链区中的至少一个氨基酸修饰是在下游铰链区中。

[0025] 提供了本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体对于Fc  $\gamma$  RIIaH的 $K_D$ 大于10 $\mu$ M,对于Fc  $\gamma$  RIIaR的 $K_D$ 大于10 $\mu$ M,对于Fc  $\gamma$  RIIb的 $K_D$ 大于10 $\mu$ M,对于Fc  $\gamma$  RIIIaF的 $K_D$ 大于6 $\mu$ M,对于Fc  $\gamma$  RIIIaV的 $K_D$ 大于6 $\mu$ M,以及对于Fc  $\gamma$  RIa的 $K_D$ 大于6.5nM。

[0026] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体与不包括氨基酸修饰的相应IgG Fc构建体相比介导降低的效应子功能。在一些实施方案中,通过EC<sub>50</sub>测量,所述IgG Fc构建体介导小于70%、小于50%、小于30%或小于10%的效应子功能。在一些实施方案中,通过最大细胞裂解测量,所述IgG Fc构建体介导小于10%、小于5%、小于2%或小于1%的效应子功能。在一些实施方案中,效应子功能选自ADCC、ADCP、CDC或其任意组合。

[0027] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括L234和/或L235处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括选自L234K、L234R、L234A、L235K、L235R和L235A的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的一个还包括E233处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述E233处的氨基酸修饰选自E233A、E233K和E233R。

[0028] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽二者的经修饰铰链区包括L234和/或L235处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,L234和/或L235处的氨基酸修饰选自L234A、L234K、L234R、L234D、L234E、L235K、L235R、L235E、L235A和L235D。在另一个实施方案中,第一Fc多肽和/或第二Fc多肽的经修饰铰链区还包括E233处的氨基酸修饰。一个或全部两个氨基酸修饰独立地为E233A或E233D。

[0029] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K、E233A/L234R/L235R、E233K/L234R/L235R或E233K/L234A/L235K。

[0030] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽和第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235A、L234D/L235E、E233A/L234D/L235E或E233A/L234K/L235A。

[0031] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中:第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235A;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234R/L235R并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234D/L235E;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E;或者第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234A/L235K并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234K/L235A。

[0032] 在某些实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中:第一Fc多肽包括氨基酸修

饰L234D/L235E并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/E233K;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/D265S并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/D265S;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/K322A;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/P329W并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/P329W;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A;或者第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。

[0033] 本文提供了一种异多聚体,其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc,其中:所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰E269Q/D270N并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E269K/D270R;或者所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L235K/A327K并且第二Fc多肽在铰链区或下游铰链区中不包括修饰;并且其中所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

[0034] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体是未糖基化的(aglycosylated)。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体是去糖基化的。

[0035] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体在热谱图中的熔化起点大于或等于68 $^{\circ}$ C。

[0036] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度大于或等于不包括铰链区修饰的相应母体CH2区的熔化温度。

[0037] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比母体CH2区的熔化温度高约1 $^{\circ}$ C至2 $^{\circ}$ C。

[0038] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比母体CH2区的熔化温度高约2 $^{\circ}$ C至3 $^{\circ}$ C的CH2区。

[0039] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体包括变体CH3区,所述变体CH3区包括当所述异多聚体被表达时与同二聚体Fc区相比促进异二聚体Fc区形成的氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的一个包括CH3氨基酸修饰T366L/N390R/K392M/T394W,并且另一个Fc多肽包括CH3氨基酸修饰L351Y/S400E/F405A/Y407V。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽和/或所述第二Fc多肽包括氨基酸修饰T350V。在另一些实施方案中,使用基于电荷的纯化方法从包括同二聚体Fc区的表达产物中解析包括异二聚体Fc区的异多聚体。

[0040] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中异多聚体还包括与所述IgG Fc构建体融合的至少一个抗原结合构建体。

[0041] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述至少一个抗原结合构建体选自Fab片段、scFv、sdAb、抗原结合肽、Fc融合蛋白或者能够与抗原结合的蛋白质或其片段。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其包括一个抗原结合构建体。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其包括两个抗原结合构建体。

[0042] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体与一个或更多

个毒性药物分子连接。

[0043] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体与一个或更多个异源多肽连接。在一些实施方案中,所述一个或更多个异源多肽选自酶和毒素。

[0044] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG是IgG1。

[0045] 本文提供了一种核酸,其编码本文所述的异多聚体的第一Fc多肽或第二Fc多肽。提供了包含本文所述核酸的宿主细胞。提供了制备本文所述的异多聚体的方法,所述方法包括以下步骤:(a)培养本文所述的宿主细胞;以及(b)从宿主细胞培养物中回收异多聚体。在某些实施方案中是制备异多聚体的方法,其还包括使用基于电荷的纯化方法分离异多聚体的步骤。在某些实施方案中是制备本文所述的异多聚体的方法,其中基于电荷的纯化方法是离子交换色谱。

[0046] 提供了一种药物组合物,其包含本文所述的异多聚体和药学上可接受的载体。提供了一种治疗疾病的方法,其包括向有此需要的患者提供有效量的本文所述的药物组合物。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体在制备用于治疗疾病的药物中的用途。

[0047] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体用于治疗有此需要的患者中的疾病的用途。

[0048] 本文提供了一种降低抗体构建体的效应子功能的方法,其包括:对第一Fc多肽和第二Fc多肽的下游铰链区进行修饰,其中所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括至少一个氨基酸修饰,所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。在一些实施方案中,所述修饰导致可忽略的与Fc受体的结合。

[0049] 附图简述

[0050] 在参考附图的以下描述中,本发明的这些以及其他特征将变得更加明显。

[0051] 图1描绘了Fc区参与Fc $\gamma$ R结合的区域。(A)3b/Fc晶体结构(PDB:1E4K),指示了Fc(以灰色示出)的参与Fc $\gamma$ R结合的CH2结构域的环和下游铰链(以黑色示出)。(B)CH2结构域的拓扑结构。链表示为S1、S2、S3、S4、S5、S6和S7;环表示为L1、L2和L3。

[0052] 图2描绘了与野生型抗体(WT)相比示例性不对称抗体构建体的热谱图。图2A描绘了WT和AAC2-AAC6的热谱图。图2B描绘了两种转变在WT中的身份(identity)。第一种转变相当于CH2结构域的展开,第二种转变相当于CH3+Fab的展开。图2C描绘了若干样品的叠加,示出了变体的CH2转变如何向更高Tm值(指示更高稳定)移动。

[0053] 图3A描绘了示例性结果,示出了在纯化示例性不对称抗体时通过离子交换色谱对产生组分的解析。图3B描绘了使用示例性不对称变体AAC4使用pH梯度(上图)或盐梯度(下图)对组分的分离。

[0054] 图4描绘了对照变体(v1051)和本发明的示例性异多聚体(AAC6)介导ADCC的能力。

[0055] 图5描绘了人IgG1Fc区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1);曲妥珠单抗的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:2),曲妥珠单抗的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:3),利妥昔单抗的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:4),利妥昔单抗的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。

[0056] 图6描绘了变体AAC9-AAC12、AAC14和AAC15在Daudi细胞中介导ADCC的能力。图6A描绘了与包括市售利妥昔单抗在内的对照相比AAC10和AAC11的结果;图6B描绘了与包括市

售利妥昔单抗在内的对照相比AAC12和AAC14的结果;图6C描绘了与包括市售利妥昔单抗在内的对照相比AAC9和AAC15的结果。

[0057] 图7描绘了变体AAC9-AAC12、AAC14和AAC15在Daudi细胞中介导CDC的能力。

[0058] 图8描绘了与本文一起提交的SEQ ID NO:6-69的序列。

[0059] 详述

[0060] 本发明提供了一种包括IgG Fc构建体的异多聚体。所述IgG Fc构建体包括两个Fc多肽,每个Fc多肽具有经修饰铰链区,其中所述经修饰铰链区包括不对称氨基酸修饰,其降低或消除IgG Fc构建体与Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIaR、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaF、Fc $\gamma$ RIIIaV和Fc $\gamma$ RIa受体或者与补体因子C1q蛋白的结合。这样降低或消除这种结合导致通常由野生型IgG Fc区介导的效应子功能的降低或沉默。应注意,经修饰铰链区包括不对称氨基酸修饰,并且这样时,IgG Fc构建体的一个多肽的铰链区中的氨基酸修饰不同于另一个多肽的铰链区上的那些。在一些实施方案中,分离的抗体构建体是稳定的并且能够与FcRn结合。

[0061] 在某些实施方案中,IgG Fc构建体的每个多肽的经修饰铰链区包括一个或更多个氨基酸修饰,选择所述氨基酸修饰以使得与IgG Fc构建体的另一个多肽相比增加IgG Fc构建体的一个多肽上的正电荷。在某些实施方案中,IgG Fc构建体的每个多肽的经修饰铰链区包括一个或更多个氨基酸修饰,选择所述氨基酸修饰以使得与IgG Fc构建体的另一个多肽相比增加IgG Fc构建体的一个多肽上的负电荷。

[0062] 根据本发明的异多聚体可用于开发治疗性抗体,所述治疗性抗体的效应子功能由于导致副作用如细胞毒性所以是不期望的。在一些实施方案中,所述异多聚体还表现出有利于使用基于电荷的方法对其进行纯化的特性。

[0063] 本文提供了具有降低或沉默的效应子功能的异多聚体构建体。在一个实施方案中提供了一种异多聚体构建体,其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,每个Fc多肽包括经修饰下游铰链区,其中:所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括至少一个氨基酸修饰,并且所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。在某些实施方案中,与不具有本文所述修饰的IgG Fc构建体相比,所述异多聚体构建体表现出可忽略的与Fc $\gamma$ 受体的结合。在一些实施方案中,所述异多聚体构建体表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体的结合,并且表现出可忽略的与至少一种Fc $\gamma$ 受体的结合。在某些实施方案中,本文所述的异多聚体表现出降低的与Fc $\gamma$ 受体的结合并且表现出可忽略的与C1q蛋白的结合。在某些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个包括不在下游铰链区中的另外的至少一个氨基酸修饰。在某些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个还包括在铰链区中的至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽的至少一个还包括在CH2或CH3区中的至少一个氨基酸修饰。

[0064] 本文提供了一种异多聚体,所述异多聚体包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,每个Fc多肽包括经修饰铰链区,其中:所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括至少一个氨基酸修饰,其在约生理pH条件下增加所述第一Fc多肽的经修饰铰链区中的净电荷,并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且与相应母体IgG Fc构建体相比所述IgG Fc构建体表现出降

低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。在一些实施方案中,净电荷的增加是第一Fc多肽上净正电荷的增加。在一个实施方案中,净正电荷的增加是第一Fc多肽上带正电荷的氨基酸总数的增加,在某些实施方案中,所述净正电荷的增加是第一Fc多肽上净负电荷的增加。在一个特定实施方案中,净负电荷的增加是第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数的增加。在一些实施方案中,与不具有本文所述修饰的母体IgG Fc构建体相比,异多聚体表现出可忽略的与Fc $\gamma$ 受体的结合。在一些特定实施方案中,异多聚体表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体的结合,并且表现出可忽略的与至少一种Fc $\gamma$ 受体的结合。在一个实施方案中,本文所述的异多聚体构建体表现出降低的与Fc $\gamma$ 受体的结合,并且表现出可忽略的与C1q蛋白的结合。在某些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个还包括在下游铰链区中的至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个还包括在CH2区或CH3区中的至少一个氨基酸修饰。

[0065] 一些实施方案中是本文提供的异多聚体,其中第二Fc多肽的经修饰铰链区中的一个或更多个氨基酸修饰改变了铰链区中负电荷或正电荷的数目,或者相对于野生型铰链区是电中性的。在某些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。在一个实施方案中提供了本文所述的异多聚体,其中所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰。在某些实施方案中是本文所述的异多聚体构建体,其中第一Fc多肽和第二Fc多肽的经修饰铰链区中的一个或更多个氨基酸修饰是在下游铰链区中(SEQ ID NO:1的氨基酸16-23,参见图5)。

[0066] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体对于Fc $\gamma$ RIIaH的KD为至少约10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIaR的KD为至少约10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIb的KD为至少约10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaF的KD为至少约6 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaV的KD为至少约6 $\mu$ M,以及对于Fc $\gamma$ RIa的KD为至少约6.5nM。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体对于Fc $\gamma$ RIIaH的KD大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIaR的KD大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIb的KD大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaF的KD大于6 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaV的KD大于6 $\mu$ M,以及对于Fc $\gamma$ RIa的KD大于6.5nM。

[0067] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括L234和L235中的至少一个处的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括选自L234K、L234R、L234A、L235K、L235R和L235A的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,第一Fc多肽和第二Fc多肽中的所述一个包括E233处的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文提供的异多聚体,其中E233处的所述修饰选自E233A、E233K和E233R。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括在L234和L235中的至少一个处的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中在L234和L235中的至少一个处的所述修饰选自L234A、L234K、L234R、L234D、L234E、L235K、L235R、L235E、L235A和L235D。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第二Fc多肽的经修饰铰链区还包括在E233处的氨基酸修饰。在一个实施方案中,第一Fc多肽和第二Fc多肽包括选自E233A或E233D的氨基酸修饰。在某些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个还包括选自D265S、E269K、

K322A、P329W和E333K的至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽还包括选自D265S、E269K、K322A、P329W和E333K的至少一个氨基酸修饰。

[0068] 本文提供了本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235K、E233A/L234R/L235R、E233K/L234R/L235R或E233K/L234A/L235K。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽和第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235A、L234D/L235E、E233A/L234D/L235E或E233A/L234K/L235A。

[0069] 本文提供了本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K,并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235K;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K,并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234R/L235R,并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234D/L235E;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R,并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E;或者第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234A/L235K,并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234K/L235A。

[0070] 在一些实施方案中是本文提供的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个还包括选自D265S、E269K、K322A、P329W和E333K的至少一个氨基酸修饰。例如,在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/E233K。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/D265S并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/D265S。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/K322A。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/P329W并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/P329W。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。

[0071] 提供了本文所述的异多聚体,其中:第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/E233K;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/D265S并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/D265S;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/K322A;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/P329W并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/P329W;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A;或者第一

Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。

[0072] 提供了一种异多聚体,其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体,其中:所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰E269Q/D270N并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E269K/D270R;或者所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L235K/A327K并且第二Fc多肽在铰链区或下游铰链区中不包括修饰;并且其中所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 以及C1q蛋白的结合。

[0073] 在一些实施方案中是本文提供的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体是未糖基化的。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体是去糖基化的。

[0074] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体在热谱图中的熔化起点大于或等于68 $^{\circ}$ C。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比得上母体CH2区的熔化温度。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度大于或约等于母体CH2区的熔化温度。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比母体CH2区的熔化温度高约1 $^{\circ}$ C至2 $^{\circ}$ C。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比母体CH2区的熔化温度高约2 $^{\circ}$ C至3 $^{\circ}$ C的CH2。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述IgG Fc构建体具有CH2区,所述CH2区的熔化温度比母体CH2区的熔化温度高约5 $^{\circ}$ C。

[0075] 本文提供了异多聚体构建体,其中所述IgG Fc构建体包括变体CH3区,所述变体CH3区包括促进异二聚体Fc区形成的氨基酸修饰。

[0076] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体构建体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的一个包括CH3氨基酸修饰T366L/N390R/K392M/T394W并且另一个Fc多肽包括CH3氨基酸修饰L351Y/S400E/F405A/Y407V。

[0077] 在一些实施方案中是本文所述的异多聚体构建体,其中所述IgG Fc构建体包括增加CH3区的稳定性的氨基酸修饰。在一个实施方案中第一Fc多肽和第二Fc多肽包括氨基酸修饰T350V。在某些实施方案中,使用基于电荷的纯化从所述异多聚体中清楚地解析任何具有同二聚体Fc构建体的抗体构建体。

[0078] 提供了本文所述的异多聚体,其中所述异多聚体还包括与IgG Fc构建体融合的至少一个抗原结合构建体。在某些实施方案中,所述至少一个抗原结合构建体选自Fab片段、scFv、sdAb、抗原结合肽、Fc融合蛋白或者能够与抗原结合的蛋白质或其片段。在一些实施方案中是包括一个抗原结合构建体的异多聚体。在一些实施方案中是包括两个抗原结合构建体的异多聚体。在一个实施方案中是异多聚体,其中所述IgG Fc构建体与一个或更多个毒性药物分子连接。在某些实施方案中,所述IgG Fc构建体与一个或更多个异源多肽连接。在一些实施方案中,所述一个或更多个异源多肽选自酶和毒素。

[0079] 提供了本文所述的异多聚体,其中所述IgG是IgG1。

[0080] 本文提供了一种核酸,其编码本文所述的异多聚体的第一Fc多肽或第二Fc多肽。在一些实施方案中是包含本文所述核酸的宿主细胞。在某些实施方案中是制备本文所述的异多聚体的方法,所述方法包括以下步骤:(a)培养本文所述的宿主细胞;以及(b)从宿主细

胞培养物中回收异多聚体。

[0081] 本文提供了药物组合物,其包含本文所述的异多聚体和药学上可接受的载体。在某些实施方案中是一种治疗疾病的方法,其包括向有此需要的患者提供有效量的本文所述的药物组合物。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体在制备用于治疗疾病的药物中的用途。在一些实施方案中是治疗量的本文所述的异多聚体用于治疗有此需要的患者中的疾病的用途。

[0082] 本文提供了一种降低抗体构建体ADCC的效应子功能的方法,其包括:对第一Fc多肽和第二Fc多肽的下游铰链区进行修饰,其中所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括至少一个氨基酸修饰,所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。在某些实施方案中是降低ADCC的方法,其中所述修饰导致可忽略的与Fc受体的结合。

[0083] 定义

[0084] 除非另有限定,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与要求保护的主体所属领域技术人员的通常理解相同的含义。在本文术语具有多个定义的情况下,以本部分中的那些为准。当参考URL或其他此类标识符或地址时,应理解的是此类标识符可能变化,并且因特网上的特定信息可能变来变去,但是通过搜索因特网可能发现等同信息。对其进行参考表明了这些信息的可用性和公众传播。

[0085] 应理解的是,前述一般描述和接下来的详细描述仅仅是示例性和解释性的,而不限制任何要求保护的主体。在本申请中,未用数量词限定的名词包括了复数指示物,除非上下文另外明确说明。

[0086] “母体CH<sub>2</sub>结构域”是指包含这样的氨基酸序列的Fc区的CH<sub>2</sub>结构域多肽,所述氨基酸序列缺少本文公开的第一Fc多肽和第二Fc多肽铰链区中的一个或更多个氨基酸修饰,但是可以包含二硫化物铰链修饰、添加的CH<sub>2</sub>二硫化物、糖基化修饰或者不同的CH<sub>3</sub>结构域稳定性中的一个或更多个,并且与本发明异多聚体的CH<sub>2</sub>结构域相比效应子功能不同。母体CH<sub>2</sub>区可以包括天然序列Fc区或者具有预先存在的氨基酸序列修饰(例如,添加、缺失和/或置换)的Fc区。

[0087] “未糖基化抗体”是指在表达期间未糖基化的抗体或异多聚体。未糖基化抗体可以通过在缺少哺乳动物糖基化途径的系统(例如,大肠杆菌)中表达或者使一个多或更多个糖基化位点(例如,N297)突变来制备。

[0088] “去糖基化抗体”是指最初在表达期间糖基化但是随后经历了去除聚糖的生物化学反应(例如,PNGase F处理)的抗体或异多聚体。

[0089] “具有中性侧链的氨基酸”是指包含在中性pH下不带电荷的侧链的氨基酸。除赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸之外的所有氨基酸被认为是中性的。在一些实施方案中,根据其存在的结构环境,赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸也被认为是中性。在一个实施方案中,“具有中性侧链的氨基酸”是指包含在生理pH下不具有总体电荷的侧链的氨基酸。

[0090] “具有带正电荷的侧链的氨基酸”是指包含在中性pH下质子化并因此带正电荷的侧链的极性氨基酸。这些氨基酸常被称为是碱性的。具有带正电荷的侧链的氨基酸的实例



包括赖氨酸、精氨酸。在一些实施方案中,根据其存在的结构环境,组氨酸也可以质子化并且具有带正电荷的侧链。在一个实施方案中,“具有带正电荷的侧链的氨基酸”是指包含在生理pH下带正电荷的侧链的氨基酸。

[0091] “具有带负电荷的侧链的氨基酸”是指其侧链在中性pH下去质子化并因此带负电荷的极性氨基酸。这些氨基酸常被称为是酸性的。具有带负电荷的侧链的氨基酸的实例包括天冬氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中,“具有带负电荷的侧链的氨基酸”是指包含在生理pH下带负电荷的侧链的氨基酸。

[0092] “结合亲和力”一般是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合伴侣(例如,抗原或Fc $\gamma$ R)之间的非共价相互作用的总和强度。分子X对于其伴侣Y的亲和力一般可以用解离常数(K<sub>d</sub>或K<sub>D</sub>)表示。亲和力可以通过本领域中的常用方法测量,包括本文描述的那些。低亲和力抗体与抗原(或Fc $\gamma$ R)较弱地结合并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体抗原(或Fc $\gamma$ R)更强地结合并且更久保持结合。

[0093] 术语“Fc区”(或片段可结晶区)用于定义抗体的C末端区。Fc区由源自抗体的两个重链(A链和B链)的第二和第三恒定结构域的两个相同的蛋白质片段构成。第二和第三恒定结构域分别被称为CH2结构域和CH3结构域。CH2结构域包括A链的CH2结构域序列和B链的CH2结构域序列。CH3结构域包括A链的CH3结构域序列和B链的CH3结构域序列。本文使用的Fc区包括下文定义的铰链区。

[0094] 术语“Fc区序列”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区。“Fc区序列”可以是天然Fc区序列或者变体Fc区序列。尽管免疫球蛋白的Fc区序列的边界可能变化,人IgG重链Fc区序列通常定义为从Cys226位或从Pro230位的氨基酸残基延伸到其羧基末端。

[0095] 人IgG Fc区序列的“CH2结构域序列”(也称为“Cy2”结构域序列)通常从约氨基酸231延伸到约氨基酸340。CH2结构域序列的独特之处在于其与另外的结构域序列不是严格配对。相反,两条N连接的分支糖链插入在完整天然IgG分子的两个CH2结构域序列之间。已经推测碳水化合物可以提供对结构域-结构域配对的置换并且有助于稳定CH2结构域。Burton, Molec. Immunol. 22:161-206(1985)。

[0096] “CH3结构域序列”包括Fc区序列中从C末端到CH2结构域序列的残基的延伸(即,从IgG的约氨基酸残基341到约氨基酸残基447)。

[0097] “功能Fc区”具有天然Fc区的“效应子功能”。示例性的“效应子功能”包括:C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的向下调节等。此类效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)结合并且可以例如使用本文公开的多种测定来评估。

[0098] “天然Fc区序列”包括与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括:天然序列人IgG1Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2Fc区;天然序列人IgG3Fc区;和天然序列人IgG4Fc区及其天然存在的变体。

[0099] “变体Fc区序列”包括由于本文定义的“一个或多个氨基酸修饰”而与天然Fc区序列不同的氨基酸序列。变体Fc区序列与天然Fc区序列或母体多肽的Fc区序列相比具有至少一个氨基酸置换,例如在天然Fc区序列或母体多肽的Fc区序列中具有约1至约10个氨基酸置换,优选地约1至约5个氨基酸置换。在某些实施方案中,本文的变体Fc区序列与天然Fc区序列和/或母体多肽的Fc区序列具有至少约80%同一性,并且最优选地与其具有至少约

90%同一性,更优选与其具有至少约95%同一性。

[0100] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然人FcR。另外,在某些实施方案中,FcR是与IgG抗体结合的FcR( $\gamma$ 受体,Fc $\gamma$ R),并且包括Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RII(CD32)和Fc $\gamma$ RIII(CD16)亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择剪接形式。Fc $\gamma$ RII受体包括Fc $\gamma$ RIIA(“活化受体”)和Fc $\gamma$ RIIB(“抑制受体”),其具有主要在细胞质结构域中不同的类似氨基酸序列。活化受体Fc $\gamma$ RIIA在其细胞质结构域中包含免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM)。抑制受体Fc $\gamma$ RIIB在其细胞质结构域中包含免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)(参见综述于M.Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34(1994);以及de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)中。其他FcR(包括将在未来鉴定的那些)涵盖在本文的术语“FcR”中。术语“FcR”还包括新生儿受体(neonatal receptor)FcRn,其负责将母亲IgG传递到胎儿(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587(1976)和Kim等, *J. Immunol.* 24:249(1994))。术语“Fc $\gamma$ R”不包括FcRn。

[0101] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达FcR的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并随后造成靶细胞裂解。用于介导ADCC的主要细胞NK细胞表达Fc $\gamma$ RIII和低水平的Fc $\gamma$ RIIc,而单核细胞表达Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII。造血细胞上FcR的表达总结在Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991)第464页的表3中。

[0102] “人效应子细胞”是表达一种或更多种FcR并且执行效应子功能的白细胞。优选地,所述细胞表达至少Fc $\gamma$ RIII并且执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和中性粒细胞,其中优选PBMC和NK细胞。效应子细胞可以从其天然来源分离,例如如本文所述从血液或PBMC分离。

[0103] 具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”Fc $\gamma$ R结合亲和力和C1q结合亲和力的异多聚体是与母体多肽或者与包括天然Fc区序列的多肽相比具有减小的Fc $\gamma$ R结合亲和力和C1q结合亲和力的异多聚体。在一些实施方案中,具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”Fc $\gamma$ R结合亲和力和C1q结合亲和力的异多聚体还是与母体多肽或者与包括天然Fc区序列的多肽相比具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”ADCC、ADCP和CDC活性的异多聚体。“表现出降低的或不可检测的与Fc $\gamma$ R的结合”的异多聚体以比母体多肽低的亲和力与所有Fc $\gamma$ R结合。表现出降低的与Fc $\gamma$ R的结合的这些变体可以对Fc $\gamma$ R具有很小或不可感知的结合。在一个实施方案中,与天然IgG Fc区相比变体对Fc $\gamma$ R表现出0-20%的结合,例如,如在本文实施例中测定的或者通过平衡常数的变化测量的。在一个实施方案中,与天然IgG Fc区相比变体对Fc $\gamma$ R表现出0-10%的结合。在一个实施方案中,与天然IgG Fc区相比变体对Fc $\gamma$ R表现出0-5%的结合。在一个实施方案中,与天然IgG Fc区相比变体对Fc $\gamma$ R表现出0-1%的结合。

[0104] 在另一个实施方案中,对Fc $\gamma$ RIIaH具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”结合的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIIaH的Kd大于5 $\mu$ M,如通过SPR(表面等离子体共振)测量的。在另一个实施方案中,对Fc $\gamma$ RIIaR具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”结合的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIIaR的Kd大于10 $\mu$ M,如通过SPR(表面等离子体共振)测量的。在另一个实施方案中,对Fc $\gamma$ RIIb具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除

的”结合的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIIb的K<sub>D</sub>大于30 $\mu$ M,如通过SPR(表面等离子体共振)测量的。在另一个实施方案中,对Fc $\gamma$ RIIIaF具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”结合的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIIIaF的K<sub>D</sub>大于20 $\mu$ M,如通过SPR(表面等离子体共振)测量的。在另一个实施方案中,对Fc $\gamma$ RIIIaV具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”结合的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIIIaV的K<sub>D</sub>大于6 $\mu$ M,如通过SPR(表面等离子体共振)测量的。在另一个实施方案中,对Fc $\gamma$ RIa具有“极大降低的”、“沉默的”、“可忽略的”或“消除的”结合的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIa的K<sub>D</sub>大于6.5nM,如通过SPR(表面等离子体共振)测量的。

[0105] 与母体抗体相比“在人效应子细胞的存在下更有效地介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)”的异多聚体是这样的异多聚体,当在测定中使用的异多聚体和母体抗体的量基本相同时,其在体外或体内介导ADCC中基本上更有效。通常,使用本文公开的体外ADCC测定来鉴定此类多肽,但是考虑了其他用于确定ADCC活性的测定或方法,例如在动物模型等中。例如,在本文所公开的体外测定中,优选多肽比母体在介导ADCC中有效约1.5倍至约100倍,例如约2倍至约50倍。

[0106] “母体抗体”、“母体多肽”或“包含天然Fc区的多肽”是指不包括对铰链区的氨基酸修饰的构建体。在一个实施方案中,母体抗体是不包括对铰链区的氨基酸修饰但是包括促进异二聚体Fc区形成的对CH3结构域的修饰的抗体。

[0107] “氨基酸修饰”是指与确定氨基酸序列的氨基酸序列的变化。示例性修饰包括氨基酸置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,本文的氨基酸修饰是置换。特定位置(例如,Fc区)的“氨基酸修饰”是指特定残基的置换或缺失,或者与特定残基相邻插入至少一个氨基酸。“特定残基”相邻插入意指在其一个或两个残基之内插入。在某些实施方案中插入是在特定残基的N末端或C末端。

[0108] “氨基酸置换”是指将预定氨基酸序列中存在的至少一个氨基酸残基置换为另一个不同的“替代”氨基酸残基。替代残基可以是选自由以下组成的组的“天然存在的氨基酸残基”(即,由遗传密码编码):丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、和缬氨酸(Val)。优选地,替代残基不是半胱氨酸。置换成一个或多个非天然存在的氨基酸残基也涵盖在本文的氨基酸置换的定义内。“非天然存在的氨基酸残基”是指除了上文列出的那些天然存在的氨基酸残基外的能够与肽链中的相邻氨基酸残基共价结合的残基。非天然存在的氨基酸残基的实例包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸等氨基酸残基类似物,例如Ellman等Meth. Enzym. 202:301-336(1991)中描述的那些。为了形成这些非天然存在的氨基酸残基,可以使用以下中的方法Noren等Science 244:182(1989)和Ellman等,同上。简单地说,这些方法涉及用非天然存在的氨基酸残基的化学地活化抑制性tRNA,然后对RNA进行体外转录和翻译。

[0109] “氨基酸插入”是指向预定氨基酸序列中引入至少一个氨基酸。在某些实施方案中,插入由插入两个或多个氨基酸残基组成。在某些另外的实施方案中是较大的“肽插入”,例如,插入约3至约5甚至多达约10个氨基酸残基。在这些实施方案中,插入的残基是上文讨论的天然存在的或非天然存在的。

[0110] “氨基酸缺失”是指从预定氨基酸序列中移除至少一个氨基酸残基。

[0111] “铰链区”通常定义为从人IgG1的Glu216至Pro238,其中Cys226至Pro230形成“核心”铰链区(Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206(1985)),而Ala231至Pro238形成“下游铰链区”。Glu216至Thr225形成“上游铰链区”。其他IgG同种型的铰链区可以通过在相同位置使第一个和最后一个半胱氨酸残基形成重链内S—S键来与IgG 1序列比对。

[0112] “C1q”是包括对于免疫球蛋白Fc区的结合位点的多肽的多聚体。C1q与两种丝氨酸蛋白酶C1r和C1s一起形成复合体C1,这是补体依赖性细胞毒性(CDC)途径的第一种成分。人C1q可以是市购自例如Quidel, San Diego, Calif。

[0113] 术语“结合结构域”是指与另外的分子结合的多肽区域。在FcR的情况下,结合结构域可以包括其多肽链(例如,其 $\alpha$ 链)的负责与Fc区结合的部分。一种有用的结合结构域是Fc $\alpha$ 链的胞外结构域。

[0114] 术语“抗体”以最广义使用,并且特别地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要其具有期望的生物学活性即可。

[0115] 本文定义的“抗体片段”包括完整抗体的一部分,通常包括完整抗体的至少一个抗原结合区或可变区或者抗体的Fc区。抗体片段的实例包括由抗体片段形成的线性抗体、单链抗体分子和多特异性抗体。在某些实施方案中,抗体片段保留了IgG重链的铰链区和任选的CH1区的至少一部分。在一些实施方案中,抗体片段保留了IgG重链的整个恒定区,并且包括IgG轻链。

[0116] 本文使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群获得的抗体,即除了可能的天然发生的微量突变外,该抗体群中的各个抗体都是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物不同,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”表示抗体是从基本上同源的抗体群获得的特征,而不能解释为需要通过任何特定方法来产生抗体。在某些实施方案中,根据本公开内容使用的单克隆抗体通过在Kohler等, *Nature* 256:495(1975)中首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法(参见,例如,美国专利No.4,816,567)制备。在一些实施方案中,使用例如Clackson等, *Nature* 352:624-628(1991)和Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0117] 本文的单克隆抗体特别地包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要其表现出期望的生物活性即可(美国专利No.4,816,567;和Morrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。

[0118] “病症”是任何从所述多肽变体的治疗中受益的状态。其包括慢性病症和急性病症或者疾病,包括使哺乳动物处于所讨论病症的那些病理状态。在一个实施方案中,病症是癌症。

[0119] 在本文中使用时,词语“标签”是指与多肽直接或间接缀合的可检测化合物或组合物。在某些实施方案中,标签本身是可检测的(例如,放射性同位素标签或荧光标签)。在一些另外的实施方案中,标签催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。示范性实施方

案包括催化可检测底物化合物或组合物的化学变化的酶标签。

[0120] “分离的”核酸分子是从多肽核酸的天然来源中通常与其结合的至少一种污染物核酸分子中鉴定和分离的核酸分子。分离的核酸分子与天然中发现的该分子的形式或结构(setting)不同。因此,分离的核酸分子不同于天然细胞中存在的核酸分子。但是,分离的核酸分子包括通常表达该多肽的细胞中包含的核酸分子,例如,该核酸分子与天然细胞的核酸分子在染色体位置上不同。

[0121] 表述“控制序列”是指对于可操作地连接的编码序列在特定宿主生物体中表达必要的DNA序列。适合于原核生物的控制序列包括例如启动子、任选的操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多聚腺苷酸化信号和增强子。

[0122] 当核酸与另一核酸序列处于功能关系时,其是“可操作地连接的”。例如,如果前导序列或分泌型前导序列的DNA被表达为参与多肽的分泌的前蛋白,则其与多肽的DNA可操作地连接;如果启动子或增强子影响序列的转录,则其与编码序列可操作地连接;或者如果核糖体结合位点定位为促进转录,则其与编码序列可操作地连接。通常,“可操作地连接”是指DNA序列是相邻的,并且在分泌型前导序列的情况下,是相邻的并且在阅读相中。但是,增强子未必是相邻的。连接是通过方便的限制性位点的连接实现的。如果不存在此类位点,则根据常规实践使用合成的寡核苷酸连接物或接头。

[0123] 本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且此类命名包括后代。因此,词语“转化子”和“转化细胞”包括原代对象细胞和由其得到的培养物,而不必考虑转移次数。还应理解的是,由于故意的或非故意的突变,所有后代在DNA含量上可能不是完全相同。也包括在初始转化细胞中筛选的具有相同功能或生物活性的突变体后代。当命名不同时,可以从上下文中明显看出。

[0124] 短语“低亲和力受体”是指对于目标配体具有弱的结合亲和力的受体,例如,解离常数为约50nM或更差的亲和力。示例性低亲和力受体包括Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII。

[0125] 本文中使用的“Fc-融合”意指其中一个或多个多肽与Fc区可操作地连接的蛋白质或者其衍生物。本文的Fc融合意指与本领域中使用的术语“免疫粘附素”、“Ig融合”、“Ig嵌合体”和“受体球蛋白”(有时具有连接号)同义(Chamow等,1996,Trends Biotechnol 14:52-60;Ashkenazi等,1997,Curr Opin Immunol 9:195-200)。Fc融合将免疫球蛋白的Fc区域融合伴侣结合,所述融合伴侣通常可以是任何蛋白质或小分子。Fc融合的非Fc部分(即,融合伴侣)的作用是介导靶标结合,因此在功能上类似于抗体的可变区。事实上任何蛋白质或小分子均可以与Fc结合以产生Fc融合。蛋白质融合伴侣可以包括但不限于受体、粘附分子、配体、酶、细胞因子、趋化因子或者其他蛋白质或蛋白质结构域。小分子融合伴侣可以包括将Fc融合引导到治疗靶标的任何治疗剂。此类靶标可以是涉及疾病的任何分子,优选细胞外受体。为若干经批准小分子药物的靶标的两个表面受体家族是G蛋白偶联受体(GPCR)和离子通道,包括 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 通道。目前全世界所有市售药物中几乎70%都靶向GPCR。因此,本文所述的Fc融合蛋白可以与靶向以下受体的小分子融合:例如,一种或更多种GABA受体、嘌呤能受体、肾上腺素能受体、组胺能受体、阿片样物质受体、趋化因子受体、谷氨酸受体、烟碱受体、5HT(血清素)受体和雌激素受体。融合伴侣可以是靶向治疗上可用靶标的蛋白质的小分子模拟物。可以充当Fc融合伴侣的特定药物的实例可以在以下找到:L.S.Goodman等,编辑,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of

Therapeutics(McGraw-Hill, New York, 第9版, 1996)。融合伴侣不仅包括结合现有药物的已知靶标的小分子和蛋白质, 还包括尚未作为药物靶标存在的孤儿受体。基因组和蛋白质组项目的完成被证明是药物发现中的驱动力, 这些项目已经发现了一系列孤儿受体。对着确认这些新分子作为药物靶标以及开发靶向它们的蛋白质和小分子, 具有很大的潜力。设想将此类蛋白质和小分子治疗剂作为使用本文所述的IgG Fc构建体的Fc融合伴侣。下文定义和描述的多种接头可能用于将Fc共价连接到融合伴侣移产生Fc融合。

[0126] 本文使用的“靶抗原”是指与给定抗体的可变区特异性结合的分子。靶抗原可以是蛋白质、碳水化合物、脂质或其他化学化合物。

[0127] 本文使用的“靶细胞”是指表达靶抗原的细胞。

[0128] 贯穿本说明书和权利要求书, 对免疫球蛋白重链中残基的编号是Kabat中的EU索引: Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (191), 其明确地通过引用并入本文。“Kabat中的EU索引”是指人IgG1EU抗体中的残基编号。

[0129] 1. 包括IgG Fc构建体的异多聚体

[0130] 本文提供了具有降低的或沉默的效应子功能的异多聚体构建体。在一个实施方案中提供了一种异多聚体, 其包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体, 每个Fc多肽包括经修饰铰链区, 其中: 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括至少一个氨基酸修饰, 所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰, 并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

[0131] 本文提供了具有降低的或沉默的效应子功能的异多聚体构建体。在一个实施方案中提供了一种异多聚体, 所述异多聚体包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体, 每个Fc多肽包括经修饰下游铰链区, 其中: 所述第一Fc多肽的经修饰下游铰链区包括至少一个氨基酸修饰, 所述第二Fc多肽的经修饰下游铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰, 并且所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。在某些实施方案中, 与不具有本文所述修饰的相应母体IgG Fc构建体相比, 所述异多聚体构建体表现出可忽略的与Fc $\gamma$ 受体的结合。在一些实施方案中, 所述异多聚体构建体表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体的结合, 并且表现出可忽略的与至少一种Fc $\gamma$ 受体的结合。在某些实施方案中, 本文所述的异多聚体表现出降低的与Fc $\gamma$ 受体的结合并且表现出可忽略的与C1q蛋白的结合。

[0132] 本文提供了一种异多聚体, 所述异多聚体包括具有第一Fc多肽和第二Fc多肽的IgG Fc构建体, 每个Fc多肽包括经修饰铰链区, 其中: 所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括至少一个氨基酸修饰, 其在约生理pH条件下增加所述第一Fc多肽的经修饰铰链区中的净电荷, 并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰, 并且与相应母体IgG Fc构建体相比所述IgG Fc构建体表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。在一些实施方案中, 净电荷的增加是第一Fc多肽上净正电荷的增加。在一个实施方案中, 净正电荷的增加是第一Fc多肽上带正电荷的氨基酸总数的增加。在某些实施方案中, 所述净负电荷的增加是第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸总数的增加。在一个特定实施方案中, 净负电荷的增加是第一Fc多肽上带负电荷的氨基酸

总数的增加。在一些实施方案中,与不具有本文所述修饰的相应母体IgG Fc构建体相比,所述异多聚体构建体表现出可忽略的与Fc $\gamma$ 受体的结合。在一些特定实施方案中,所述异多聚体构建体表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体的结合,并且表现出可忽略的与至少一种Fc $\gamma$ 受体的结合。在一个实施方案中,本文所述的异多聚体表现出降低的与Fc $\gamma$ 受体的结合并且表现出可忽略的与C1q蛋白的结合。

[0133] 提供了包括IgG Fc构建体的异多聚体,所述IgG Fc构建体具有第一Fc多肽和第二Fc多肽,每个Fc多肽包括经修饰铰链区,其中:所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括一个或更多个氨基酸修饰,其增加所述第一Fc多肽的经修饰铰链区中的净电荷,其中所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰,并且其中所述IgG Fc构建体不与Fc $\gamma$ 受体或C1q蛋白结合。

[0134] 1.1 Fc区和铰链区

[0135] 所述异多聚体包括含有铰链区的IgG Fc构建体(Fc区)。抗体的Fc区通常包括两个多肽链,其中每一个都包含IgG重链多肽的C末端片段。因此,IgG Fc构建体具有两个Fc多肽,其各自源自IgG重链多肽并且包括介导与Fc $\gamma$ R、补体和FcRn以及铰链区结合的区域。

[0136] 在一个实施方案中,异多聚体包括源自人IgG重链多肽的IgG Fc构建体。多种人IgG重链多肽亚型是本领域中已知的,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在这些人IgG亚型中,已知IgG1、IgG2和IgG3激活补体,而IgG1和IgG3比IgG2和IgG4更有效地介导效应子功能ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)。在一个实施方案中,异多聚体包括来自人IgG1重链多肽的IgG Fc构建体。人IgG1重链的氨基酸序列是本领域中已知的(参见例如IMGT登记号J00228)。在一个实施方案中,异多聚体包括来自人IgG3重链多肽的IgG Fc构建体。人IgG3重链的氨基酸序列是本领域中已知的(参见例如IMGT登记号X03604)。在一个实施方案中,异多聚体包括来自人IgG4重链多肽的IgG Fc构建体。人IgG4重链的氨基酸序列是本领域中已知的(参见例如IMGT登记号K01316)。人IgG1Fc区(包括铰链区)的氨基酸序列示出在图5(SEQ ID NO:1)中。

[0137] 在另一个实施方案中,异多聚体可以包括来自IgG的同种异型的IgG Fc区。IgG同种异型是本领域中已知的(参见,例如Jefferies等(2009)Mabs1(4):332-338)。

[0138] 在一个实施方案中,IgG Fc区来源于具有治疗潜力的人源化单克隆抗体,选自:阿来组单抗(alemtuzumab)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿塞珠单抗(aselizumab)、阿特利珠单抗(atlizumab)、bapineuzumab、贝伐珠单抗(bevacizumab)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、坎妥珠单抗(cantuzumab)、西利珠单抗(cedelizumab)、聚乙二醇化塞妥珠单抗(certolizumab pegol)、cidfusituzumab、西妥珠单抗(cidtuzumab)、达利珠单抗(daclizumab)、依库珠单抗(eculizumab)、伊法珠单抗(efalizumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、非维珠单抗(felvizumab)、方托力珠单抗(fontolizumab)、吉妥珠单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)、伊珠单抗奥佐米星(inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗(ipilimumab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、林妥珠单抗(lintuzumab)、马妥珠单抗(matuzumab)、美泊利珠单抗(mepolizumab)、莫维珠单抗(motavizumab)、莫托维珠单抗(motovizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、诺维珠单抗(nolovizumab)、numavizumab、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、帕考珠单抗(pascolizumab)、

pecfusituzumab、培妥珠单抗(pectuzumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、培克珠单抗(pexelizumab)、ralivizumab、雷珠单抗(ranibizumab)、reslivizumab、瑞利珠单抗(reslizumab)、resyvizumab、罗维珠单抗(rovelizumab)、鲁利珠单抗(ruplizumab)、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、西利珠单抗(siplizumab)、松妥珠单抗(sontuzumab)、tacatuzumab tetraxetan、他度珠单抗(tadocizumab)、塔利珠单抗(talizumab)、特非珠单抗(tefibazumab)、托西利珠单抗(tocilizumab)、妥利珠单抗(toralizumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、图妥珠单抗西莫白介素(tucotuzumab celmoleukin)、tucusituzumab、umavizumab、乌珠单抗(urtoxazumab)和维西珠单抗(visilizumab)。

[0139] 在另一个实施方案中, IgG Fc区来源于治疗性抗体, 例如利妥昔单抗(rituximab)。

[0140] IgG Fc构建体的每个Fc蛋白包括含铰链区的IgG重链多肽的Fc区的至少一部分。IgG多肽的Fc区包括用于介导Fc区效应子功能的多种受体的结合位点。此类受体的实例包括Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIa。Fc区还包括与补体因子C1q蛋白结合的区域。

[0141] 人IgG1重链多肽的Fc区包括IgG1重链的氨基酸216-447(参见SEQ ID NO:2, 图5)。人IgG铰链区的长度和序列随IgG同种型而变化, 如下表1所示:

[0142] 表1: 人IgG铰链区氨基酸序列的比较

[0143]

IgG	长度	CH1	‘上游’铰链	‘核心’铰链	‘下游’铰链(CH2)
IgG1	15	VDKRV	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
IgG2	12	VDKTV	ELKCCVE	CPPCP	APPVAGP
IgG3	62	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP (EPKSCDIPPPCPRCP)x3	APELLGGP
IgG4	12	VDKRV	ESKYGPP	CPSCP	APELLGGP

[0144] IgG1多肽的铰链区包括氨基酸残基216至238, 而人IgG1多肽的下游铰链区包括氨基酸残基231至238。

[0145] 因此, 在一个实施方案中, IgG Fc构建体的每个Fc多肽包括人IgG1重链的氨基酸216至447, 其中所述第一Fc多肽包括在包含氨基酸残基216至238的铰链区中包括至少一个修饰, 并且所述第二Fc多肽包括在铰链区中包括不同于第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰。在另一个实施方案中, IgG Fc构建体的每个Fc多肽包括人IgG1重链的氨基酸231至447, 其中所述第一Fc多肽在包含氨基酸残基231至238的下游铰链区包括至少一个修饰, 并且所述第二Fc多肽在下游铰链区包括不同于第一Fc多肽的至少一个氨基酸修饰的至少一个氨基酸修饰。

[0146] 1.1.2经修饰铰链区中的氨基酸修饰

[0147] IgG Fc构建体的第一Fc多肽和第二Fc多肽包括经修饰铰链区, 所述经修饰铰链区被不对称地修饰以产生具有极大降低或消除的效应子功能的异多聚体。提及Fc多肽的术语“第一”和“第二”可互换使用, 只要每个IgG Fc构建体包括一个第一Fc多肽和一个第二Fc多肽即可。如将在下文中更详细描述, 以不对称的方式第一Fc多肽和第二Fc多肽中引入氨基酸修饰。

[0148] 下面的段落中描述了包括含核酸氨基酸修饰的第一Fc多肽和第二Fc多肽的异多



聚体。

[0149] 在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括L234至L235中的至少一处的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括选自L234K、L234R、L234A、L235K、L235R和L235A的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的所述至少一个还包括E233处的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中E233处的所述修饰选自E233A、E233K和E233R。在一些实施方案中是本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括L234和L235中的至少一处的氨基酸修饰。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中L234和L235中的至少一处的所述修饰选自L234A、L234K、L234R、L234D、L234E、L235K、L235R、L235E、L235A和L235D。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第二Fc多肽的经修饰铰链区还包括E233处的氨基酸修饰。在一个实施方案中,第一Fc多肽和第二Fc多肽包括选自E233A或E233D的氨基酸修饰。

[0150] 本文提供了本文所述的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235K、L234K/L235K、E233A/L234R/L235R、E233K/L234R/L235R、或E233K/L234A/L235K。在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽和第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235A、L234D/L235E、E233A/L234D/L235E、或E233A/L234K/L235A。

[0151] 本文提供了本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235K;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234A/L235A;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234K/L235K并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234R/L235R并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234D/L235E;第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰L234D/L235E;或者第一Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233K/L234A/L235K并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括氨基酸修饰E233A/L234K/L235A。

[0152] 在一些实施方案中,异多聚体包括含核心氨基酸修饰的第一多肽和第二多肽,并且包括以下的额外氨基酸修饰。因此,在一些实施方案中是本文提供的异多聚体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个还包括选自D265S、E269K、K322A、P329W和E333K的至少一个氨基酸修饰。例如,在一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/E233K。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/D265S并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/D265S。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰

E233K/L234R/L235R/K322A。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/P329W并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/P329W。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A。在另一个实施方案中是本文所述的异多聚体,其中第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。

[0153] 提供了本文所述的异多聚体,其中:第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/E233K;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/D265S并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰L234R/L235R/D265S;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/K322A;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/P329W并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/P329W;第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322A并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A;或者第一Fc多肽包括氨基酸修饰L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。

[0154] 第一Fc多肽

[0155] IgG Fc构建体的两个Fc多肽中的每一个均包括经修饰铰链区。第一Fc多肽的经修饰铰链区包括增加Fc多肽的经修饰铰链区的正电荷的一个或更多个氨基酸修饰。“增加多肽的经修饰铰链区的正电荷”意指具有一个或更多个氨基酸修饰的修饰铰链区具有比野生型未经修饰铰链区大的整体正电荷。第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于另一个Fc多肽的一个或更多个氨基酸修饰的一个或更多个氨基酸修饰。本文使用的不对称氨基酸修饰是指其中一个多肽(例如,“第一多肽”)的特定位置的氨基酸修饰不同于第二个多肽(例如,“第二多肽”)相同位置的氨基酸的任何修饰。这可能是对来自IgG Fc的第一多肽或第二多肽的两个氨基酸的仅一个修饰或两个氨基酸同时修饰成不同氨基酸的结果。

[0156] 例如,如果第一Fc多肽包括氨基酸修饰L235K,则不同的氨基酸修饰将包括铰链区中其他氨基酸(例如,L234或E233)的修饰,或者L235的除了L235K之外的修饰,例如L235A或L235D。因此,在一个实施方案中,第一Fc多肽的经修饰铰链区包括增加第一Fc多肽的经修饰铰链区的正电荷的一个或更多个氨基酸修饰,并且第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的两个或更多个氨基酸修饰的一个或更多个氨基酸修饰。在另一个实施方案中,所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括增加第一Fc多肽的经修饰铰链区的正电荷的两个或更多个氨基酸修饰,并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的一个或更多个氨基酸修饰的一个或更多个氨基酸修饰。在一个可选实施方案中,所述第一Fc多肽的经修饰铰链区包括增加第一Fc多肽的经修饰铰链区的正电荷的两个或更多个氨基酸修饰,并且所述第二Fc多肽的经修饰铰链区包括不同于所述第一Fc多肽的两个或更多个氨基酸修饰的两个或更多个氨基酸修饰。

[0157] 在一个实施方案中,当IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括一个氨基酸修饰时,进行所述氨基酸修饰以将具有带中性或负电荷的侧链的氨基酸置换成具有正电

荷的侧链的氨基酸。例如,可以将铰链区的L234或L235替换成Lys(K)、Orn(O)或Arg(R)。因此,在一些实施方案中,其中IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括一个氨基酸修饰,可以将人IgG1的下游铰链区的以下氨基酸残基替换成Lys、Orn或Arg:A231、P232、E233、L234、L235、G236、G237或P238。

[0158] 在第一Fc多肽的经修饰铰链区包括两个或更多个氨基酸修饰的实施方案中,修饰组合的整体结果是经修饰铰链区的正电荷的增加。这种正电荷的整体增加可能是由于将具有带负电荷的侧链或中性侧链的氨基酸替换成具有带正电荷的侧链或中性侧链的氨基酸的氨基酸修饰的组合。例如,在一个实施方案中,使IgG1IgG Fc构建体的第一Fc多肽的下游铰链区的正电荷增加的两个或更多个氨基酸修饰可以选自E233K、E233R、E233A、L234K、L234R、L234A、L235K、L235R和L235A,只要两个或更多个氨基酸修饰的组合使经修饰铰链区的正电荷增加即可。同样地,可以在铰链区中进行其他氨基酸修饰,只要其增加铰链区的正电荷即可。

[0159] 在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括L234或L235处的增加经修饰铰链区的正电荷的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括L234和L235处的增加经修饰铰链区的正电荷的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括L234、L235或E233处的增加经修饰铰链区的正电荷的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括L234和E233处的增加经修饰铰链区的正电荷的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括L235和E233处的增加经修饰铰链区的正电荷的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,IgG Fc构建体的第一Fc多肽的经修饰铰链区包括L234、L235和E233处的增加经修饰铰链区的正电荷的氨基酸修饰。

[0160] 在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第一Fc多肽包括含氨基酸修饰L234A/L235K、E233A/L234R/L235R、E233K/L234R/L235R、或E233K/L234A/L235K的经修饰铰链区。

[0161] 第二Fc多肽

[0162] 在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第二Fc多肽的经修饰铰链区包括一个或更多个氨基酸修饰,其不同于第一Fc多肽的氨基酸修饰,并且增加经修饰铰链区的负电荷或者相对于野生型铰链区是电中性的。“增加经修饰铰链区的负电荷”意指IgG Fc构建体的第二Fc多肽的具有一个或更多个氨基酸修饰的经修饰铰链区具有比野生型未经修饰的铰链区更大的整体负电荷。“电中性”意指与野生型铰链区相比,一个或更多个氨基酸修饰不导致IgG Fc构建体的第二Fc多肽的经修饰铰链区的整体电荷的改变。因此,IgG Fc构建体的第二多肽的氨基酸修饰包括将具有中性侧链的氨基酸替换成具有电负电荷的侧链、带正电荷的侧链或者不同的电中性侧链的氨基酸的氨基酸修饰,和/或将具有带负电荷的侧链的氨基酸替换成具有中性侧链的氨基酸的氨基酸修饰的组合。只要其导致经修饰铰链区的负电荷增加或者相对于野生型铰链区是电中性的,这些氨基酸修饰的组合就是合适的。

[0163] 在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第二Fc多肽包括L234或L235处的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,IgG Fc构建体的第二Fc多肽包括L234和L235处的氨基酸修饰。在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第二Fc多肽包括选自L234A、L234K、L234R、L234D、L234E、L235K、L235R、L235E、L235A和L235D的氨基酸修饰。

[0164] 在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第二Fc多肽包括L234和/或L235和E233处的

氨基酸修饰。在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第二Fc多肽包括选自L234A、L234K、L234R、L234D、L234E、L235K、L235R、L235E、L235A、L235D、E233A和E233D的氨基酸修饰。

[0165] 在一个实施方案中,IgG Fc构建体的第二Fc多肽的经修饰铰链区包括选自L234A/L235A、L234D/L235E、E233A/L234D/L235E、或E233A/L234K/L235A的氨基酸修饰。

[0166] 2.IgG Fc构建体的其他修饰

[0167] 在一些实施方案中,根据本发明的异多聚体包括下述额外的修饰。

[0168] 在本发明的一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体包括具有已经被进一步修饰以促进异二聚体Fc区形成的经修饰Fc多肽。这些进一步修饰的Fc多肽可用于在双特异性抗体的背景下产生异多聚体。在一个实施方案中,Fc多肽包括变体CH3结构域,其具有促进异二聚体Fc区形成的氨基酸修饰。合适的变体CH3结构域是本领域中已知的,包括例如国际专利公开No.WO 2012/058768和美国专利No.5,821,333、7,695,936中描述的那些。在一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的至少一个CH3氨基酸修饰T366L/N390R/K392M/T394W,并且另一个Fc多肽包括CH3氨基酸修饰L351Y/S400E/F405A/Y407V。

[0169] 用于修饰Fc多肽以促进异二聚体Fc形成的另外的方法描述在以下:国际专利公开No.WO 96/027011(突起入孔(knobs into holes)),Gunasekaran等(Gunasekaran K.等(2010)J Biol Chem.285,19637-46,静电设计以实现选择性异二聚化)、Davis等(Davis, JH.等(2010)Prot Eng Des Sel;23(4):195-202,标准交换工程结构域(exchange engineered domain,SEED)技术)和Moore等(2011)Mabs 3:6,546-557。

[0170] 在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体进一步包括促进异二聚体Fc形成的氨基酸修饰。异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体在每个Fc多肽的CH3区中进一步包括促进异二聚体Fc区形成的氨基酸修饰。

[0171] 在一些实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体进一步包括增加IgG Fc构建体的稳定性的氨基酸修饰,如通过CH2结构域的熔化温度确定的。合适的氨基酸修饰是本领域中已知的,且包括例如国际专利申请No.PCT/CA2012/050780中描述的那些。尤其地,在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体在第一Fc多肽和第二Fc多肽二者中包括氨基酸修饰T350V。

[0172] 提供了一种异多聚体,其包括具有第一Fc多肽和第二多肽的IgG Fc构建体,其中:所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰E269Q/D270N并且第二Fc多肽包括氨基酸修饰E269K/D270R;或者所述第一Fc多肽包括氨基酸修饰L235K/A327K并且第二Fc多肽在铰链区或下游铰链区不包括修饰;并且其中所述IgG Fc构建体与相应母体IgG Fc构建体相比表现出表现出降低的与所有Fc $\gamma$ 受体和C1q蛋白的结合。

[0173] 在一个实施方案中,Fc是IgG1Fc构建体,和IgG2Fc构建体、IgG3Fc构建体、或IgG4Fc构建体。

[0174] 在一些实施方案中,IgG Fc构建体包括至少一个CH3结构域,所述CH3结构域具有促进异二聚体Fc形成的至少一个氨基酸修饰且具有比得上野生型同二聚体Fc的稳定性。示性修饰描述在下文。在一些实施方案中,异二聚体Fc的二聚CH3结构域的通过差示扫描量热(DSC)测量的熔化温度(T<sub>m</sub>)为约68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、77.5°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C或85°C或更高。在一些实施方案中,二

聚Fc在产生时是以大于约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的纯度形成的异二聚体;或者,其中所述二聚体在表达时或通过单个细胞表达时以大于约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的纯度形成的异二聚体。

[0175] 在一些方面,Fc在至少一个C<sub>H3</sub>序列中包括一个或多个修饰。在一些方面,Fc在至少一个C<sub>H2</sub>序列中包括一个或多个修饰。

[0176] 在一些方面,Fc是2011年11月4日提交的专利申请PCT/CA2011/001238或者2012年11月2日提交的PCT/CA2012/050780中描述的Fc,为了所有目的,其各自的整个内容作为整体通过引用并入在此。

[0177] 在一些方面,本文所述的Fc构建体包括异二聚体Fc,所述异二聚体Fc包括已经被不对称修饰的经修饰CH3结构域。异二聚体Fc可以包括两个重链恒定结构域:第一重链多肽和第二重链多肽,其可互换使用,只要Fc包括一个第一重链多肽和一个第二重链多肽即可。通常,第一重链多肽包括第一CH3序列,第二重链多肽包括第二CH3序列。

[0178] 当两个CH3序列二聚化时,包括以不对称方式引入的一个或多个氨基酸修饰的两个CH3序列通常导致异二聚体Fc,而不是同二聚体。本文使用的“不对称氨基酸修饰”是指其中第一CH3序列上特定位置的氨基酸不同于第二CH3序列上相同位置的氨基酸并且第一CH3序列和第二CH3序列优选配对形成异二聚体而非同二聚体的任何修饰。这种异二聚化可以是修饰每个序列上各自相同氨基酸位置处的两个氨基酸中的仅一个;或者修饰在第一CH3序列和第二CH3序列上各自相同位置处每个序列上的两个氨基酸的结果。异二聚体Fc的第一CH3和第二Fc序列可包括一个或多个不对称氨基酸修饰。

[0179] 表X提供了人IgG1Fc序列的氨基酸序列,其对应于全长人IgG1重链的氨基酸231至447。CH3序列包括全长人IgG1重链的氨基酸341-447。通常,Fc包括能够二聚化的两个连续中重链序列(A和B)。在一些方面,Fc的一个或全部两个序列在使用EU编号的以下位置包括一个或多个突变或修饰:L351、F405、Y407、T366、K392、T394、T350、S400和/或N390。在一些方面,Fc包括表X中示出的突变序列。在一些方面,Fc包括变体1A-B的突变。在一些方面,Fc包括变体2A-B的突变。在一些方面,Fc包括变体3A-B的突变。在一些方面,Fc包括变体4A-B的突变。在一些方面,Fc包括变体5A-B的突变。

[0180] 表X:示例性Fc序列和CH3修饰

[0181]

人 IgG1 Fc 序列 231-447 (EU-编号)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRIPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:70)	
变体 IgG1 Fc 序列(231-447)	链	突变
1	A	L351Y F405A Y407V
1	B	T366L K392M T394W
2	A	L351Y F405A Y407V
2	B	T366L K392L T394W
3	A	T350V L351Y F405A Y407V
3	B	T350V T366L K392L T394W
4	A	T350V L351Y F405A Y407V
4	B	T350V T366L K392M T394W
5	A	T350V L351Y S400E F405A Y407V
5	B	T350V T366L N390R K392M T394W

[0182] 参考全长人IgG1重链的氨基酸231至447,第一CH3序列和第二CH3序列可以包括本文所述的氨基酸突变。在一个实施方案中,异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括在F405和Y407处具有氨基酸修饰的第一CH3序列,以及在T394处具有氨基酸修饰的第二CH3序列。在一个实施方案中,异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括具有选自L351Y、F405A和Y407V的一个或多个氨基酸修饰的第一CH3序列,以及具有选自T366L、T366I、K392L、K392M和T394W的一个或多个氨基酸修饰的第二CH3序列。

[0183] 在一个实施方案中,Fc构建体包括异二聚体Fc,所述异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括在位置L351、F405和Y407处具有氨基酸修饰的第一CH3序列和在位置T366、K392和T394处具有氨基酸修饰的第二CH3序列,第一CH3序列和第二CH3序列中的一个还包括位置Q347处的氨基酸修饰,另一个CH3序列还包括位置K360处的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括在位置L351、F405和Y407处具有氨基酸修饰的第一CH3序列和在位置T366、K392和T394处具有氨基酸修饰的第二CH3序列,第一CH3序列和第二CH3序列中的一个还包括位置Q347处的氨基酸修饰,另一个CH3序列还包括位置K360处的氨基酸修饰,并且所述CH3序列中的一个或两个还包括氨基酸修饰T350V。

[0184] 在一个实施方案中,本文提供的Fc构建体包括异二聚体Fc,所述异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括在位置L351、F405和Y407处具有氨基酸修饰的第一CH3结构域和在位置T366、K392和T394处具有氨基酸修饰的第二CH3结构域,并且第一CH3序列和第二CH3序列中的一个还包括氨基酸修饰D399R或D399K,另一个CH3序列还包括T411E、T411D、K409E、K409D、K392E和K392D中的一个或多个。在另一个实施方案中,异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括在位置L351、F405和Y407处具有氨基酸修饰的第一CH3序列和在位置T366、K392和T394处具有氨基酸修饰的第二CH3序列,第一CH3序列和第二CH3序列中的一个还包括氨基酸序列D399R或D399K,另一个CH3序列包括T411E、T411D、K409E、K409D、K392E和K392D中的一个或多个,并且所述CH3序列中的一个或全部两个还包括氨基酸修饰T350V。

[0185] 在一个实施方案中,异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括在位置L351、F405和Y407处具有氨基酸修饰的第一CH3序列和在位置T366、K392和T394处具有氨基酸修饰的第二CH3序列,其中所述CH3序列中的一个或全部两个还包括氨基酸修饰T350V。

[0186] 在一个实施方案中,异二聚体Fc包括经修饰CH3结构域,所述经修饰CH3结构域包括以下氨基酸修饰,其中“A”表示第一CH3序列的氨基酸修饰,“B”表示第二CH3序列的氨基酸修饰:A:L351Y\_F405A\_Y407V、B:T366L\_K392M\_T394W、A:L351Y\_F405A\_Y407V、B:T366L\_K392L\_T394W、A:T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V、B:T350V\_T366L\_K392L\_T394W、A:T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V、B:T350V\_T366L\_K392M\_T394W、A:T350V\_L351Y\_S400E\_F405A\_Y407V、和/或B:T350V\_T366L\_N390R\_K392M\_T394W。

[0187] 一个或更多个不对称氨基酸修饰可以促进异二聚体Fc的形成,其中异二聚体CH3结构域具有比得上野生型同二聚体CH3结构域的稳定性。在一个实施方案中,一个或更多个不对称氨基酸修饰促进异二聚体Fc结构域的形成,其中异二聚体Fc结构域具有比得上野生型同二聚体Fc结构域的稳定性。在一个实施方案中,一个或更多个不对称氨基酸修饰促进异二聚体Fc结构域的形成,其中异二聚体Fc结构域具有通过差示扫描量热中的熔化温度(T<sub>m</sub>)观察到的稳定性,并且其中所述熔化温度在相应对称野生型同二聚体Fc结构域观察到的熔化温度的4°C以内。在一些方面,Fc在至少一个CH<sub>3</sub>序列中包括一个或更多个修饰,所述修饰促进具有比得上野生型同二聚体Fc的稳定性异二聚体Fc的形成。

[0188] 在一个实施方案中,可以通过测量CH3结构域的熔化温度(例如,通过差示扫描量热(DSC))来评估CH3结构域的稳定性。因此,在另一个实施方案中,CH3结构域的熔化温度为约68°C或更高。在另一个实施方案中,CH3结构域的熔化温度为约70°C或更高。在另一个实施方案中,CH3结构域的熔化温度为约72°C或更高。在另一个实施方案中,CH3结构域的熔化温度为73°C或更高。在另一个实施方案中,CH3结构域的熔化温度为约75°C或更高。在另一个实施方案中,CH3结构域的熔化温度为约78°C或更高。在一些方面二聚CH<sub>3</sub>序列的熔化温度(T<sub>m</sub>)为约68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、77.5°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C或85°C或更高。

[0189] 在一些实施方案中是Fc构建体,所述Fc构建体包括进一步包含经修饰CH3序列的异二聚体Fc,其可以以与表达产物中的同二聚体Fc相比至少约75%的纯度形成。在另一个实施方案中,异二聚体Fc以大于约80%的纯度形成。在另一个实施方案中,异二聚体Fc以大于约85%的纯度形成。在另一个实施方案中,异二聚体Fc以大于约90%的纯度形成。在另一个实施方案中,异二聚体Fc以大于约95%的纯度形成。在另一个实施方案中,异二聚体Fc以大于约97%的纯度形成。在一些方面,Fc是在表达时以大于约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的纯度形成的异二聚体。在一些方面,Fc是在通过单细胞表达时以大于约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的纯度形成的异二聚体。

[0190] 用于修饰单体Fc多肽以促进异二聚体Fc形成的另外的方法描述在与以下:国际专利公开No. WO 96/027011(突起入孔),于Gunasekaran等(Gunasekaran K.等(2010)J Biol

Chem. 285, 19637-46, 静电设计以实现选择性异二聚化)、Davis等(Davis, JH.等(2010)Prot Eng Des Sel; 23(4):195-202, 标准交换工程结构域(SEED)技术)和Labrijn等[Efficient generation of stable bi-specific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Labrijn AF, Meesters JI, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van Berkel PH, van de Winkel JG, Schuurman J, Parren PW. Proc Natl Acad Sci USA. 2013年3月26日; 110(13):5145-50。

[0191] 3. 异多聚体的功能特征

[0192] 根据本发明的异多聚体表现出大幅降低/消除的与Fc $\gamma$ R和C1q的结合。此外,在某些实施方案中,异多聚体还表现出额外的期望性质,例如稳定性、与FcRn结合的能力以及有利于从不期望产物或杂质纯化期望表达产物的性质。

[0193] 在一个实施方案中,本发明设想了包括IgG Fc构建体的异多聚体,其并不与Fc $\gamma$ R受体可测量地结合,但是与FcRn结合,这使得其成为用于此类应用的期望候选:其中体内抗体半衰期是重要的,而效应子功能(例如,CDC、ADCP和ADCC)是不必要的或有害的。

[0194] 用于确定包括IgG Fc构建体的异多聚体与Fc $\gamma$ R或C1q结合的能力的方法是本领域中已知的,并且描述在本文的别处。

[0195] 3a. 降低的/消除的与Fc $\gamma$ R或补体的结合

[0196] 与母体多肽相比,根据本发明的异多聚体表现出降低的/消除的与Fc $\gamma$ R和C1q的结合。在一个实施方案中,根据本发明的异多聚体对于Fc $\gamma$ R和C1q的K<sub>D</sub>比母体多肽的K<sub>D</sub>高至少5倍。在另一个实施方案中,根据本发明的异多聚体对于Fc $\gamma$ R和C1q的K<sub>D</sub>比母体多肽的K<sub>D</sub>高至少10倍,如通过本领域中已知的结合测定测量的。本领域中已知的结合测定包括但不限于基于FRET(荧光共振能量转移)和BRET(生物发光共振能量转移)的测量、AlphaScreen™(放大发光临近均相测定(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay))、闪烁亲近测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、SPR(表面等离子体共振,也称为Biacore™)、等温滴定量热法、差示扫描量热法、凝胶电泳和色谱法,包括凝胶过滤。这些和其他方法可以利用抗体的一些融合伴侣或标记。可以使用多种检测方法进行测定,包括但不限于生色、荧光、冷光或同位素标记。

[0197] 在一个实施方案中,包括IgG Fc构建体的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIIaH的K<sub>D</sub>大于5 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIaR的K<sub>D</sub>大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIb的K<sub>D</sub>大于30 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaF的K<sub>D</sub>大于20 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaV的K<sub>D</sub>大于6 $\mu$ M,并且对于Fc $\gamma$ RIa的K<sub>D</sub>大于6.5nM,如通过表面等离子体共振(SPR)测量的。在另一个实施方案中,包括IgG Fc构建体的异多聚体对于Fc $\gamma$ RIIaH的K<sub>D</sub>大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIaR的K<sub>D</sub>大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIb的K<sub>D</sub>大于10 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaF的K<sub>D</sub>大于6 $\mu$ M,对于Fc $\gamma$ RIIIaV的K<sub>D</sub>大于6 $\mu$ M,并且对于Fc $\gamma$ RIa的K<sub>D</sub>大于30nM,且不结合于C1q,如通过表面等离子体共振(SPR)测量的。

[0198] 在一个实施方案中,包括IgG Fc构建体的异多聚体不表现出可检测水平的ADCC、ADCP和CDC,如通过标准测定测量的。测试效应子功能的标准测定的非限制性实例包括本文提供的实施例中描述的那些。

[0199] 3b. 稳定性

[0200] 使用多种本领域中已知的方法来评估异多聚体的生物物理性质,包括例如稳定性。可以通过测量折叠状态和展开状态之间的热力学平衡来确定蛋白质稳定性。例如,可以



使用化学变形剂、热或pH展开本发明的异多聚体,这种转变可以使用包括但不限于圆二色谱、荧光光谱、吸收光谱、NMR光谱、量热法和蛋白酶解的方法来监测。本领域技术人员将理解的,还可以使用这些和其他技术来监测折叠和展开转变的动力学参数。可以使用多种本领域方法来定量或定性地测定异多聚体的溶解度和整体结构完整性。

[0201] 可用于表征异多聚体的生物物理性质的方法包括凝胶电泳、等电位聚焦、毛细管电泳、色谱法(例如尺寸排阻色谱、离子交换色谱和反相高效液相色谱)、肽作图、寡糖作图、质谱法、紫外吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱、等温滴定量热法、差示扫描量热法、分析超速离心分离、动态光散射、蛋白酶解和交联、浊度测定、过滤器阻滞测定(filter retardation assay)、免疫学测定、荧光染料结合测定、蛋白质染色测定、显微镜检查以及通过ELISA或其他结合测定对聚集物的检测。采用X射线结晶技术和NMR光谱的结构分析也可有用。在一个实施方案中,可以在一些确定的时间段后通过测定蛋白质溶液的量来测量稳定和/或溶解度。在这种测定中,蛋白质可以暴露于或不暴露于一些极端条件,例如升高的温度、低pH或者存在变性剂。由于功能通常需要稳定、可溶和/或良好折叠/结构化的蛋白质,所以前述功能和结合测定还提供了进行这些测量的方法。例如,可以测定包含异多聚体的溶液与靶抗原结合的能力,然后暴露于升高的温度一个或更多个确定的时间段,然后再次测定抗原结合。由于预期展开的和聚集的蛋白质不能结合抗原,剩余活性量提供了对抗体的能力和溶解度的测量。

[0202] 在一个实施方案中,包括IgG Fc构建体的异多聚体是稳定的,如通过包括IgG Fc构建体的异多聚体的一个或更多个结构域的熔化温度测量的。可以根据本领域中已知的并且描述在描写描述在本文别处的方法来测定异多聚体的熔化温度。例如,可以通过差示扫描量热法(DSC)和所产生的异多聚体的热谱图来测定异多聚体的熔化温度。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体在热谱图中的熔化起点大于或等于65°C。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体在热谱图中的熔化起点大于或等于66°C。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体在热谱图中的熔化起点大于或等于68°C。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体在热谱图中的熔化起点大于或等于70°C。

[0203] 在另一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体具有CH2结构域,所述CH2结构域的熔化温度大于或等于母体多肽或抗体的CH2结构域的熔化温度。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体具有CH2结构域,所述CH2结构域的熔化温度比母体CH2结构域的熔化温度高约1°C至2°C。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体具有CH2结构域,所述CH2结构域的熔化温度比母体CH2结构域的熔化温度高约2°C至3°C。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体具有CH2结构域,所述CH2结构域的熔化温度比母体CH2结构域的熔化温度高约1°C至2°C,其中所述异多聚体包括由AAC4和AAC5例证的氨基酸修饰。在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体具有CH2结构域,所述CH2结构域的熔化温度比母体CH2结构域的熔化温度高约2°C至3°C,其中异多聚体包括由氨基酸修饰AAC2、AAC9、AAC10、AAC11、AAC12、AAC13、AAC14和AAC15例证的氨基酸修饰。在另一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,其中IgG Fc构建体具有CH2结构域,所述CH2结构域的熔化温度比母体CH2结构域的熔化温度高约4°C,其中所述异多聚体包括由AAC6例证的氨基酸修

饰。

[0204] 3c.FcRn结合

[0205] 如本领域中已知的,与FcRn的结合使被内吞的抗体从核内体中再循环到了血流中(Raghavan等,1996,Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220;Ghetie等,2000,Annu Rev Immunol 18:739-766)。这个过程,加上全长分子的大尺寸导致阻止肾过滤,得到了一至三周的有利的抗体血清半衰期。Fc与FcRn的结合在抗体运输中也具有重要作用。因此,在一个实施方案中,本发明的异多聚体能够与FcRn结合。

[0206] 4.异多聚体的形式

[0207] 4a.抗原结合结构域

[0208] 在一个实施方案中,根据本发明的异多聚体仅由IgG Fc构建体组成。在另一些实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体和一个或多个抗原结合结构域。在一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体和一个抗原结合结构域。在另一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体和两个抗原结合结构域。在另一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体和三个抗原结合结构域。在另一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体和四个抗原结合结构域。在另一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体和至多六个抗原结合结构域。

[0209] 抗原结合结构域可以根据本领域中的方法与IgG Fc构建体融合。

[0210] 在一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体包括至少一个抗原结合结构,其中所述至少一个抗原结合结构域选自Fab片段、scFv、sdAb、抗原结合肽、Fc融合蛋白或者能够与抗原结合的蛋白质结构域。

[0211] 在一个实施方案中,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体包括至少一个抗原结合结构,其中所述至少一个抗原结合结构域与选自以下的靶抗原结合:IL-2R的 $\alpha$ -链(CD25)、淀粉样蛋白 $\beta$ 、EpCAM、CD3、BLyS(或BAFF)、CD11a、CD20、CD22、CD23、CD3、CD4、CD52、CD80、CTLA-4、EGFR、RSV的F蛋白、G250、糖蛋白IIb/IIIa R、HER2、HER2/neu受体、Hsp90、IgE抗体、IL-12/IL-23、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-6受体、整合素 $\alpha$ -4/ $\beta$ -1、粘蛋白16/CA-125、RAN L、TNF $\alpha$ 、VEGF-A以及其他治疗上有益的靶标。

[0212] 在一个实施方案中,异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体具有第一Fc多肽和第二Fc多肽,每个Fc多肽包括经修饰铰链区,其中所述异多聚体来源于具有治疗潜力的人源化单克隆抗体,选自:阿来组单抗、阿泊珠单抗、阿塞珠单抗、阿特利珠单抗、bapineuzumab、贝伐珠单抗、比伐珠单抗、坎妥珠单抗、西利珠单抗、聚乙二醇化塞妥珠单抗、cidfusituzumab、西妥珠单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、伊法珠单抗、依帕珠单抗、厄利珠单抗、非维珠单抗、方托力珠单抗、吉妥珠单抗奥佐米星、伊珠单抗奥佐米星、伊匹单抗、拉贝珠单抗、林妥珠单抗、马妥珠单抗、美泊利珠单抗、莫维珠单抗、莫托维珠单抗、那他珠单抗、尼妥珠单抗、诺维珠单抗、numavizumab、奥瑞珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕考珠单抗、pecfusituzumab、培妥珠单抗、帕妥珠单抗、培克珠单抗、ralivizumab、雷珠单抗、reslivizumab、瑞利珠单抗、resyvizumab、罗维珠单抗、鲁利珠单抗、西罗珠单抗、西利珠单抗、松妥珠单抗、tacatuzumab tetraxetan、他度珠单抗、塔利珠单抗、特非珠单抗、托西利珠单抗、妥利珠单抗、曲妥珠单抗、图妥珠单抗西莫白介素、tucusituzumab、umavizumab、乌珠单抗和维西珠单抗。

[0213] 在另一个实施方案中,异多聚体包括来源于治疗性抗体例如利妥昔单抗或曲妥珠单抗的IgG Fc构建体。

[0214] 4b. 抗体-药物缀合物

[0215] 还设想了,根据本发明的异多聚体可以包括与IgG Fc构建体和/或异多聚体的其他结构域连接的一个或更多个毒性药物分子。毒性药物分子包括抑制或阻止细胞功能和/或造成细胞的破坏的物质。在一个实施方案中,一个或更多个毒性药物分子可以与包括IgG Fc构建体的异多聚体连接。在另一个实施方案中,一个或更多个毒性药物分子可以与包括IgG Fc构建体和至少一个抗原结合结构域的异多聚体连接。可以与IgG Fc构建体连接的合适的毒性药物分子选自放射性同位素(例如,At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>和Lu的放射性同位素)、化学治疗剂以及毒素,例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。

[0216] 可以与IgG Fc构建体连接的合适的化学治疗剂选自:烷化剂,例如塞替派和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,例如苄替哌(benzodepa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺类(methylamelamine),包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯(acetogenins)(特别是布拉它辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone)); $\delta$ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚、MARINOL®); $\beta$ -拉帕酮;拉帕醇;秋水仙碱;桦木酸;喜树碱(包括合成类似物拓扑替康(HYCAMT IN®)、CPT-11(伊立替康、CAMPTOSAR®)、乙酰基喜树碱和9-氨基喜树碱);苔藓抑素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);鬼臼霉素(足叶草毒素;足叶草酸;替尼泊苷;隐藻素(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8);尾海兔素;多卡米星(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥类,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,例如烯二炔抗生素(例如,加利车霉素,特别是加利车霉素 $\gamma$  II和加利车霉素 $\omega$  II(参见例如Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;埃斯波霉素(esperamicin);以及新抑癌蛋白发色团和相关色蛋白烯二炔抗菌素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素(cactinomycin)、卡柔比星(carubicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素、色霉素(chromomycinis)、更生霉素、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(包括ADRIAMYCIN®、吗啉代阿霉素、氰基吗啉代阿霉素、2-吡咯啉基-阿霉素、阿霉素HCl脂质体注射剂(DOXIL®)、和去氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、甲基丝

裂霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星;抗代谢物,例如甲氨蝶呤、吉西他滨(GEMZAR®)、替加氟(UFTORAL®)、卡培他滨(XELODA®)、埃博霉素和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如环胞苷、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、依诺他宾、氟尿苷;雌激素,例如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺(anti-adrenal),例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;恩尿嘧啶;安丫啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺;地吡醌(diaziquone);依福密辛(elformithine);依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登素类化合物(maytansinoids),例如美登素和安丝菌素;米托胍脞;米托蒽醌;莫哌达醇(mopidanmol);nitraerine;喷司他丁;蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星;洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg.);雷佐生(razoxane);利索新(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)(特别是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦;长春地辛(ELDISINE®、FILDESIN®);达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");塞替派;紫杉烷类,例如,紫杉醇(TAXOL®)、紫杉醇的白蛋白工程纳米颗粒制剂(ABRAXANE™)和多烯紫杉醇(doxetaxel)(TAXOTERE®);苯丁酸氮芥(chloranbucil);6-巯基嘌呤;硫基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱(VELBAN®);铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(ONCOVIN®);奥沙利铂;甲酰四氢叶酸(leucovovin);长春瑞滨(NAVELBINE®);米托蒽醌;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;伊班膦酸盐(ibandronate);拓朴异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醇类,例如视黄酸;上述任意物质的药学上可接受的盐或衍生物;以及两种或更多种上述物质的组合,例如CHOP,为环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和波尼松龙的联合疗法的缩写,以及FOLFOX,为利用与5-FU和甲酰四氢叶酸组合的奥沙利铂(ELOXATIN™)的治疗方案的缩写。

[0217] 4c. 异源肽和多肽

[0218] 还设想了根据本发明的异多聚体包括与一个或更多个异源肽或多肽连接的IgG Fc构建体。一个或更多个异源肽或多肽选自例如可检测标记、配体-受体对的成员、酶-底物的成员以及荧光共振能量转移对的成员。

[0219] 5. 制备和纯化异多聚体的方法

[0220] 如本文所述,根据本发明的异多聚体包括IgG Fc构建体,所述IgG Fc构建体包含第一Fc多肽和第二Fc多肽。无论是在其中异构构建体只包括IgG Fc区的实施方案中,还是在其中异构构建体还包括一个或更多个抗原结合结构域或异源多肽的实施方案中,两个Fc多肽均可以使用本领域中已知的重组DNA技术容易地制备。设计编码此类分子的核酸在本领域

技术人员的常识之内。可以将标准技术如以下文献中描述的那些用于重组核酸方法、核酸合成、细胞培养、转基因并入和重组蛋白质表达: Sambrook和Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 第3版, 2001); Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 第2版, 1989); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等, John Wiley and Sons, New York, 第4版, 1999); 以及 Glick和Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 第2版, 1998)。

[0221] 如在本文别处指出的, 来源于IgG重链的Fc多肽的核酸和氨基酸序列是本领域技术人员已知的, 并且可以使用核酸和/或蛋白质测序方法容易地确定。在基因上将本文所述异源蛋白质或毒性药物分子与Fc多肽融合的方法是本领域中已知的, 一些描述在下文和实施例中。

[0222] 适合于表达Fc多肽以及需要时的多肽编码抗原结合结构域的的表达载体和宿主细胞也是本领域中周知的, 如下文所述。

[0223] 5.1载体和宿主细胞

[0224] 异多聚体多肽的重组表达需要构建包含编码必要多肽的多核苷酸的表达载体。一旦获得了编码多肽的多核苷酸, 可以使用本领域中周知的技术通过重组DNA技术来产生用于产生多肽的载体。因此, 本文描述了通过表达包含多肽编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。本领域技术人员周知的方法可用于构建包含多肽编码序列和合适的转录和反义控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。因此, 本发明提供了可复制载体, 其包含与启动子可操作地连接的编码异多聚体多肽的核苷酸序列。

[0225] 通过重组技术将表达载体转移到宿主细胞, 然后通过常规技术培养转染细胞以产生用于本发明方法的多肽。在一些特定实施方案中, 如下文所述, 用于所述方法的多肽在宿主细胞中共表达以表达完整免疫球蛋白。

[0226] 多种宿主表达载体系统可用于表达多肽。此类宿主表达系统代表了可以用于产生并且随后纯化关注的编码序列的载体, 但是代表了当用合适的核酸编码序列转化或转染时在原位表达多肽的细胞。这些包括但不限于微生物, 例如用包含多肽编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如, 大肠杆菌(*E. coli*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)); 包含经修饰重链和轻链编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如, 酵母属毕赤酵母); 用包含多肽编码序列的重组病毒表达载体(例如, 杆状病毒)转染的昆虫细胞系统; 用包含多肽编码序列的重组病毒表达载体(例如, 花椰菜花叶病毒CaMV; 烟草花叶病毒TMV)或者重组脂质表达载体(例如Ti质粒)感染的植物细胞; 或者具有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如, COS、CHO、BHK、HEK-293、NS0和3T3细胞), 所述重组表达构建体包含来源于哺乳动物细胞基因组的启动子(例如, 金属硫蛋白启动子)或来源于哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子; 痘苗病毒7.5K启动子)。在某些实施方案中, 使用细菌细胞例如大肠杆菌或真核细胞来表达为重组抗体或融合蛋白分子的多肽。例如, 哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)以及来自人巨噬细胞的载体如主要介导早期基因启动子元件是用于抗体的有效表达系统(Foecking等, 1986, *Gene* 45:101; 和Cockett等, 1990,

Bio/Technology 8:2)。在一个特定实施方案中,编码每个异二聚体的免疫蛋白中重链和轻链的核酸序列的表达通过组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0227] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用多种基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,关注的经修饰重链和轻链编码序列可以与腺病毒转录/翻译控制复合物如晚期启动子和三联前导序列连接。然后通过体外或体内重组将这种嵌合基因插入到腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区(例如,E1或E3区)将得到活的能够在被感染宿主中表达的重组病毒(例如,参见Logan&Shenk,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359)。还可能需要特定的起始信号以用于有效翻译插入的抗体编码序列。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必需在与期望编码序列的阅读框同相以确保整个插入序列的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以来自多种来源,包括天然和合成。可以通过引入合适的转录增强元件、转录终止子等来增强有效表达(参见,例如Bittner等,1987,Methods in Enzymol.153:516-544)。

[0228] 异源多聚体肽的表达可以通过本领域中已知的任何启动子或增强子序列来控制。可用于控制编码多肽的基因的表达的启动子包括但不限于:SV40早期启动子区(Bernoist和Chambon,1981,Nature 290:304-310)、劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复中包含的启动子(Yamamoto,等,1980,Cell 22:787-797)、疱疹胸苷激酶启动子(Wagner等,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445)、金属硫蛋白基因的调控序列(Brinster等,1982,Nature 296:39-42)、四环素(Tet)启动子(Gossen等,1995,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:5547-5551);原核表达载体如 $\beta$ -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff等,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.75:3727-3731),或者tac启动子(DeBoer等,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:21-25;还参见"Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American,1980,242:74-94);包含胭脂碱合成酶启动子区的植物表达载体(Herrera-Estrella等,Nature 303:209-213或者花椰菜花叶病毒35S RNA启动子(Gardner等,1981,Nucl.Acids Res.9:2871),以及光合作用酶核酮糖二磷酸羧化酶的启动子(Herrera-Estrella等,1984,Nature 310:115-120);来自酵母或其他真菌的启动子元件,例如Gal 4启动子、ADC(醇脱氢酶)启动子、PGK(磷酸甘油激酶)启动子、碱性磷酸酶启动子以及以下的动物转录控制区,其表现出组织特异性并且已经被用于转基因动物:弹性蛋白酶I基因控制区,其在胰腺泡细胞中活跃(Swift等,1984,Cell 38:639-646;Ornitz等,1986,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.50:399-409;MacDonald,1987,Hepatology 7:425-515);胰岛素基因控制区,其在胰岛 $\beta$ 细胞中活跃(Hanahan,1985,Nature 315:115-122);免疫球蛋白控制区,其在淋巴样细胞中活跃(Grosschedl等,1984,Cell 38:647-658;Adames等,1985,Nature 318:533-538;Alexander等,1987,Mol.Cell.Biol.7:1436-1444)、小鼠乳腺肿瘤病毒控制区,其在睾丸细胞、乳房细胞、淋巴样细胞和肥大细胞中活跃(Leder等,1986,Cell 45:485-495);白蛋白基因控制区,其在肝脏中活跃(Pinkert等,1987,Genes and Devel.1:268-276); $\alpha$ -甲胎蛋白基因控制区,其在肝脏中活跃(Krumlauf等,1985,Mol.Cell.Biol.5:1639-1648;Hammer等,1987,Science 235:53-58); $\alpha$  1-抗胰蛋白酶基因控制区,其在肝脏中活跃(Kelsey等,1987,Genes and Devel.1:161-171); $\beta$ -珠蛋白基因控制区,其在骨髓细胞中活跃(Mogram等,1985,Nature 315:338-340;Kollias等,1986,Cell 46:89-94);髓鞘碱性蛋白基因控制区,其在脑的少突

细胞中活跃(Readhead等,1987,Cell 48:703-712);肌球蛋白轻链-2基因控制区,其在骨骼肌中活跃(Sani,1985,Nature 314:283-286);神经元特异性烯醇化酶(NSE),其在神经元细胞中活跃(Morelli等,1999,Gen.Virol.80:571-83);脑源性神经营养因子(BDNF)基因控制区,其在神经细胞中活跃(Tabuchi等,1998,Biochem.Biophysic.Res.Com.253:818-823);胶质纤维酸性蛋白(GFAP)启动子,其在星形细胞中活跃(Gomes等,1999,Braz J Med Biol Res 32(5):619-631;Morelli等,1999,Gen.Virol.80:571-83)以及促性腺释放激素基因控制区,其在下丘脑中活跃(Mason等,1986,Science 234:1372-1378)。

[0229] 此外,可以选择调节插入序列的表达或者以特定期望方式修饰或处理基因产物的宿主细胞株。可以在某些诱导物的存在下提高某些启动子的表达,因此可以控制基因工程融合蛋白的表达。此外,不同宿主细胞具有用于翻译和翻译后加工和修饰(例如,蛋白质的糖基化、磷酸化)的特性和特定机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保对表达的外源蛋白质的期望的修饰和加工。例如,细菌系统中的表达将产生未糖基化的产物,酵母细胞中的表达产生糖基化产物。可以使用具有用于对初级转录物进行适当加工(例如,糖基化和磷酸化)的细胞机器的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、HEK-293、3T3、WI38、NS0,并且特别是神经元细胞系,例如SK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZ人成神经细胞瘤(Sugimoto等,1984,J.Natl.Cancer Inst.73:51-57)、SK-N-SH人成神经细胞瘤(Biochim.Biophys.Acta,1982,704:450-460)、Daoy人小脑成神经管细胞瘤(He等,1992,Cancer Res.52:1144-1148)、DBTRG-05MG成胶质细胞瘤(Kruse等,1992,In Vitro Cell.Dev.Biol.28A:609-614)、IMR-32人成神经细胞瘤(Cancer Res.,1970,30:2110-2118)、1321N1人星形细胞瘤(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1977,74:4816)、MOG-G-CCM人星形细胞瘤(Br.J.Cancer,1984,49:269)、U87MG人成胶质细胞瘤星形细胞瘤(Acta Pathol.Microbiol.Scand.,1968,74:465-486)、A172人成胶质细胞瘤(Olopade等,1992,Cancer Res.52:2523-2529)、C6大鼠神经胶质瘤(Benda等,1968,Science 161:370-371)、Neuro-2a小鼠成神经细胞瘤(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1970,65:129-136)、NB41A3小鼠成神经细胞瘤(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1962,48:1184-1190)、SCP绵羊脉络丛(Bolin等,1994,J.Virol.Methods 48:211-221)、G355-5、PG-4猫正常星形胶质细胞(Haapala等,1985,J.Virol.53:827-833)、Mpf雪貂脑(Trowbridge等,1982,In Vitro 18:952-960),以及正常细胞系,例如CTX TNA2大鼠正常皮质脑(Radany等,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:6467-6471),例如CRL7030和Hs578Bst。此外,不同载体/宿主细胞可以不同长度地影响加工反应。

[0230] 为了长期高产率地产生重组蛋白质,通常优选稳定的表达。例如,可以改造稳定表达本发明多肽(例如,抗体或融合蛋白)的细胞系。不是使用包含病毒复制起点的表达载体,可以利用由合适的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)和选择标记控制的DNA转化宿主细胞。在引入外源DNA后,可以允许工程细胞在富集培养基中生长1至2天,然后换成选择培养基。重组质粒中的选择标记赋予对选择的抗性并且允许细胞将质粒稳定整合到染色体中并且生长以形成基因座,其然后可以被克隆并且扩增到细胞系中。

[0231] 可以使用许多选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等,1977,Cell 11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(Szybalska&Szybalski,1962,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:2026)和腺嘌呤转磷酸核糖基酶(Lowy等,1980,Cell 22:817)基因,其可以分别使用在tk<sup>-</sup>、hgprt<sup>-</sup>或aprt<sup>-</sup>细胞中。另外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其孵育对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等,1980,Natl.Acad.Sci.USA 77:3567;O'Hare等,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(Colberre-Garapin等,1981,J.Mol.Biol.150:1);以及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等,1984,Gene 30:147)。

[0232] 制备抗体-药物缀合物的方法是本领域中已知的,其描述见于美国专利公开No.2011/0200596中。

[0233] 5.2异多聚体的纯化

[0234] 当使用重组技术时,异多聚体可以在细胞内产生,或者直接分泌到培养基中。如果异多聚体在细胞产生,作为第一步,除去宿主细胞或裂解碎片的微小碎片,例如通过离心分离或超滤进行。当异多聚体被分泌到培养基中时,通常首先是使用市售蛋白质浓缩滤器(例如,Amicon或Millipore Pellicon超滤装置)来浓缩来自此类表达系统的混悬液。可以在前述任何步骤中引入蛋白酶抑制剂例如PMSF以抑制蛋白酶解,并且可以引入抗生素以阻止外来污染物生长。

[0235] 可以使用例如羟磷灰石、色谱法、凝胶电泳、透析和亲和色谱纯化由这些细胞制备的异多聚体组合物,其中亲和色谱是优选的纯化技术。A蛋白作为亲和配体的适宜性取决于异多聚体中存在的任何免疫球蛋白Fc区的种类和同种型。A蛋白可用于纯化基于人 $\gamma$ 1、 $\gamma$ 2或 $\gamma$ 4重链的抗体(Lindmark等,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。G蛋白被推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma$ 3(Guss等,EMBO J.5:15671575(1986))。亲和配体所附接的基质最常见的是琼脂糖,但是其他基质也是可以的。机械上稳定的基质如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯允许比琼脂糖取得更快的流速和更短的处理时间。当异多聚体包括CH3结构域时,Bakerbond ABX<sup>TM</sup>树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。根据待回收的异多聚体,其他用于蛋白质纯化的技术例如在离子交换柱上分馏、醇沉淀、反相HPLC、硅胶上的色谱、肝素SEPHAROSE<sup>TM</sup>上的色谱、阳离子或阴离子交换树脂上的色谱(例如,聚天冬氨酸柱)、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀也是可用的。

[0236] 在任何初步纯化步骤之后,可以使用约2.5-4.5的pH的洗脱缓冲液对包含关注的异多聚体和污染物的混合物进行低pH疏水作用色谱,优选地在低盐浓度(例如,约0-0.25M盐)下进行。

[0237] 本发明的异多聚体在IgG Fc构建体的第一Fc多肽和第二Fc多肽中包括不对称氨基酸修饰。因此,由于Fc多肽的固有特性,当Fc多肽一起表达时,得到的产物将包括第一Fc多肽的同二聚体、第二Fc多肽的同二聚体以及第一Fc多肽和第二Fc多肽的异二聚体。

[0238] 在一个实施方案中,在表达后纯化和分离异多聚体。表达方法描述在本文的别处。可以用多种本领域技术人员已知的方法分离和纯化蛋白质。标准纯化方法包括色谱技术,包括离子交换色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、尺寸排阻色谱或凝胶过滤,以及使用系统例如FPLC和HPLC在大气压力或高压下进行的反向色谱。纯化方法还包括电泳、免疫、沉淀、透析和层析聚焦技术。结合蛋白质浓度的超滤和透析技术也很有用。如本领域中周知的,多种天然蛋白质与Fc和抗体结合,这些蛋白质可用于本发明异多聚体的纯化。例如,细



菌蛋白A和G与Fc区结合。同样地,细菌蛋白L与一些抗体的Fab区结合,当然所述抗体的靶抗原也是如此。纯化通常可以通过特定融合伴侣进行。例如,如果使用GST融合,则可以使用谷胱甘肽树脂来纯化抗体,如果使用His-tag,则使用Ni<sup>2+</sup>亲和色谱,或者如果使用flag-tag,则使用固定的抗flag抗体。对于合适的纯化技术的一般指南,参见例如,Protein Purification:Principles and Practice,第3版,Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994,其通过引用整体并入本文。必要的纯化程度将根据抗体的筛选或用途而变化。在一些实施方案中,不需要进行纯化。例如,在一个实施方案中,如果分泌抗体,则可以筛选可以直接从培养基中进行。如本领域中周知的,一些选择方法并不涉及蛋白质的纯化。因此,例如,如果将抗体文库制备在噬菌体展示文库中,则可以不使用蛋白质纯化。

[0239] 因此,在一个实施方案中,包括IgG Fc构建体的异多聚体,当表达所述IgG Fc构建体时,得到具有同二聚体Fc区的IgG Fc构建体和具有异二聚体Fc区的IgG Fc构建体的混合物,使用基于电荷的纯化方法(例如,离子交换色谱)清楚地解析具有同二聚体Fc区的IgG Fc构建体和具有异二聚体Fc区的IgG Fc构建体。

[0240] 在一个实施方案中,本文所述包括IgG Fc构建体的异多聚体还可以包括变体CH3区,所述变体CH3区包括促进异二聚体Fc区形成而非同二聚体Fc区形成的氨基酸修饰。这些异多聚体的表达可以产生具有同二聚体Fc区和异二聚体Fc区的异多聚体的混合物。可以使用上文指出的基于电荷的纯化方法解析此类混合物。示例性的可以该方式纯化的变体包括AAC3、AAC4和AAC5。

[0241] 6. 异多聚体的测试

[0242] 6.1 Fc $\gamma$ R、FcRn和C1q结合

[0243] 在某些实施方案中,测量产生的免疫球蛋白的Fc活性以确保仅保持期望的特性。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消除。评估效应子功能的方法描述在Jiang等(2011)Nature Reviews Drug Discovery 10:101-111中。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保异多聚体缺少Fc $\gamma$ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留了FcRn结合能力。用于介导ADCC、NK细胞的原代细胞仅表达Fc $\gamma$ R1III,而单核细胞表达Fc $\gamma$ R1、Fc $\gamma$ R2和Fc $\gamma$ R3。造血细胞上表达的FcR概括在Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)第464页的表3中。评估所关注的分子的ADCC活性的体外测定的实例描述在美国专利No. 5,500,362或5,821,337中。可用于这种测定的效应子细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。或者或另外,可以在体内评估所关注的分子的ADCC活性,例如在以下文献中观察的动物模型中:Clynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)。也可以进行C1q结合测定以确认异多聚体不能与C1q结合并因此缺少CDC活性。为了评估补体激活,可以进行CDC测定,例如Gazzano-Santoro等,J. Immunol. Methods 202:163(1996)中描述的。也可以使用本领域中的已知方法进行FcRn结合以及体内清除/半衰期测定。

[0244] 还可以通过表面等离子体共振(SPR)或基于ELISA的方法测量Fc $\gamma$ R结合和C1q结合。也可以通过FACS(荧光激活细胞分选)测量Fc $\gamma$ R结合。也可以使用商业可利用的方法来测量与多聚体与Fc $\gamma$ R或C1q的结合。

[0245] 6.2 稳定性

[0246] 可以根据本领域中的已知方程测定异多聚体的热稳定。IgG Fc构建体的熔化温度

指示其热稳定性。可以使用技术例如差示扫描量热法(Chen等(2003)Pharm Res 20:1952-60;Ghirlando等(1999)Immunol Lett 68:47-52)测量IgG Fc构建体的熔点。或者,可以使用圆二色谱法测量IgG Fc构建体的热稳定性(Murray等(2002)J.Chromatogr Sci 40:343-9)。

[0247] 用于测定母体CH2结构域的T<sub>m</sub>的方法是本领域中周知的(参见例如Ionescu等(2008)J Pharm Sci 97(4):1414-26)。简言之,IGG1的Fc区的熔化产生了两个转变:一个是CH2结构域的熔化,另一个是CH3结构域的熔化。这些转变不依赖于Fab的存在,但是可以通过Fab转变掩盖。通常,IGG1Fc的熔化得到了CH2结构域的T<sub>m</sub>为71℃的转变和CH3结构域的T<sub>m</sub>为82℃的转变。CH2结构域的T<sub>m</sub>受其糖基化状态、铰链区性质和CH3结构域的固有稳定性的影响。已知未糖基化和去糖基化使CH2结构域的T<sub>m</sub>降低10℃。已知一些铰链二硫化物的去除使CH2结构域的T<sub>m</sub>降低超过10℃。使CH3结构域的稳定性的降低到CH2结构域之下的CH3结构域的变化可以在CH2结构域的T<sub>m</sub>中产生变化,但是影响难以预测。

#### [0248] 7. 药物组合物

[0249] 本发明还提供了包含本发明的异多聚体的药物组合物。此类组合物包含治疗有效量的异多聚体和药学上可接受的载体。在一个特定实施方案中,术语“药学上可接受的”意指经联邦管理机构或政府部门批准或者列举在美国药典或者其他通常公认的药典中用于在动物、更特别是人中使用。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或运载体。此类药用载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物静脉内施用,水是优选的载体。也可以使用盐溶液或水葡萄糖和甘油溶液作为液体载体,特别是注射用溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物可以包含少量润湿剂或者乳化剂,或者pH调节剂。这些组合物可以是溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、缓释制剂等的形式。可以利用常规粘合剂和载体(例如,甘油三酯)将组合物配制成栓剂。口服制剂可以包含标准载体,例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药用载体的实例由E.W.Martin.描述在“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。此类组合物将包含治疗有效量的化合物,优选呈纯化形式,以及合适量的载体,以提供适合向患者施用的形式。制剂应当适合于施用方式。

[0250] 在某些实施方案中,根据常规方法将包括异多聚体的组合物配制成适合于用于向人类静脉内施用的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是无菌等张水缓冲液中的溶液。需要时,组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂,例如利诺卡因(lignocaine)以减轻注射部位的疼痛。通常,成分单独提供或者在单位剂型中混合在一起,例如,作为冻干粉或不含水的浓缩物在表明活性剂的量的密封容器中。当组合物待通过输注施用,可以将其分配在含有无菌药用级水或盐水的输注瓶中。当通过注射施用组合物时,可以提供无菌注射用水或盐水的安瓶以使得可以在施用前混合。

[0251] 在某些实施方案中,本文所述的组合物配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括由阴离子形成的那些,例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及由阳离子形成的那些,例如衍生自钠、钾、铵、钙、铁氢氧化物、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因的那些。

[0252] 在治疗、抑制和预防与治疗性蛋白质的异常表达和/或活性相关的疾病或病症中有效的本文所述的组合物的量可以通过标准临床技术来确定。此外，可以任选地使用体内测定来帮助确定最佳剂量范围。制剂中使用的精确剂量也将取决于施用途径、和疾病或病症的严重程度，并且根据从业者的判断以及每位患者的情况来确定。有效剂量由来自体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线外推。

#### [0253] 8. 治疗/使用方法

[0254] 通过上述方法产生的异多聚体可用于诊断、治疗、检测或调节人疾病或者细胞、组织、器官、流体或通常宿主中的特定病理。如本文教导的，抗体、Fc融合蛋白或Fc片段的Fc区的降低或消除Fc $\gamma$ 受体结合和特定效应子功能但是保留了最初的靶向特性的修饰提供了具有优秀的活性、生物物理特性、稳定性和保持在宿主体内的能力范围的抗体和IgG Fc构建体。

[0255] 可以通过使用本发明提供的组合物治疗的疾病或病理包括但不限于：神经失调，例如但不限于阿兹海默病(Alzheimer's disease)，并且包括神经性疼痛；皮肤疾病；代谢疾病；骨关节炎；以及烧伤或损伤造成的状态；心血管障碍，包括但不限于心肌梗死、充血性心力衰竭、中风、缺血性中风和出血；以及一般免疫介导的疾病，包括风湿性疾病、银屑病和硬皮病。

[0256] 在一个实施方案中，根据本发明的异多聚体用于治疗疾病，其中抗体用于靶向细胞表面分子，其中由Fc $\gamma$ R介导的效应子功能导致的这些分子的消耗具有不利影响。

[0257] 在一个实施方案中，据本发明的异多聚体用于提高与其靶标形成免疫复合物的抗体的安全指数。

[0258] Strohl,WR和Strohl LM,“Antibody Fc engineering for optimal antibody performance”In Therapeutic Antibody Engineering,Cambridge:Woodhead Publishing (2012),第225-249页,提供了对使用缺少Fc $\gamma$ R和补体介导的效应子功能的抗体治疗疾病的优点的描述。预期根据本发明的包含IgG Fc构建体的异多聚体可用于和制备用于治疗疾病的缺少Fc $\gamma$ R和补体介导的效应子功能的抗体。

#### [0259] 9. 试剂盒

[0260] 本发明还提供了包含一种或更多种异多聚体的药物。所述试剂盒的单独组分将包含在单独容器中，并且与此类容器关联的可以是政府机构规定形式的使用或销售药物或生物制品的通知，所述通知反应了机构批准制造、使用或销售。试剂盒可以任选地包含概括了异二聚体对的使用或施用方案的说明或指示。

[0261] 当试剂盒的一种或更多种组分以溶液如水溶液或无菌水溶液提供时，容器装置本身可以是吸入器、注射器、移液器、滴眼管或其他此类装置，可以通过其将溶液施用至对象或这样与试剂盒的其他组分一起应用或混合。

[0262] 试剂盒的组分还可以以干燥或冻干形式提供，且试剂盒可以任选地包含合适的溶剂用于冻干组分的重构。无论容器的数量或类型，本发明的试剂盒还可以包括用于帮助向患者施用组合物的工具。此类工具可以是吸入器、鼻喷雾装置、注射器、移液器、镊子、量勺、滴眼管或类似的医学上批准的递送运载体。

[0263] 应理解的是，本文描述的实施例和实施方案仅用于举例说明目的，在其基础上向本领域技术人员暗示了多种修改或改变，所述修改和变化包括在本申请的精神和发文内以

及所附权利要求的范围内。

### 实施例

[0264] 给出了以下实施例以说明本发明的实践。这些实施例并未旨在限制本发明的整体范围。

[0265] 实施例1:抗体构建体(异多聚体)的制备和表达

[0266] 制备以下抗体构建体。所有抗体构建体均基于野生型抗Her2抗体曲妥珠单抗的序列(参见图5,SEQ ID NO:2为野生型曲妥珠单抗重链氨基酸序列,SEQ ID NO:3为野生型曲妥珠单抗轻链氨基酸序列),引入在重链CH3结构域中添加的以下修饰,以促进与在不包含氨基酸突变的CH3结构域相比稳定性增加的异二聚体Fc结构域的形成。

[0267] 链A:T350V/L351Y/S400E/F405A/Y407V,和

[0268] 链B:T350V/T366L/N390R/K392M/T394W

[0269] 这种具有上述修饰的构建体称为v791。本文描述的所有序列均使用EU编号系统编号。

[0270] 利用表A1中示出的重链的铰链区或CH2结构域中的氨基酸修饰,基于v791构建额外的变体。所有变体包括SEQ ID NO:67(氨基酸)和/或SEQ ID NO:34(DNA)中示出的曲妥珠单抗轻链序列。

[0271] 表A1:基于曲妥珠单抗的不对称抗体构建体

[0272]

变体	重链 A	SEQ ID No.:(氨基酸/DNA)	重链 B	SEQ ID No.:(氨基酸/DNA)
1051/对照	L234A/L235A	6/7	L234A/L235A	8/9
AAC1	L234A/L235A	6/7	--	20/21
AAC2	L234A/L235A	6/7	L234K/L235K	22/23
AAC3	L234D/L235E	10/11	L234K/L235K	22/23
AAC4	E233A/L234D/L235E	12/13	E233A/L234R/L235R	24/25
AAC5	L234D/L235E	10/11	E233K/L234R/L235R	26/27
AAC6	E233A/L234K/L235A	14/15	E233K/L234A/L235K	28/29
AAC7	E269Q/D270N	16/17	E269K/D270R	30/31
AAC8	--	18/19	L235K/A327K	32/33

[0273] 1051是Strohl(2009)Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中描述的对照变体。

[0274] AAC1是另一个对照变体,其是1051的不对称形式,其中仅一个重链具有L234/L235双突变。

[0275] AAC2-AAC8是不对称设计。

[0276] 抗体和对照如下克隆和表达。使用标准方法通过定点诱变制备v791。将最终DNA亚克隆到载体pTT5中(参见,国际专利公开No.WO 2009/137911)。在2mL或50mL或500mL CHO 3E7细胞中进行表达。在对数生长阶段(1.5至2百万细胞/mL),用含水的1mg/mL 25kDa聚乙烯亚胺(PEI,Polysciences)以2.5:1的PEI:DNA比率转染CHO细胞(Raymond C.等A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and

high-throughput applications. Methods. 55(1):44-51(2011)。为了确定用于形成异二聚体的最佳浓度范围,在允许异二聚体形成的最佳的重链A(HC-A)、轻链(LC)和重链B的DNA比率下转染DNA(例如,HC-A/HC-B/LC比率=25%:25%:50%)。5至6天后收获转染细胞,在4000rpm下离心分离后收集培养基并且使用0.45 $\mu$ m过滤器澄清化。

[0277] 纯化方案:将澄清化的培养基上样到MabSelect SuRe(GE Healthcare)A蛋白柱上并且用10个柱体积的pH 7.2的PBS缓冲液洗涤。用10个柱体积的pH 3.6的柠檬酸盐缓冲液对抗体进行洗脱,合并的含抗体的级分用pH 11的TRIS中和。将A蛋白纯化的抗体通过凝胶过滤(SEC)进一步纯化。对于凝胶过滤,将3.5mg抗体混合物浓缩到1.5mL并且通过ÄKTA Express FPLC以1mL/min的流速上样到Sephadex 200HiLoad 16/600200 $\mu$ g柱(GE Healthcare)上。pH 7.4的PBS缓冲液以1mL/min的流速使用。收集对应于纯化抗体的级分,浓缩到~1mg/mL并且在-80 $^{\circ}$ C储存。

[0278] 表A2概括了各个样品的表达产率。

[0279]

变体	50 mL 表达 A 蛋白产率[mg/L]	50 mL 表达 SEC 产率[mg/L]	500 mL 表达 A 蛋白产率[mg/L]	500 mL 表达 SEC 产率[mg/L]
WT	30	n/d*	n/d	n/d
1051/对照	48	20	48	23
AAC1	n/d	n/d	n/d	n/d
AAC2	63	24	n/d	n/d
AAC3	39	20	n/d	n/d
AAC4	42	26	n/d	n/d
AAC5	44	16	n/d	n/d
AAC6	31	13	15	10
AAC7	n/d	n/d	n/d	n/d
AAC8	n/d	n/d	n/d	n/d

[0280] \*n/d=未测定

[0281] 大部分样品表现出类似于WT或对照的表达

[0282] 实施例2:基于曲妥珠单抗的不对称抗体不与Fc $\gamma$ R结合

[0283] 通过表面等离子体共振(SPR)评估不对称抗体构建体与Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIaR、Fc $\gamma$ RIIb Fc $\gamma$ RIIIaF、Fc $\gamma$ RIIIaV和Fc $\gamma$ RIa的结合的能力。

[0284] 在25 $^{\circ}$ C,利用pH 7.4的10mM HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA和0.05% Tween 20,使用ProteOn XPR36通过SPR测量Fc $\gamma$ R与抗体Fc的亲合力。将重组HER-2捕获在激活的GLM传感芯片上,其如下进行:以25 $\mu$ L/min注射10mM NaOAc(pH 4.5)中的4.0 $\mu$ g/mL重组HER-2直到固定约3000个共振单元(resonance unit, RU),淬灭其余活性基团。在用缓冲液注射以建立稳定基线后,在以25 $\mu$ L/min注射240秒(导致约500RU)的情况下间接捕获40 $\mu$ g/mL纯化的HER-2/neu基抗体。Fc $\gamma$ R以60 $\mu$ L/min注射120秒,进行180秒的解离阶段,以获得一组结合传感图(sensogram)。利用作为两个或三个独立运行的平均值的报道数据,由使用平衡拟合模型(Equilibrium Fit model)的结合等温线(binding isotherm)确定所得kD值。

[0285] 通过SPR测定的每一种变体相对于WT的体外结合Ka比率示出在表B中。

[0286] 表B:相对于野生型曲妥珠单抗的对于与Fc $\gamma$ 受体结合的SPR Ka比率

[0287]

变体	2aH <sup>1</sup>	2aR <sup>2</sup>	2b <sup>3</sup>	3aF <sup>4</sup>	3aV <sup>5</sup>	1a <sup>6</sup>
WT	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
对照/1051	0.06	0.18	0.52	0.29	0.10	0.01
AAC1	n/d*	n/d	n/d	0.87	0.71	0.48
AAC2	NB	NB	NB	LOW	LOW	LOW
AAC3	NB	NB	NB	LOW	LOW	LOW
AAC4	NB	NB	NB	LOW	LOW	LOW
AAC5	NB	NB	NB	LOW	LOW	LOW
AAC6	NB	NB	NB	NB	LOW	LOW
AAC7	n/d	n/d	n/d	LOW	LOW	0.15
AAC8	n/d	n/d	n/d	0.19	0.10	0.13

[0288] \*n/d=未测定

[0289] 1. 2ah的K<sub>d</sub>为0.48μM。受体以10μM进行。LOW意指K<sub>d</sub>>>10μM,NB意指K<sub>d</sub>>>100μM,其中>>表示“大得多”。

[0290] 2. 2ar的K<sub>d</sub>为0.87μM。受体以10μM进行。LOW意指K<sub>d</sub>>>10μM,NB意指K<sub>d</sub>>>100μM。

[0291] 3. 2b的K<sub>d</sub>为3.4μM。受体以10μM进行。LOW意指K<sub>d</sub>>>10μM,NB意指K<sub>d</sub>>>100μM。

[0292] 4. 3af的K<sub>d</sub>为1.9μM。受体以6μM进行。LOW意指K<sub>d</sub>>>6μM,NB意指K<sub>d</sub>>>60μM。

[0293] 5. 3av的K<sub>d</sub>为0.60μM。受体以6μM进行。LOW意指K<sub>d</sub>>>6μM,NB意指K<sub>d</sub>>>60μM。

[0294] 6. 1a的K<sub>d</sub>为0.65nM。受体以30nM进行。LOW意指K<sub>d</sub>>>30nM,NB意指K<sub>d</sub>>>300nM。

[0295] 所有变体均表现出显著降低的与所有受体的结合。大多数情况下,由于低的亲和力,结合不可检测或不可量化。

[0296] 实施例3:基于曲妥珠单抗的不对称抗体不与C1q结合

[0297] 如下测试不对称抗体构建体与C1q结合的能力。人C1q购自GenWay Biotech(San Diego,CA)。如实施例2中所述进行抗体的SPR芯片固定。同样如实施例2中所述,使用标准方案将30nM C1q注射通过捕获在HER2SPR表面上的mAb变体。结果示出在下表C中。

[0298] 表C:C1q结合测定的结果

[0299]

变体	C1q <sup>1</sup>
WT	是
对照/1051	NB
AAC1	部分
AAC2	NB
AAC3	NB
AAC4	NB
AAC5	NB
AAC6	NB
AAC7	NB
AAC8	NB

[0300] 1. C1q是具有可能的6:1的mAb:C1q的化学计量比的异三聚体的六聚体。结合动力学非常复杂,适当的Kd可能未确定。受体以30nM测试。‘部分’意指降低的结合,‘NB’意指没有可检测的结合。

[0301] 所有变体均表现出不可检测的与C1q的结合,只有AAC1表现出降低的但是可检测的与C1q的结合。

[0302] 实施例4:基于曲妥珠单抗的不对称抗体构建体与FcRn结合

[0303] 通过如下SPR测试不对称抗体与FcRn结合的能力。

[0304] 利用山羊抗hIgG多克隆制备SPR芯片捕获表面。在竖直线上从上清液中捕获抗体。使FcRn流(为3×稀释系列,以1μM最大值)在水平线上流动。在pH 6下的重复运行产生了类似结果。进行在7.4pH下的一个运行以检测结合的缺失。结果示出在下表D中。

[0305] 表D:FcRn结合

[0306]

变体	FcRn <sup>1</sup>
WT	是
对照/1051	是
AAC1	n/d*
AAC2	是
AAC3	是
AAC4	是
AAC5	是
AAC6	是
AAC7	n/d
AAC8	n/d

[0307] \*n/d=未测定

[0308] 1. 在pH 6.5和7.4下测量FcRn结合。在pH 6.5结合WT并且在pH 7.4没有可检测结合的变体标记为“是”

[0309] 实施例5:不对称抗体构建体是热稳定的

[0310] 如下使用差示扫描量热法确定不对称抗体构建体的CH2结构域的热稳定性。如实施例1中所述纯化每一种抗体构建体并且在PBS中稀释到0.2mg/mL,利用VP-Capillary DSC (GE Healthcare)将总共400μL用于DSC分析。在每个DSC运行开始时,进行5个缓冲液空白注射以稳定基线,缓冲液注射在每次抗体构建体注射之前进行以用于参考。每份样品以60°C/小时的速率从20°C扫描到100°C,具有低反馈,8秒过滤器,5分钟preTstat和70psi氮气压。使用Origin 7软件对所得热谱图进行参考和分析。

[0311] 测试的异二聚体的热展开曲线示出在图2中。测试的热多聚体的熔化温度示出在下表E中。

[0312] 表E:异多聚体的热稳定性

[0313]

变体	T <sub>m</sub> 起始(WT~66.5C) <sup>1</sup>	T <sub>m</sub> (WT~71.0C) <sup>2</sup>
对照/1051	66.5	71.8

AAC1	n/d	n/d*
AAC2	70.5	74
AAC3	65.8	71.5
AAC4	66.7	72.8
AAC5	67.0	72.9
AAC6	68.7	75.0
AAC7	n/d	n/d
AAC8	n/d	n/d

[0314] \*n/d=未测定

[0315] 1. T<sub>m</sub>起始在视觉上是被认为是图2中热谱图中明显高于基线的第一个点。

[0316] 2. 使用图2示出的热谱图中第一转变的非2状态模型通过去卷积测量T<sub>m</sub>。

[0317] 这些结果表明,当与对照WT比较时,许多设计的CH2结构域具有更高的T<sub>m</sub>起始和T<sub>m</sub>。

[0318] 实施例6:基于曲妥珠单抗的不对称抗体构建体的纯化

[0319] 表达选择的不对称抗体构建体并且如下通过UPLC IEX(超高效液相色谱-离子交换色谱)进行纯化。

[0320] 在50mL CHO培养基中以比率1:0(A)、1:1(C)和0:1(E)表达变体791(WT异二聚体)、AAC3(L234D/L235E[链A]|L234K/L235K[链B])和AAC5(L234D/L235E[链A]|E233K/L234K/L235K[链B])的链A和链B。比率A和E分别产生链A和链B的同二聚体。所有样品通过A蛋白纯化,然后在PBS缓冲液中使用Superdex 20016/600柱通过尺寸排阻色谱(SEC)纯化,然后上样到UPLC IEX中。在以下条件下进行UPLC IEX(pH梯度):溶剂:A,0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH 4.44;B,0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH 9.20;C,MilliQ水;D,0.5M乙酸钠,pH 9.13(lot#03-Dec-12)。初始缓冲液:18%A,2%B,68%C,12%D=20mM NaPO<sub>4</sub>,60mM乙酸钠,pH~5.9;梯度:至2%A,18%B,68%C,12%D=20mM NaPO<sub>4</sub>,60mM乙酸钠,pH~7.9,7.2柱体积。流速:0.3ml/min。温度:30℃。压力:~4200p si。柱:Agilent BioMAb,4.6x 50mm,1.7μm颗粒,SN USDJA01061。

[0321] 结果示出在图3A中。标记出了对应于同二聚体或异二聚体的比率A、C和E的迹线。也示出了重复实验(当进行时)。

[0322] 图3A表明在下游铰链区引入不对称变化得到了此类设计,其不仅具有较低的受体结合(实施例3)和更高的热稳定性(实施例5),并且还可以通过离子交换色谱从同二聚体杂质中纯化。

[0323] 在两种条件下测试一种变体AAC4的分离。在上述pH梯度下或在下述盐梯度下洗脱:溶剂:A 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH 4.44;B 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH 9.20;C MilliQ水;D 0.5M NaCl。初始缓冲液:18%A,2%B,68%C,12%D=20mM NaPO<sub>4</sub>,60mM NaCl,pH~5.9。盐梯度至18%A,2%B,0%C,80%D(=20mM NaPO<sub>4</sub>,400mM NaCl,pH~5.9),7.2柱体积中。

[0324] 结果示出在图3B中。该图表明,利用盐梯度分离同二聚体和异二聚体与利用pH梯度类似。

[0325] 实施例7:基于曲妥珠单抗的不对称抗体构建体在SK-BR-3细胞中不刺激ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)

[0326] 测试示例性变体在SK-BR-3细胞中刺激ADCC的能力,以评估是否可以将测量的与



Fc $\gamma$ R结合的缺失转化成不能介导通过ADCC测量的效应子功能。SK-BR-3细胞在其表面表达HER2并因此与曲妥珠单抗结合,允许在曲妥珠单抗的存在下NK细胞介导的ADCC。将在本测定中AA6的活性与表A中描述的对照变体以及阳性对照曲妥珠单抗进行了比较。

[0327] 所使用的细胞系:SK-BR-3细胞系(ATCC#HTB-30),NK92/CD16a(158V/V)检测装置:FlexStation3,Molecular Devices。

[0328] 阳性对照抗体:Herceptin™(曲妥珠单抗)。

[0329] 细胞培养。通过在37℃水浴中对小瓶轻轻涡流来使冷冻细胞解冻。1至2分钟后,小瓶中的培养基完全解冻。用70%乙醇擦拭小瓶外部。然后将细胞悬液转移到15ml离心管中,然后加入5ml预热的完全培养基。在500g离心3至5分钟后,吸出上清液。加入10ml上清液并且通过上下吸吹数次使细胞重悬。通过台盼蓝染色确定细胞存活率。然后将细胞悬液接种到烧瓶中。细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。

[0330] 将细胞保持在37℃/5%CO<sub>2</sub>下并且根据ATCC方法用补充有10%FBS的合适的培养基定期传代培养。

[0331] 抗体样品和标准物在干燥运送器中输送并且在测试前储存在-20℃下。将样品和标准物在冰上解冻后储存在4℃下。将样品和标准物用不含酚红的MEM培养基(补充1%FBS和1%青霉素/链霉素)稀释并且用于测试。

[0332] ADCC测定缓冲液由98%不含酚红的MEM培养基、1%青霉素/链霉素和1%FBS组成。

[0333] NK92/Fc $\gamma$ 3a(158V/V)细胞常规保持。

[0334] 如下收集靶细胞:将其在800rpm离心3分钟,用测定培养基洗涤一次并且离心;完全除去沉淀物上方的培养基。用测定培养基轻轻地使细胞重悬以制备单细胞溶液。将靶细胞数调节到4 $\times$ 细胞储备液(50 $\mu$ l测定培养基中10,000个细胞)。制备目标浓度的测试样品。将50 $\mu$ l 4 $\times$ 靶细胞储备液接种到96孔测定平板中并且加入50 $\mu$ l 4 $\times$ 样品稀释剂。将平板在细胞培养孵育器中在室温孵育30分钟。加入100 $\mu$ l效应子细胞(E/T=5:1,即每孔50,000个效应子细胞)以开始反应并且通过交叉振摇来轻轻混合。向无效效应子细胞的细胞对照中加入Triton X-100以及最终浓度为1%的抗体以裂解靶细胞,其用作最大裂解对照;向无效效应子细胞和抗体的细胞对照加入测定缓冲液,其用作最小LDH释放对照。当两种细胞一起孵育时,将用不存在抗体的效应子细胞孵育的靶细胞设定为非特异性LDH释放的背景对照。将平板在37℃/5%CO<sub>2</sub>孵育器孵育4至6小时。用LDH试剂盒测定细胞存活率。在Flexstation 3上测量OD<sub>492nm</sub>和OD<sub>650nm</sub>的吸光度数据。

[0335] 分析背景(OD<sub>650nm</sub>)减去的OD<sub>492nm</sub>数据以研究LDH释放。根据公式计算细胞裂解百分比:

[0336] 细胞裂解% = 100\*(1-(OD样品数据-OD肿瘤细胞加效应子细胞)/(OD最大释放-OD最小释放))

[0337] 结果示出在图4中,其表明在本次测定中示例的异多聚体AA6能够沉默ADCC活性。

[0338] 实施例8:基于抗CD20抗体利妥昔单抗的抗体构建体(异多聚体)的制备和表达

[0339] 制备以下抗体构建体。所有抗体构建体基于野生型抗CD20抗体利妥昔单抗(参见图5,SEQ ID NO:4为野生型利妥昔单抗重链氨基酸序列,SEQ ID NO:5为野生型利妥昔单抗轻链氨基酸序列),引入在重链CH3结构域中添加的以下修饰,以促进与在不包含氨基酸突变的CH3结构域相比稳定性增加的异二聚体Fc结构域的形成:

[0340] 链A:T350V/L351Y/F405A/Y407V,和

[0341] 链B:T350V/T366L/K392L/T394W

[0342] 具有上述修饰的该构建体称为v1261。

[0343] 利用表F中示出的重链的铰链区或CH2结构域中的氨基酸修饰,基于v1261构建额外的变体。所有变体包括SEQ ID NO:68(氨基酸)和/或SEQ ID NO:69(DNA)中示出的轻链序列。

[0344] 表F:基于利妥昔单抗的不对称抗体构建体

[0345]

变体	链 A	SEQ ID No.:( 氨基酸/DNA)	链 B	SEQ ID No.:(氨基酸/ DNA)
对照 WT 利妥昔单 抗 1261	--	35/36	--	37/38
AAC9	L234D / L235E	39/40	E233K / L234R / L235R	41/42
AAC10	L234D / L235E+D265S	43/44	E233K / L234R / L235R+D265S	45/46
AAC11	L234D / L235E+E269K	47/48	E233K / L234R / L235R+E269K	49/50
AAC12	L234D / L235E+K322A	51/52	E233K / L234R / L235R+K322A	53/54
AAC13	L234D / L235E+P329W	55/56	E233K / L234R / L235R +P329W	57/58
AAC14	L234D / L235E+E269K+D265S +K322A	59/60	E233K / L234R / L235R +E269K+D265S+K322 A	61/62
AAC15	L234D / L235E +E269K+D265S+K322 E+E333K	63/64	E233K / L234R / L235R +E269K+D265S+K322 E+E333K	65/66

[0346] 抗体和对照如下克隆和表达。使用标准方法通过定点诱变制备V1261。将最终DNA亚克隆到载体pTT5中(参见,国际专利公开No.WO 2009/137911)。在50mL或250mL CHO 3E7细胞中进行表达。在对数生长阶段(1.5至2百万细胞/mL),用含水的1mg/mL 25kDa聚乙烯亚胺(PEI,Polysciences)以2.5:1的PEI:DNA比率转染CHO细胞(Raymond C.等A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications.Methods.55(1):44-51(2011))。在HC-A/HC-B/LC比率=30%:30%:40%重链A(HC-A)、轻链(LC)和重链B的DNA比率下转染DNA。5至6天后收获转染细胞,在4000rpm下离心分离后收集培养基并且使用0.45μm过滤器澄清化。

[0347] 纯化方案:将澄清化的培养基上样到MabSelect SuRe(GE Healthcare)A蛋白柱上并且用10个柱体积的pH 7.2的PBS缓冲液洗涤。用10个柱体积的pH 3.6的柠檬酸盐缓冲液对抗体进行洗脱,合并的含抗体的级分用pH 11的TRIS中和。将A蛋白纯化的抗体通过凝胶过滤(SEC)进一步纯化。对于凝胶过滤,将3.5mg抗体混合物浓缩到1.5mL并且通过AKTA Express FPLC以1mL/min的流速上样到Sephadex 200HiLoad 16/600200pg柱(GE Healthcare)上。pH 7.4的PBS缓冲液以1mL/min的流速使用。收集对应于纯化抗体的级分,

浓缩到~1mg/mL并且在-80℃储存。

[0348] 表达产率如下：

[0349] 表G-表达产率

变体	50 mL 表达 A 蛋白产率[mg/L]	50 mL 表达 SEC 产率 [mg/L]	250 mL 表达 A 蛋白产率[mg/L]	250 mL 表达 SEC 产率[mg/L]
对照 WT 利妥昔单抗 1261			28	15
[0350] AAC9	11	6	8	3
AAC10	12	5	24	11
AAC11	12	3	24	9
AAC12	11	4	11	9
AAC13	15	5	7	3
AAC14	10	3	13	11
AAC15	18	5	8	3

[0351] 考虑到批次与批次之间产率的变化,所有样品良好表达至与对照WT利妥昔单抗类似的水平。

[0352] 实施例9:基于利妥昔单抗的不对称抗体构建体不与Fc $\gamma$ R结合

[0353] 通过表面等离子体共振(SPR)评估基于利妥昔单抗的不对称抗体构建体与Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIaR、Fc $\gamma$ RIIb Fc $\gamma$ RIIIaF和Fc $\gamma$ RIIIaV的结合的能力。

[0354] 在25℃,利用pH 7.4的含有3.4mM EDTA和0.05%Tween 20的PBS作为运行缓冲液,使用ProteOn XPR36通过SPR测量Fc $\gamma$ R与抗体Fc的亲合力。将山羊多克隆抗IgG抗体固定在NHS/EDC激活的GLC传感芯片上,其如下进行:以25 $\mu$ L/min注射10mM NaOAc(pH 4.5)中的4.0 $\mu$ g/mL山羊多克隆抗IgG抗体直到达到约3000个共振单元(RU),然后用乙醇胺淬灭其余活性基团。在分析物方向进行缓冲液注射以建立稳定基线后,通过在配体方向以25 $\mu$ L/min注射240秒(导致约500RU捕获)来间接捕获40 $\mu$ g/mL纯化的基于利妥昔单抗的抗体。随后Fc $\gamma$ R以50 $\mu$ L/min注射120秒,进行180秒的解离阶段,以获得一组结合传感图。在Proteon Manager软件中,使用平衡拟合模型由双参考的传感图确定所得Kd(亲合力)值。所报道的值为两个或三个独立运行的平均。

[0355] 通过SPR测定的每一种变体相对于WT的体外结合Ka比率示出在表H中。

[0356] 表H:相对于野生型曲妥珠单抗的对于与Fc $\gamma$ 受体结合的SPR Ka比率

变体	CD16aF	CD16aV	CD32b	CD32aH	CD32aR
对照 WT 利妥昔单抗 1261	1.36	1.34	1.85	1.87	1.47
[0357] AAC9	NB	0.08	NB	NB	NB
AAC10	NB	LOW	NB	NB	NB
AAC11	NB	LOW	NB	NB	NB
AAC12	NB	0.08	NB	NB	NB
AAC13	NB	LOW	NB	NB	NB
AAC14	NB	LOW	NB	NB	NB
AAC15	NB	LOW	NB	NB	NB

[0358] 与同二聚体WT曲妥珠单抗相比,对照WT利妥昔单抗1261上的异二聚体驱动突变对

受体只有少量亲和力。包括异二聚体驱动突变的突变体表现出显著降低的或不可检测的与Fc $\gamma$ 受体的结合。

[0359] 实施例10:基于利妥昔单抗的不对称抗体构建体是热稳定的

[0360] 如下使用差示扫描量热法确定基于利妥昔单抗的不对称抗体构建体的CH2结构域的热稳定性。如实施例8中所述纯化每一种抗体构建体并且在PBS中稀释到0.2mg/mL,利用VP-Capillary DSC(GE Healthcare)将总共400 $\mu$ L用于DSC分析。在每个DSC运行开始时,进行5个缓冲液空白注射以稳定基线,缓冲液注射在每次抗体构建体注射之前进行以用于参考。每份样品以60 $^{\circ}$ C/小时的速率从20 $^{\circ}$ C扫描到100 $^{\circ}$ C,具有低反馈,8秒过滤器,5分钟preTstat和70psi氮气压。使用Origin 7软件对所得热谱图进行参考和分析。

[0361] 测试的异二聚体的热展开曲线示出在下图I中。

[0362] 表I:异多聚体的热稳定性

变体	T <sub>m</sub> [ $^{\circ}$ C] <sup>1</sup>
<b>对照 WT 利妥昔单抗 1261</b>	73.0
<b>AAC9</b>	75.3
<b>AAC10</b>	75.3
<b>AAC11</b>	75.4
<b>AAC12</b>	75.4
<b>AAC13</b>	75.4
<b>AAC14</b>	75.2 (噪声)
<b>AAC15</b>	67.5

[0364] 1. 第一转变包括利妥昔单抗FAB和CH2结构域二者的展开。使用第一转变的非2状态模型通过去卷积测量T<sub>m</sub>。

[0365] 当与对照WT比较时,许多设计的CH2结构域具有更高的T<sub>m</sub>起始和T<sub>m</sub>。

[0366] 实施例11:基于利妥昔单抗的不对称抗体构建体在Daudi细胞中不刺激ADCC

[0367] 测试所选择变体在Daudi细胞中刺激ADCC的能力,以评估是否可以将测量的与Fc $\gamma$ R结合的缺失转化成不能介导通过ADCC测量的效应子功能。Daudi细胞在其表面上表达CD20因此与利妥昔单抗结合,允许在利妥昔单抗的存在下NK细胞介导的ADCC。将本测定中所选择变体的活性与在表F中描述的对照利妥昔单抗变体以及市场上获得的利妥昔单抗的活性进行了比较。

[0368] 所使用的细胞系:Daudi细胞系(ATCC,目录号CCL-213),NK92/CD16a(158V/V)检测装置:FlexStation3,Molecular Devices。

[0369] 阳性对照抗体:利妥昔单抗。

[0370] 细胞培养。通过在37 $^{\circ}$ C水浴中对小瓶轻轻涡流来使冷冻细胞解冻。1至2分钟后,小瓶中的培养基完全解冻。用70%乙醇擦拭小瓶外部。然后将细胞悬液转移到15ml离心管中,然后加入5ml预热的完全培养基。在500g离心3至5分钟后,吸出上清液。加入10ml上清液并且通过上下吸吹数次使细胞重悬。通过台盼蓝染色确定细胞存活率。然后将细胞悬液接种到烧瓶中。细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。

[0371] 将细胞保持在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>下并且根据ATCC的方案用补充有10%FBS的合适的培养基定期传代培养。

[0372] 抗体样品和标准物(利妥昔单抗)在干燥运送器中输送并且在测试前储存在-20℃下。将样品和标准物在冰上解冻后储存在4℃下。将样品和标准物用不含酚红的MEM培养基(补充1%FBS和1%青霉素/链霉素)稀释并且用于测试。

[0373] ADCC测定缓冲液由98%不含酚红的MEM培养基、1%青霉素/链霉素和1%FBS组成。

[0374] NK92/FcR  $\gamma$  3a(158V/V)细胞常规保持。

[0375] 如下收集靶细胞:将其在800rpm离心3分钟,用测定培养基洗涤一次并且离心;完全除去沉淀物上方的培养基。用测定培养基轻轻地使细胞重悬以制备单细胞溶液。将靶细胞数调节到4×细胞储备液(50 $\mu$ l测定培养基中10,000个细胞)。制备目标浓度的测试样品。将50 $\mu$ l 4×靶细胞储备液接种到96孔测定平板中并且加入50 $\mu$ l 4×样品稀释剂。将平板在细胞培养孵育器中在室温孵育30分钟。加入100 $\mu$ l效应子细胞(E/T=5:1,即每孔50,000个效应子细胞)以开始反应并且通过交叉振摇来轻轻混合。向无效效应子细胞的细胞对照中加入Triton X-100以及最终浓度为1%的抗体以裂解靶细胞,其用作最大裂解对照;向无效效应子细胞和抗体的细胞对照加入测定缓冲液,其用作最小LDH释放对照。当两种细胞一起孵育时,将用不存在抗体的效应子细胞孵育的靶细胞设定为非特异性LDH释放的背景对照。将平板在37℃/5%CO<sub>2</sub>下孵育4至6小时。用LDH试剂盒测定细胞存活率。在Flexstation 3上测量OD492nm和OD650nm的吸光度数据。

[0376] 分析背景(OD650nm)减去OD492nm数据以研究LDH释放。根据公式计算细胞裂解百分比:

[0377] 细胞裂解% = 100\*(1-(OD样品数据-OD肿瘤细胞加效应子细胞)/(OD最大释放-OD最小释放))

[0378] 结果示出在图6中,且表明所有变体表现出显著降低的或不可检测的ADCC活性。

[0379] 下表概括了结果:

[0380] 表J:变体的ADCC活性

变体	EC50 [nM]	最大裂解
对照 WT 利妥昔单抗 1261	0.1	66
AAC9	未裂解	未裂解
AAC10	7.4	45
AAC11	>100	Low
AAC12	23.1	20
AAC13	n/d*	n/d*
AAC14	未裂解	未裂解
AAC15	未裂解	未裂解

[0382] \*n/d=未测定

[0383] KO变体表现出显著降低的ADCC裂解活性,并且对于许多变体,完全没有检测到活性。

[0384] 实施例12:基于利妥昔单抗的不对称抗体构建体降低Daudi细胞中的CDC(补体依赖性细胞毒性)

[0385] 尽管未测试其与C1q结合的能力,测试选择的变体以确定其是否能够在Daudi细胞中介导CDC。将本测定中所选择变体的活性与在表F中描述的对照利妥昔单抗变体以及市场

上获得的利妥昔单抗的活性进行了比较。

[0386] 所使用的细胞系:Daudi细胞系(ATCC,目录号CCL-213),NK92/CD16a(158V/V)。检测装置:F PHERAstarPlus,BMG Labtech。阳性对照抗体:利妥昔单抗。

[0387] 细胞培养。通过离心分离收集Daudi细胞并且将平板用测定缓冲液洗涤一次。通过台盼蓝染色对活细胞计数。仅允许>99%存活率的细胞群用于测定。调节细胞浓度并且将5,000个细胞接种到20 $\mu$ l CDC缓冲液中。添加10 $\mu$ l稀释样品(以1:10的稀释系数从600nM向下递减的8个浓度,一式三份)。将样品和Rituxan对照在室温孵育30分钟。向每个孔中加入10 $\mu$ l NHS(40 $\mu$ l反应体积中的10%终浓度)以开始CDC测定。将平板在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>孵育器中孵育2小时。利用CellTiter-Glo<sup>®</sup>发光细胞存活率测定试剂盒进行细胞存活率测定。在PHERAStar Plus上读取发光并且记录成相对光单位数据。

[0388] 数据分析

[0389] 利用公式计算细胞裂解百分比:

[0390] 细胞裂解% = 100  $\times$  (1 - (RLU样品)/(RLU细胞+NHS)), 其中NHS表示正常人血清。

[0391] 结果示出在图7中,并且表明所有样品表现出显著降低的CDC活性。

[0392] 表K:变体的CDC活性

变体	EC50 [nM]	最大裂解
对照 WT 利妥昔单抗 1261	2.9	96
AAC9	47.9	68
AAC10	82.8	79
AAC11	51.6	63
AAC12	54.6	67
AAC13	n/d*	n/d*
AAC14	69.7	72
AAC15	~ 55.87	43

[0394] \*n/d=未测定

[0395] KO变体表现出显著降低的CDC裂解活性。

[0396] 实施例中所使用的试剂是市售的,并且可以使用本领域中已知的市售仪器、方法或试剂制备。前述实施例举例说明了本发明的多个方面和本发明方法的实践。实施例并未旨在提供对本发明许多不同实施方案的详尽的描述。因此,尽管为了清楚理解的目的已经通过举例说明和实施例的方式相当详细地描述了本发明,但是本领域技术人员将容易承认,可以对其进行许多变化和修改,而不脱离所附权利要求的精神和范围。

[0397] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过在此参考引入本说明书,其程度如同每个单独出版物、专利或专利申请均被明确地且单独地指出通过引用并入本文。

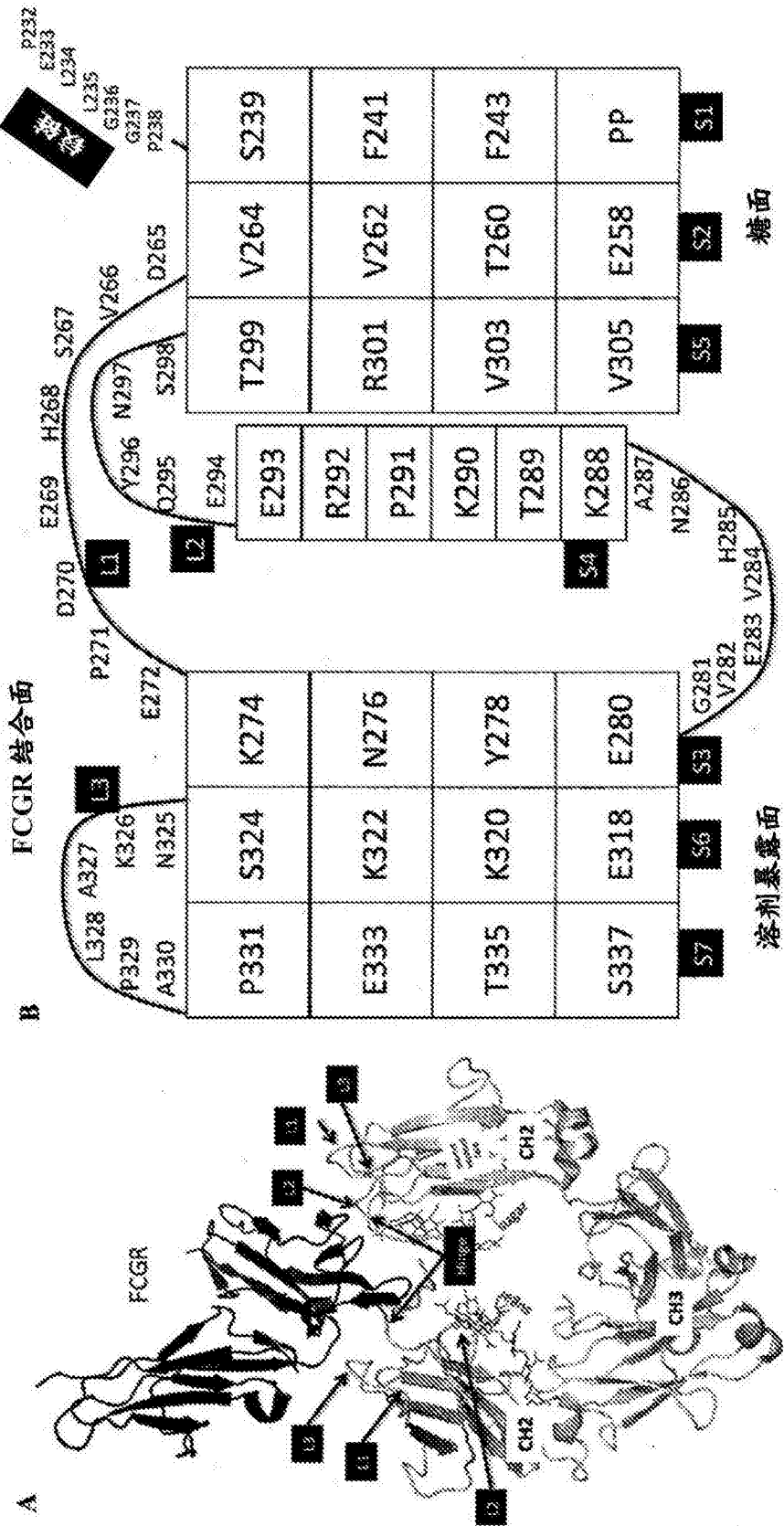


图1

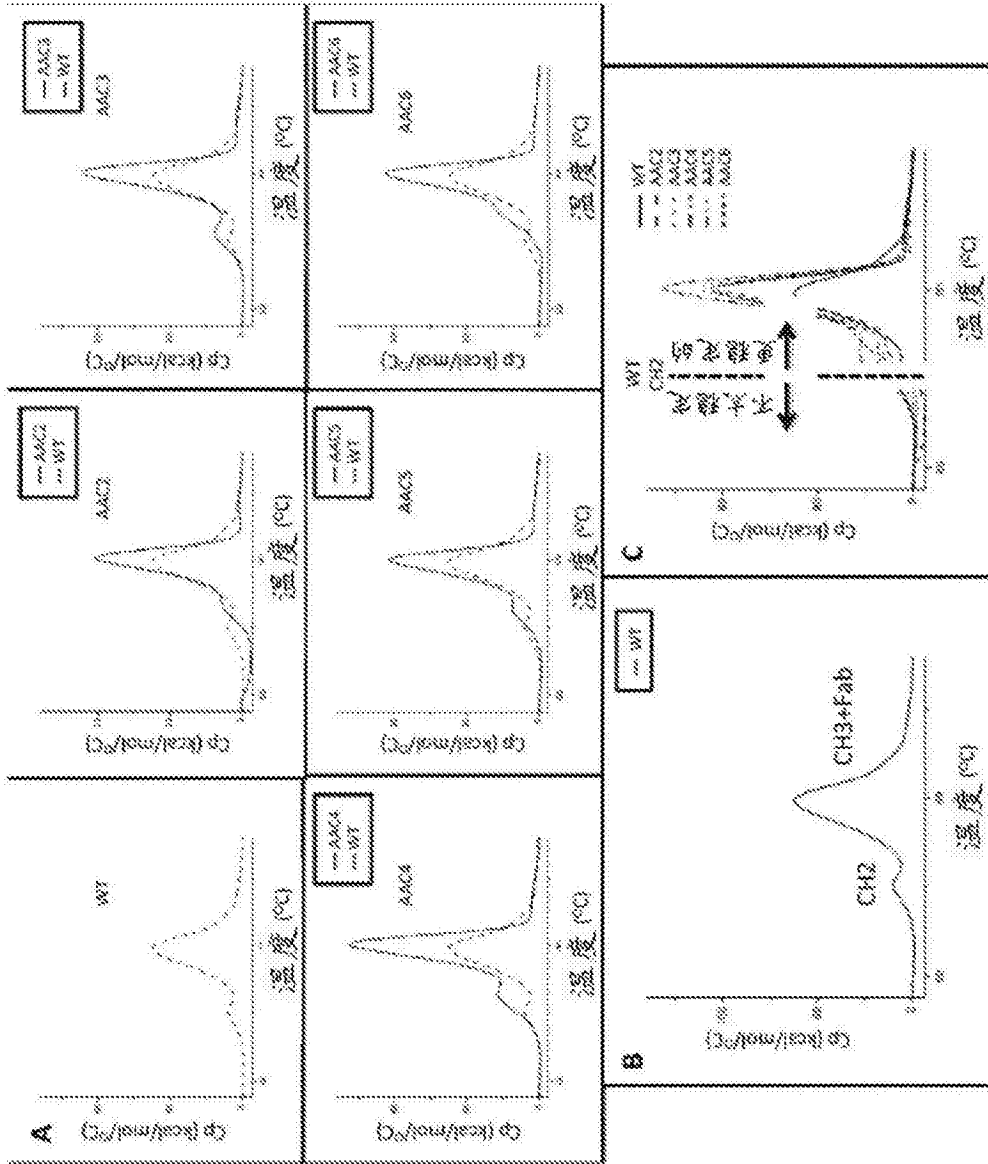


图2



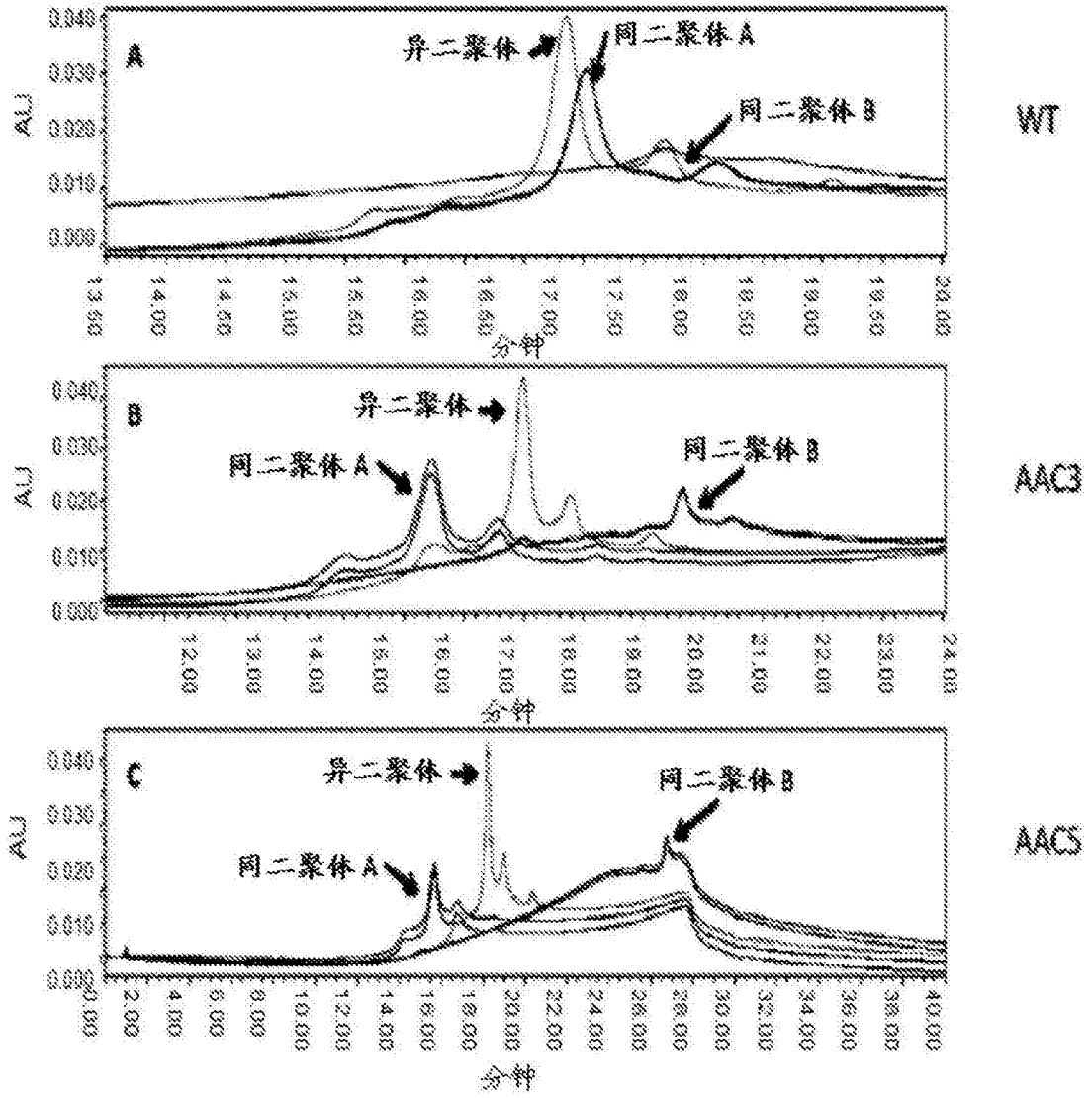


图3A

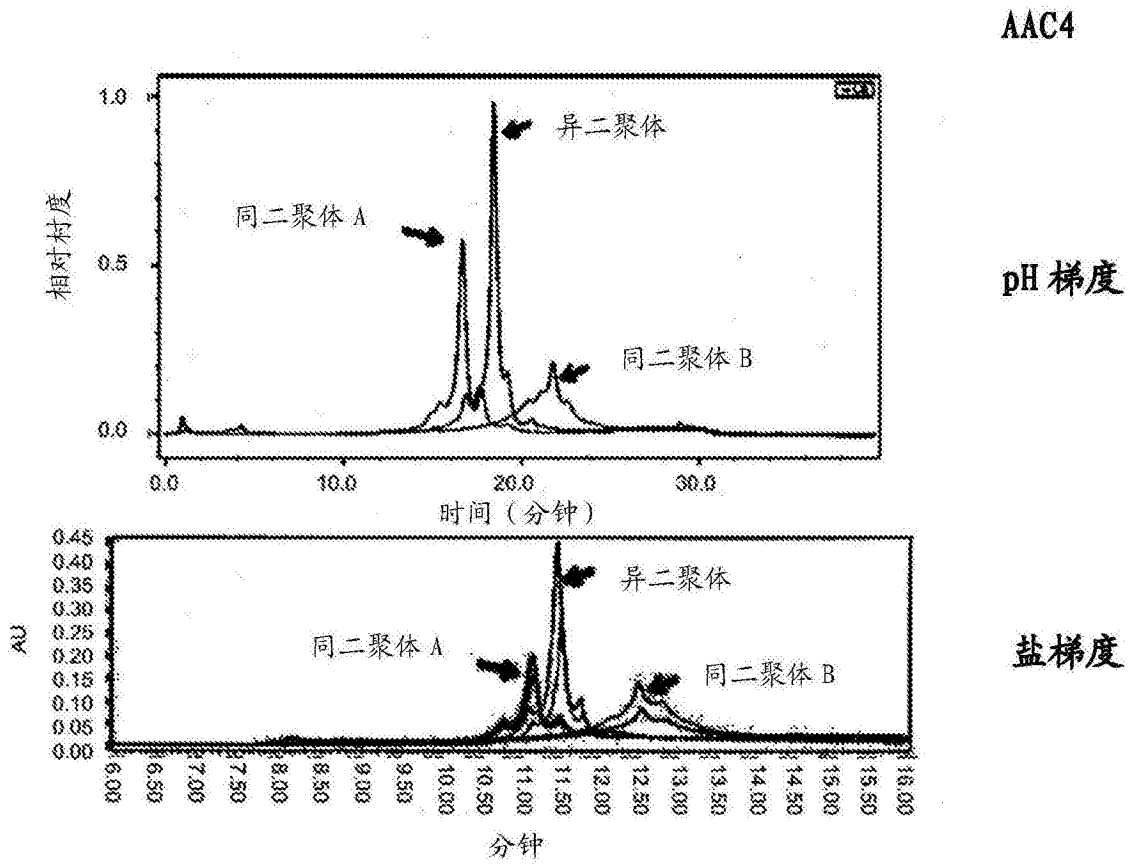


图3B

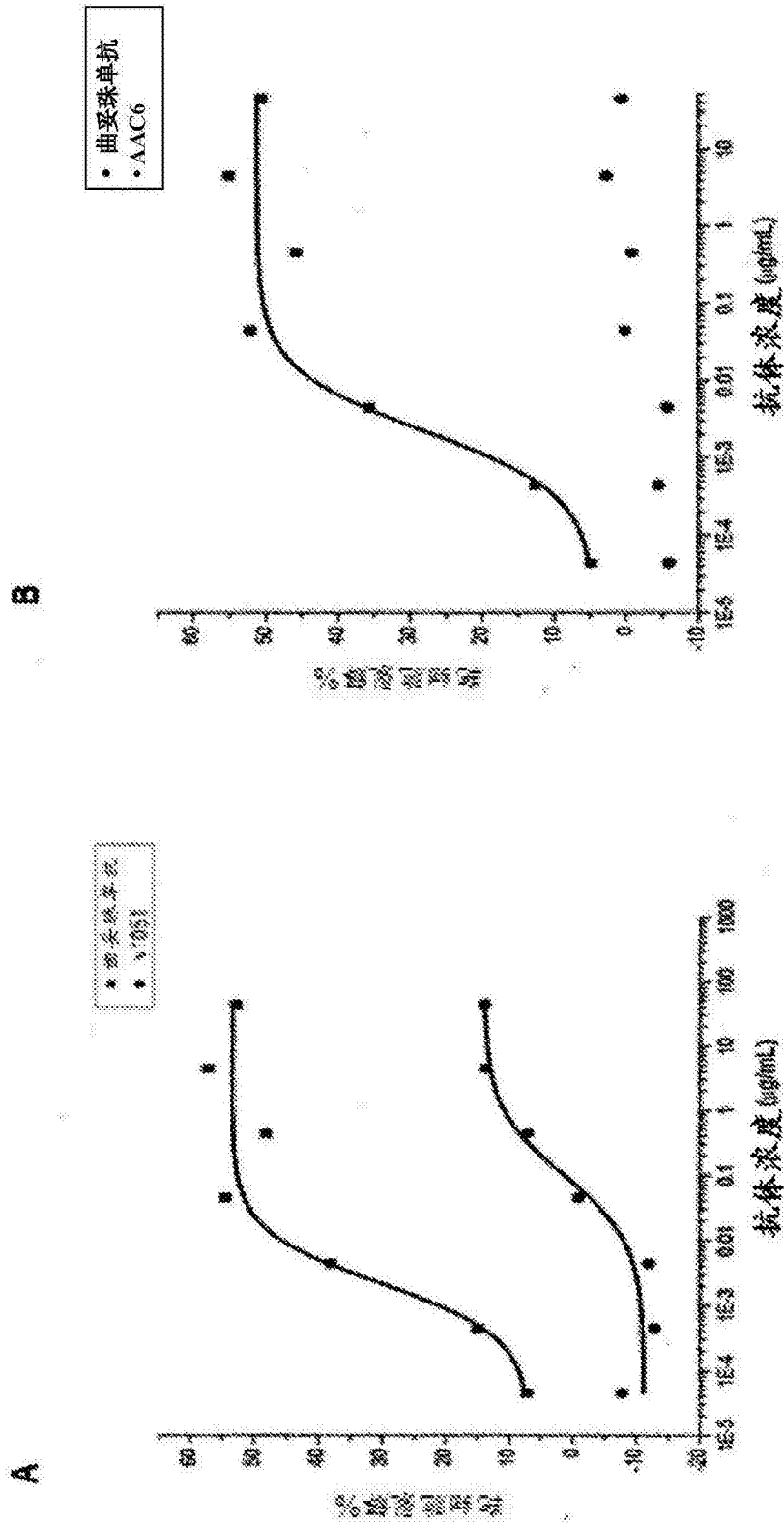


图4

**SEQ ID NO:1:**

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

**SEQ ID NO:2:**

>曲妥珠单抗\_重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR  
 YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA  
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

**SEQ ID NO:3:**

>曲妥珠单抗\_轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVP  
 SRFSGSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST  
 LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO:4:**

>利妥昔单抗+重链

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMIHWVKQTPGRRGLEWIGAIYFGNGD  
 TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGT  
 TVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF  
 PAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC  
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

**SEQ ID NO:5:**

>利妥昔单抗+轻链

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVQQKPGSSPKFWIYATSNLASGVPVR  
 FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS  
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图5

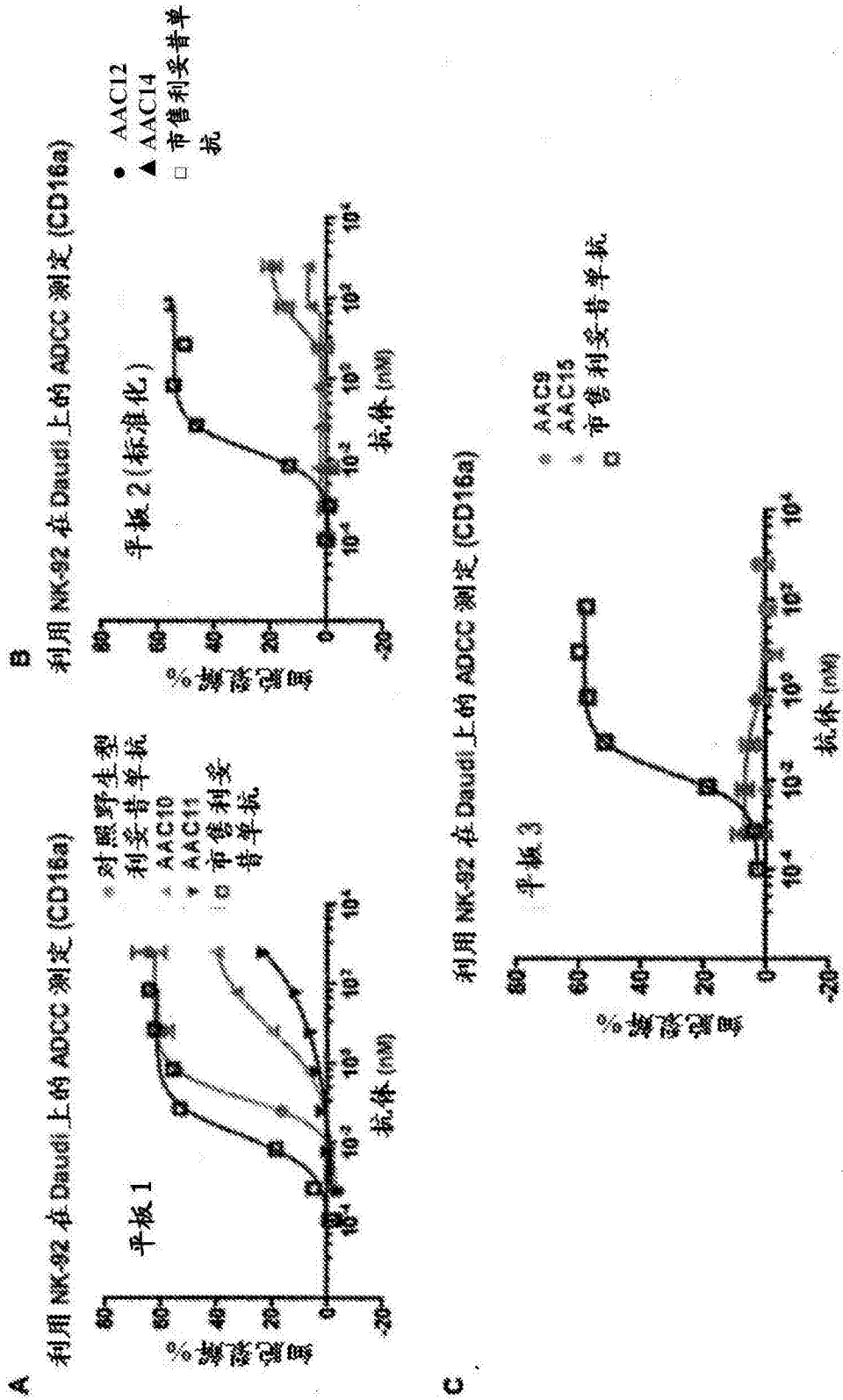


图6

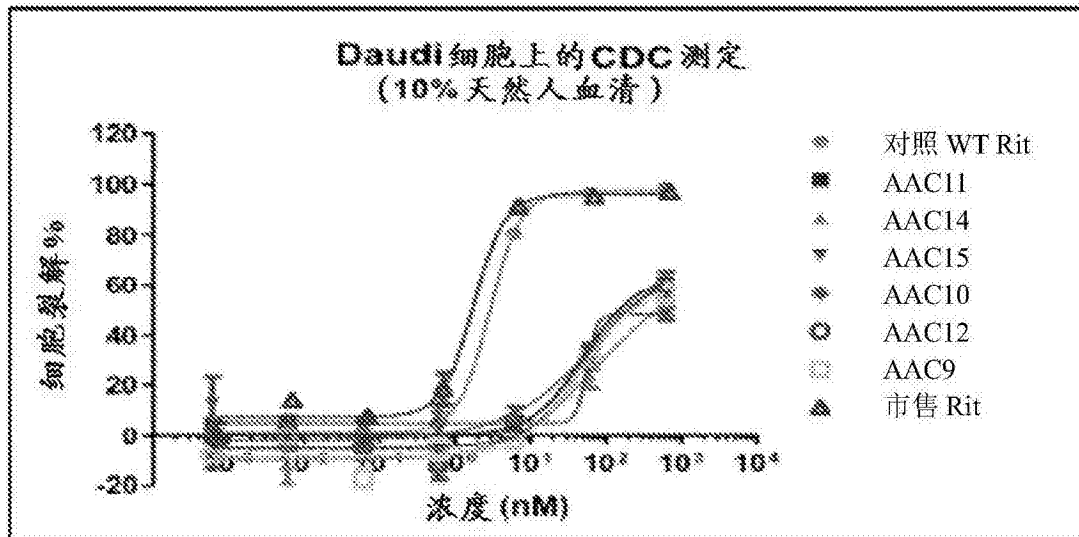


图7

SEQ ID NO:	类型	
6	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
8	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
10	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
12	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK

14	多肽	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA                  RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRW                  GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL                  VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ                  TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPAKAGGSPVFLFPPK                  PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ                  YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE                  PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFP                  PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSP                  GK</p>
16	多肽	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA                  RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRW                  GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL                  VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ                  TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP                  KDTLMISRTPEVTCVVDVSHQNPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ                  YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE                  PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFP                  PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSP                  GK</p>
18	多肽	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA                  RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRW                  GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL                  VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ                  TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP                  KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY                  NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP                  QVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFP                  VLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSP                  GK</p>
20	多肽	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA                  RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRW                  GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL                  VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ                  TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP                  KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY                  NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP                  QVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWP                  PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSP                  GK</p>
22	多肽	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA                  RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRW                  GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL                  VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ                  TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEKGGPSVFLFPPKP                  KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY                  NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP</p>



		QVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPFVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPARRGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
26	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPARRGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
28	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPARRGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
30	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPARRGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
32	多肽	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ

		<p>TYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELKGGPSVFLFPPKP                  KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY                  NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP                  QVYVLP5RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWV                  PVLDSGDG5FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC5VMHEALHNHYTQKSLSLS                  PGK</p>
35	多款	<p>QVQLQQPGAELVKPGA5VKM5CKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL5SVVTVPS5S                  LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELKGGPSVFLF                  PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR                  EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ                  PREPQVYVLP5RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK                  TTPVLDSDG5FALVSKLTVDK5RWQQGNVFC5VMHEALHNHYTQKSL                  SLS5PGK</p>
37	多款	<p>QVQLQQPGAELVKPGA5VKM5CKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL5SVVTVPS5S                  LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELKGGPSVFLF                  PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR                  EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ                  PREPQVYVLP5RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYL                  TWPPVLDSDG5FFLYSKLTVDK5RWQQGNVFC5VMHEALHNHYTQKS                  L5L5PGK</p>
39	多款	<p>QVQLQQPGAELVKPGA5VKM5CKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL5SVVTVPS5S                  LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKARG                  QPREPQVYVLP5RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN                  YKTTTPVLDSDG5FALVSKLTVDK5RWQQGNVFC5VMHEALHNHYTQ                  KSL5L5PGK</p>
41	多款	<p>QVQLQQPGAELVKPGA5VKM5CKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL5SVVTVPS5S                  LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKARG                  QPREPQVYVLP5RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY                  LTWPPVLDSDG5FFLYSKLTVDK5RWQQGNVFC5VMHEALHNHYTQK                  SLSL5PGK</p>

43	多肽	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSS                  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG                  QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN                  YKTTTPVLDSDGSAFVLSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ                  KSLSLSPGK</p>
45	多肽	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSS                  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG                  QPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY                  LTWPPVLDSDGSAFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK                  SLSLSPGK</p>
47	多肽	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSS                  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG                  QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN                  YKTTTPVLDSDGSAFVLSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ                  KSLSLSPGK</p>
49	多肽	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSS                  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG                  QPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY                  LTWPPVLDSDGSAFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK                  SLSLSPGK</p>
51	多肽	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLE                  WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC                  ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA                  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSS                  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL                  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP                  REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKG</p>

		QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSAFVLSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	多肽	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSAFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQK SLSLSPGK
55	多肽	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALWAPIEKTISKAKG QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTTTPVLDSDGSAFVLSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQK SLSLSPGK
57	多肽	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALWAPIEKTISKAKG QPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSAFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQK SLSLSPGK
59	多肽	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHKDPVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTTTPVLDSDGSAFVLSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQK SLSLSPGK
61	多肽	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS

		LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTPWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQK SLSLSPGK
63	多肽	QVQLQQPGEAEVLPKPGASVKMSCKA5GYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCEVSNKALPAPIKKTISKARG QPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
65	多肽	QVQLQQPGEAEVLPKPGASVKMSCKA5GYTFTSYNMHWVKQTPGGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCEVSNKALPAPIKKTISKARG QPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTPWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQK SLSLSPGK
67	多肽	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSRGTDFTLTISSIQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVEFIPPSDEQLK5GTA5VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
68	多肽	QIVLSQSPAILASAPGKVTMTCRASSVSIIHWFOQKPGSSPKPWYATS NLASGVVPRFSG5G5GTSYSLSIRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVEFIPPSDEQLK5GTA5VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
7	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATCAACATCAAGGAC ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC

		<p>CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGCC  GCCGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGACACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAAGTACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA  GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTT  AGTTGTTCAAGTGTGATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG  AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAA</p>
9	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAAGTCCCGCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGCC  GCCGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGACACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTGCCACCCAGCAGAGACGAAGTACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAAGATACAT  GACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA  GTTGTTCAAGTGTGATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA</p>

		GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
11	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGAC  GAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACCAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTCTGACCGTCTGCACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACCAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAAACAATTACAA  GACCACACCTCCAGTGTGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGSCAGCAGGGGAACGTGTTT  AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG  AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
13	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC</p>

		<p>CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGCCGAC  GAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA  GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTT  AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG  AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
15	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTCGGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGCAGTGAAGTCCCGCTTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTTGTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGCCAAG  GCCGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA  GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTT  AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG  AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>



17	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAAGTCAAGCCTGACACAGGCTGACTCCCTGTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTG  CTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACCAGAACCCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTCTGACCGTCTGCACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTAAATAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAAACAATTACAA  GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGSCAGCAGGGGAACGTGTTT  AGTTGTTCAAGTATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG  AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
19	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAAGTCAAGCCTGACACAGGCTGACTCCCTGTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTG  CTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCAGGAGGACCCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCG</p>

		TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCAATTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACCTGTTT AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTETCCCGGCAAA
21	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTSCACACTTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGCCCAAG AGCTETGATAAGACECACACCTGCCCTCCCTETCCAGCTCCAGAAGTG CTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCTAAGCCAAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCAATTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAAGATACAT GACCTGGCTCCAGTGTCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA GTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
23	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG

		<p>GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAAAG  AAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCAGGTTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAAGTGATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT  GACCTGGCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA  GTTGTTCAAGTATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA  GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
25	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATACACCEGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGCCAGA  AGAGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCAGGTTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAAGTGATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT</p>

		GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA GTTGTTCAAGTATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
27	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGGCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGTCCAAAGAGA AGAGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACCTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCTGAGCGTGTGACCGTGTCTGACCAAGGACTGG CTGAACGGGAAGSAGTATAAGTGCAAAAGTCAAGTAAATAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCTTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT GACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA GTTGTTCAAGTATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
29	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGGCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC

		<p>CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAAAGGCC  AAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCCTCGTGAGCGGTGCTGACCGTGCTGACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGCCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT  GACCTGGCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA  GTTGTTCAAGTATGATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA  GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
31	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTGT  CTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACAAGAGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCCTCGTGAGCGGTGCTGACCGTGCTGACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGCCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT  GACCTGGCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA  GTTGTTCAAGTATGATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA  GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>

33	DNA	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCCGCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTG  AAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTACGAGGACCCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCCG  TGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACASTACAAC  TCCACTTATCGCCTCGTGAGCGTGTGACCCTGCTGCACCAAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTCAAGTAAATAAGAAGTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGCTGTGCTGCTGGTAAAGGCTTCTATCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT  GACCTGGCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGTCTTCTCCTGTATTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA  GTTGTTCAAGTATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA  GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
34	DNA	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGCAAGTCAGGACGTTAACACCCGC  TGAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGAT  CTATTCTGCATCCTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC  AGTCGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  GAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCATTACACTACCCACCCCA  CTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCA  CCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA  CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCA  AAGTACAGTGGAAAGTGGATAAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAA  GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA  GCAGCACCTGACCGTGAAGCAGAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC  TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  AGCTTCAACAGGGGGAGAGTGT</p>
36	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA  TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT</p>

		<p>TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT  ACATGCAGCTGAGTTCACCTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTC  ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT  CCCCGTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAAACCTTCTAATACAAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACCAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGCT  GCTGGGAGSAECATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCCAAGGACAC  TCTGATGATTASCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCTGTGAGCGTCCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCAAGGTGTACGTGTACCCTCCAAGCCGCGACAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA  AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCCCCTGGTGT  CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTT  TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG  TCCCTGAGCCTGTACCCCGGCAA</p>
38	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGGEC  ATCCGTGAAAATGTCTTGAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT  AACATGCAGCTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGA  TCGGAGCAATCTACCCTGGAACCGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT  ACATGCAGCTGAGTTCACCTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTC  ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT  CCCCGTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAAACCTTCTAATACAAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACCAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGCT  GCTGGGAGSAECATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCCAAGGACAC  TCTGATGATTASCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCTGTGAGCGTCCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG</p>

		<p>GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACC  TGACTIONGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC  CAAACCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT  CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT  CCCTGAGCCTGTCACCCCGCAAA</p>
40	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAAETGGTCAAACCTGGGCG  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGG  TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCT  ACATGCAGCTGAGTTCACAGCAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGCTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCAAGTCAACCGTGGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTCACACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC  ACCGTGTCTTGAACAGTGGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT  CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATGTGCAACGTG  AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGGA  CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCGGGAGGAAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG  GCTGAACCGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA  AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT  TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG  TCCCTGAGCCTGTCACCCCGCAAA</p>
42	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGGCG  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGG  TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCT  ACATGCAGCTGAGTTCACAGCAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGCTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCAAGTCAACCGTGGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTCACACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC  ACCGTGTCTTGAACAGTGGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT</p>



		<p>CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG  AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGSACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACC  TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC  CAAACCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT  CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT  CCCTGAGCCTGTACCCGGCAA</p>
44	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGC  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA  TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGTCTCTACCCGCT  ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTCCTGCTGGCAACAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC  ACCGTGTCTTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT  CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGGA  CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGSACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTTCSTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA  AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCGCCCTGGTGT  CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT  TCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG  TCCCTGAGCCTGTACCCGGCAA</p>

<p>46</p>	<p>DNA</p>	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC                  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCCTAT                  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA                  TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGCGGACACTTCTTATAATCAGAAGT                  TAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGTCTCTACCCGCT                  ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT                  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG                  GGGGAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC                  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA                  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCGTC                  ACCGTGTCTTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTT                  CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC                  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG                  AATCACAAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA                  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGACCAAAGAG                  AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGACAC                  TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGT                  GAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAGTGTACGTGGATGGCG                  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC                  TCAACATATAGAGTCTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG                  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTTCAACAAGGCCCTGC                  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG                  GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA                  AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCAAGTGA                  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACC                  TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATT                  CAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT                  CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACCCAGAAAGT                  CCTGAGCCTGTACCCCGGCAAA</p>
<p>48</p>	<p>DNA</p>	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC                  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCCTAT                  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA                  TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGCGGACACTTCTTATAATCAGAAGT                  TAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGTCTCTACCCGCT                  ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT                  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG                  GGGGAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC                  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA                  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCGTC                  ACCGTGTCTTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTT                  CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC                  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG                  AATCACAAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA                  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGACCAAGAGGA                  CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGACAC                  TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGT                  GAGCCACAAGGACCCCGAAGTCAAATTCAGTGTACGTGGATGGCG</p>

		TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCCGAGAACAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAASTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCTGAGCCTGTCACCCGGCAA
50	DNA	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTTCCAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGCGCGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCAACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCACCTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCTGGGATGTCTGTTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACCAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACAAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCCGAGAACAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC CAAACGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCACCCGGCAA
52	DNA	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTTCCAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGCGCGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG

		<p>GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC  ACCGTGTCTTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT  CCCCGTGTGCTGCAGTETAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAACCTTCTAATAACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTCTGCACCAGAGGA  CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCACCCCAAACCCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAATCAACTGTTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCTGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGACTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA  AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT  TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG  TCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAA</p>
54	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTEGGCTACACATTCACTTCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA  TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTTACCGCCT  ACATGCAGCTGAGTTCCTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC  ACCGTGTCTTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT  CCCCGTGTGCTGCAGTETAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAACCTTCTAATAACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTCTGCACCAAAGAG  AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCACCCCAAACCCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAATCAACTGTTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCTGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACC</p>

		TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTCTGTATTC CAAACCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAA
56	DNA	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCCTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGG TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGCGCGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCAGTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT CCCCGTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAAACCTTCTAATACAAAAGGTCGACAAGAAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGACCCAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAAACCCAAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGT GGGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGSCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGSGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCGCCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAA
58	DNA	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCCTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGG TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGCGCGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCAGTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT

		<p>CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTE                  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG                  AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA                  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG                  AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCACCCAAACCCAAGGACAC                  TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGTGGACGT                  GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG                  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC                  TCAACATATAGAGTTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG                  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGT                  GGGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG                  GAACCACAGGTGTACGTGTGCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA                  AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA                  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAAACAATTACC                  TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC                  CAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT                  CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT                  CCTGAGCCTGTCAACCCGGCAAA</p>
60	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC                  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCCTAT                  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA                  TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT                  TTAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT                  ACATGCAGCTGAGTTCACGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT                  GCGCCAGAAACCACTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG                  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC                  AAGCGTGTTCACCTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA                  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC                  ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT                  CCCGTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTE                  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG                  AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA                  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACCAAGGA                  CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCACCCAAACCCAAGGACAC                  TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGTGAGCGT                  GAGCCACAAGGACCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG                  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC                  TCAACATATAGAGTTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG                  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGT                  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG                  GAACCACAGGTGTACGTGTACCCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA                  AAACCAGGTCTCCCTGACTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA                  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAAACAATTACA                  AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCGCTTGGTGT                  CCAAAGTACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT                  TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG                  TCCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAAA</p>

62	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTTCCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA  TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT  ACATGCAGCTGAGTTCACCTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCAAGTGGCAACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCCGTC  ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTT  CCCCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG  AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGAGCGT  GAGCCACAAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCCGACCGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACC  TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTCTGTATT  CAAACGACCGTGGATAAGTCTCGSTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT  CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT  CCCTGAGCCTGTCACCCGGCAAA</p>
64	DNA	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTTCCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGAA  TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT  ACATGCAGCTGAGTTCACCTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCAAGTGGCAACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCCGTC  ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTT  CCCCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAGGA  CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGAGCGT  GAGCCACAAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG</p>

		TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTSAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCAAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCCGAGAACAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCTGAGCCTGTACCCCGCAA
66	DNA	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCCSCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCAGTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTT CCCCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGTGAGCGT GAGCCACAAGGACCCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTSAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCAAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTGCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCCGAGAACAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATT CAAACCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTACCCCGCAA
69	DNA	CAGATTGCCTGTCTCAGAGTCCCGCTATCCTGTAGCAAGCCCTGGG GAGAAGGTGACCATGACATGCCGAGCCAGCTCCTGTGCAGCTACATC CACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCAGTTCACCTAAACCATGGATCTAC GCCACATCTAACCTGGCTAGTGGAGTGCCTGTCGGTTTTCCGGCTCT GGGASTGGAACATCATAAGCCTGACTATTTCCAGAGTGGAGGCCGA AGACGCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGACCTTAATCCCCCTAC ATTCCGGCGGGGAACATAAGCTGGAGATCAAAGGACTGTGGCAGCC



	CCTTCTGTCTTCATTTTTCCACCCAGTGACGAACAGCTGAAATCAGGAA CCGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCAA AGGTGCAGTGAAAAGTCGATAACGECCTGCAGTCCGGCAATTCTCAG GAGAGTGTGACCGAACAGGACTCAAAGGATAGCACATATCCCTGAG CTCCACTGTGACCCGTCCAAAAGCTGATTACGAAAAGCATAAAGTSTA TGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGTAGTCCCGTCACAAAGA GTTTCAATAGAGGAGAGTGT
--	---

图8