(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114258431 A
(43)申请公布日 2022.03.29

(21)申请号 202080058167.7
(22)申请日 2020.07.03
(30)优先权数据
62/870,403 2019.07.03 US
62/957,011 2020.01.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/040828 2020.07.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/003469 EN 2021.01.07
(71)申请人 帕利昂制药有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 彭力 曹立志
桑迪普·A·谢尔克
安德鲁·S·特纳 徐丽慧
(74)专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627
代理人 杨剑 吴立
(51)Int.Cl.
C12Q 1/34(2006.01)
A61K 38/47(2006.01)

权利要求书9页 说明书147页 附图31页

(54)发明名称

重组人唾液酸酶、唾液酸酶融合蛋白及其使用方法

(57)摘要

本发明总体涉及重组人唾液酸酶和重组唾液酸酶融合蛋白，其中所述唾液酸酶与野生型人唾液酸酶相比任选地含有一个或多个突变，例如至少一个氨基酸的替换、缺失或添加。本发明还提供了包含唾液酸酶和抗体或其部分的抗体偶联物。本发明还涉及使用所述唾液酸酶融合蛋白或抗体偶联物治疗癌症的方法。

CN 114258431 A

1.一种重组突变人唾液酸酶,其中所述唾液酸酶包含:

(a)在对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处脯氨酸残基(P5)的替换;

(b)在对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处赖氨酸残基(K9)的替换;

(c)在对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处赖氨酸残基(K44)的替换;

(d)在对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处赖氨酸残基(K45)的替换;

(e)在对应于野生型人类Neu2的第54位的位置处亮氨酸残基(L54)的替换;

(f)在对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处脯氨酸残基(P62)的替换;

(g)在对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处谷氨酰胺残基(Q69)的替换;

(h)在对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处精氨酸残基(R78)的替换;

(i)在对应于野生型人类Neu2的第80位的位置处天冬氨酸残基(D80)的替换;

(j)在对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处丙氨酸残基(A93)的替换;

(k)在对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处甘氨酸残基(G107)的替换;

(l)在对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处谷氨酰胺残基(Q108)的替换;

(m)在对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处谷氨酰胺残基(Q112)的替换;

(n)在对应于野生型人类Neu2的第125位的位置处半胱氨酸残基(C125)的替换;

(o)在对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处谷氨酰胺残基(Q126)的替换;

(p)在对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处丙氨酸残基(A150)的替换;

(q)在对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处半胱氨酸残基(C164)的替换;

(r)在对应于野生型人类Neu2的第170位的位置处精氨酸残基(R170)的替换;

(s)在对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处丙氨酸残基(A171)的替换;

(t)在对应于野生型人类Neu2的第188位的位置处谷氨酰胺残基(Q188)的替换;

(u)在对应于野生型人类Neu2的第189位的位置处精氨酸残基(R189)的替换;

(v)在对应于野生型人类Neu2的第213位的位置处丙氨酸残基(A213)的替换;

(w)在对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处亮氨酸残基(L217)的替换;

(x)在对应于野生型人类Neu2的第225位的位置处谷氨酸残基(E225)的替换;

(y)在对应于野生型人类Neu2的第239位的位置处组氨酸残基(H239)的替换;

(z)在对应于野生型人类Neu2的第240位的位置处亮氨酸残基(L240)的替换;

(aa)在对应于野生型人类Neu2的第241位的位置处精氨酸残基(R241)的替换;

(bb)在对应于野生型人类Neu2的第242位的位置处丙氨酸残基(A242)的替换;

(cc)在对应于野生型人类Neu2的第244位的位置处缬氨酸残基(V244)的替换;

(dd)在对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处苏氨酸残基(T249)的替换;

(ee)在对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处天冬氨酸残基(D251)的替换;

(ff)在对应于野生型人类Neu2的第257位的位置处谷氨酸残基(E257)的替换;

(gg)在对应于野生型人类Neu2的第258位的位置处丝氨酸残基(S258)的替换;

(hh)在对应于野生型人类Neu2的第260位的位置处亮氨酸残基(L260)的替换;

(ii)在对应于野生型人类Neu2的第265位的位置处缬氨酸残基(V265)的替换;

(jj)在对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处谷氨酰胺残基(Q270)的替换;

(kk)在对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处色氨酸残基(W292)的替换;

(ll)在对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处丝氨酸残基(S301)的替换;

(mm)在对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处色氨酸残基(W302)的替换；

(nn)在对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处缬氨酸残基(V363)的替换;或

(oo)在对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处亮氨酸残基(L365)的替换；

或任何上述替换的组合。

2.权利要求1所述的唾液酸酶,其中所述唾液酸酶包含：

(a)在对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处脯氨酸残基(P5)的替换；

(b)在对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处赖氨酸残基(K9)的替换；

(c)在对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处赖氨酸残基(K44)的替换；

(d)在对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处赖氨酸残基(K45)的替换；

(e)在对应于野生型人类Neu2的第54位的位置处亮氨酸残基(L54)的替换；

(f)在对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处脯氨酸残基(P62)的替换；

(g)在对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处谷氨酰胺残基(Q69)的替换；

(h)在对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处精氨酸残基(R78)的替换；

(i)在对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处丙氨酸残基(A93)的替换；

(j)在对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处甘氨酸残基(G107)的替换；

(k)在对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处谷氨酰胺残基(Q108)的替换；

(l)在对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处谷氨酰胺残基(Q112)的替换；

(m)在对应于野生型人类Neu2的第125位的位置处半胱氨酸残基(C125)的替换；

(n)在对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处谷氨酰胺残基(Q126)的替换；

(o)在对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处丙氨酸残基(A150)的替换；

(p)在对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处半胱氨酸残基(C164)的替换；

(q)在对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处丙氨酸残基(A171)的替换；

(r)在对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处亮氨酸残基(L217)的替换；

(s)在对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处苏氨酸残基(T249)的替换；

(t)在对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处天冬氨酸残基(D251)的替换；

(u)在对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处谷氨酰胺残基(Q270)的替换；

(v)在对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处色氨酸残基(W292)的替换；

(w)在对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处丝氨酸残基(S301)的替换；

(x)在对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处色氨酸残基(W302)的替换；

(y)在对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处缬氨酸残基(V363)的替换;或

(z)在对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处亮氨酸残基(L365)的替换；

或任何上述替换的组合。

3.权利要求1或2所述的唾液酸酶,其中所述唾液酸酶包含K9、P62、A93、Q216、A242、Q270、S301、W302、V363或L365的替换或任何上述替换的组合。

4.权利要求1-3中的任一项所述的唾液酸酶,其中所述唾液酸酶包含K9、P62、A93、Q270、S301、W302、V363或L365的替换或任何上述替换的组合。

5.权利要求1-4中的任一项所述的唾液酸酶,其中在所述唾液酸酶中：

(a)对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处的脯氨酸残基被组氨酸替换(P5H)；

(b)对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处的赖氨酸残基被天冬氨酸替换(K9D)；

(c)对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处的赖氨酸残基被精氨酸(K44R)或谷氨酸(K44E)替换；

(d)对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处的赖氨酸残基被丙氨酸(K45A)、精氨酸(K45R)或谷氨酸(K45E)替换；

(e)对应于野生型人类Neu2的第54位的位置处的亮氨酸残基被甲硫氨酸替换(L54M)；

(f)对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处的脯氨酸残基被天冬酰胺(P62N)、天冬氨酸(P62D)、组氨酸(P62H)、谷氨酸(P62E)、甘氨酸(P62G)、丝氨酸(P62S)或苏氨酸(P62T)替换；

(g)对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q69H)；

(h)对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处的精氨酸残基被赖氨酸替换(R78K)；

(i)对应于野生型人类Neu2的第80位的位置处的天冬氨酸残基被脯氨酸替换(D80P)；

(j)对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处的丙氨酸残基被谷氨酸(A93E)或赖氨酸(A93K)替换；

(k)对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处的甘氨酸残基被天冬氨酸替换(G107D)；

(l)对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q108H)；

(m)对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处的谷氨酰胺残基被精氨酸(Q112R)或赖氨酸(Q112K)替换；

(n)对应于野生型人类Neu2的第125位的位置处的半胱氨酸残基被亮氨酸替换(C125L)；

(o)对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处的谷氨酰胺残基被亮氨酸(Q126L)、谷氨酸(Q126E)、苯丙氨酸(Q126F)、组氨酸(Q126H)、异亮氨酸(Q126I)或酪氨酸(Q126Y)替换；

(p)对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处的丙氨酸残基被缬氨酸替换(A150V)；

(q)对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处的半胱氨酸残基被甘氨酸替换(C164G)；

(r)对应于野生型人类Neu2的第170位的位置处的精氨酸残基被脯氨酸替换(R170P)；

(s)对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处的丙氨酸残基被甘氨酸替换(A171G)；

(t)对应于野生型人类Neu2的第188位的位置处的谷氨酰胺残基被脯氨酸替换(Q188P)；

(u)对应于野生型人类Neu2的第189位的位置处的精氨酸残基被脯氨酸替换(R189P)；

(v)对应于野生型人类Neu2的第213位的位置处的丙氨酸残基被半胱氨酸(A213C)、天冬酰胺(A213N)、丝氨酸(A213S)或苏氨酸(A213T)替换；

(w)对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处的亮氨酸残基被丙氨酸(L217A)或缬氨酸(L217V)替换；

(x)对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处的苏氨酸残基被丙氨酸替换(T249A)；

(y)对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处的天冬氨酸残基被甘氨酸替换(D251G)；

(z)对应于野生型人类Neu2的第225位的位置处的谷氨酸残基被脯氨酸替换(E225P)；

(aa)对应于野生型人类Neu2的第239位的位置处的组氨酸残基被脯氨酸替换(H239P)；

(bb)对应于野生型人类Neu2的第240位的位置处的亮氨酸残基被天冬氨酸(L240D)、天冬酰胺(L240N)或酪氨酸(L240Y)替换；

(cc)对应于野生型人类Neu2的第241位的位置处的精氨酸残基被丙氨酸(R241A)、天冬氨酸(R241D)、亮氨酸(R241L)、谷氨酰胺(R241Q)或酪氨酸(R241Y)替换；

(dd)对应于野生型人类Neu2的第242位的位置处的丙氨酸残基被半胱氨酸(A242C)、苯丙氨酸(A242F)、甘氨酸(A242G)、组氨酸(A242H)、异亮氨酸(A242I)、赖氨酸(A242K)、亮氨酸(A242L)、甲硫氨酸(A242M)、天冬酰胺(A242N)、谷氨酰胺(A242Q)、精氨酸(A242R)、丝氨酸(A242S)、缬氨酸(A242V)、色氨酸(A242W)或酪氨酸(A242Y)替换；

(ee)对应于野生型人类Neu2的第244位的位置处的缬氨酸残基被异亮氨酸(V244I)或脯氨酸(V244P)替换；

(ff)对应于野生型人类Neu2的第257位的位置处的谷氨酸残基被脯氨酸替换(E257P)；

(gg)对应于野生型人类Neu2的第258位的位置处的丝氨酸残基被半胱氨酸替换(S258C)；

(hh)对应于野生型人类Neu2的第260位的位置处的亮氨酸残基被天冬氨酸(L260D)、苯丙氨酸(L260F)、谷氨酰胺(L260Q)或苏氨酸(L260T)替换；

(ii)对应于野生型人类Neu2的第265位的位置处的缬氨酸残基被苯丙氨酸替换(V265F)；

(jj)对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处的谷氨酰胺残基被丙氨酸(Q270A)、组氨酸(Q270H)、苯丙氨酸(Q270F)、脯氨酸(Q270P)、丝氨酸(Q270S)或苏氨酸(Q270T)替换；

(kk)对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处的色氨酸残基被精氨酸替换(W292R)；

(ll)对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处的丝氨酸残基被丙氨酸(S301A)、天冬氨酸(S301D)、谷氨酸(S301E)、苯丙氨酸(S301F)、组氨酸(S301H)、赖氨酸(S301K)、亮氨酸(S301L)、甲硫氨酸(S301M)、天冬酰胺(S301N)、脯氨酸(S301P)、谷氨酰胺(S301Q)、精氨酸(S301R)、苏氨酸(S301T)、缬氨酸(S301V)、色氨酸(S301W)或酪氨酸(S301Y)替换；

(mm)对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处的色氨酸残基被丙氨酸(W302A)、天冬氨酸(W302D)、苯丙氨酸(W302F)、甘氨酸(W302G)、组氨酸(W302H)、异亮氨酸(W302I)、赖氨酸(W302K)、亮氨酸(W302L)、甲硫氨酸(W302M)、天冬酰胺(W302N)、脯氨酸(W302P)、谷氨酰胺(W302Q)、精氨酸(W302R)、丝氨酸(W302S)、苏氨酸(W302T)、缬氨酸(W302V)或酪氨酸(W302Y)替换；

(nn)对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处的缬氨酸残基被精氨酸替换(V363R)；或

(oo)对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处的亮氨酸残基被谷氨酰胺(L365Q)、组氨酸(L365H)、异亮氨酸(L365I)、赖氨酸(L365K)或丝氨酸(L365S)替换；

或所述唾液酸酶包含任何上述替换的组合。

6.权利要求1-5中的任一项所述的唾液酸酶，其中在所述唾液酸酶中：

(a)对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处的脯氨酸残基被组氨酸替换(P5H)；

(b)对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处的赖氨酸残基被天冬氨酸替换(K9D)；

(c)对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处的赖氨酸残基被精氨酸(K44R)或谷氨酸

(K44E)替换；

(d)对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处的赖氨酸残基被丙氨酸(K45A)、精氨酸(K45R)或谷氨酸(K45E)替换；

(e)对应于野生型人类Neu2的第54位的位置处的亮氨酸残基被甲硫氨酸替换(L54M)；

(f)对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处的脯氨酸残基被天冬酰胺(P62N)、天冬氨酸(P62D)、组氨酸(P62H)、谷氨酸(P62E)、甘氨酸(P62G)、丝氨酸(P62S)或苏氨酸(P62T)替换；

(g)对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q69H)；

(h)对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处的精氨酸残基被赖氨酸替换(R78K)；

(i)对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处的丙氨酸残基被谷氨酸(A93E)或赖氨酸(A93K)替换；

(j)对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处的甘氨酸残基被天冬氨酸替换(G107D)；

(k)对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q108H)；

(l)对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处的谷氨酰胺残基被精氨酸(Q112R)或赖氨酸(Q112K)替换；

(m)对应于野生型人类Neu2的第125位的位置处的半胱氨酸残基被亮氨酸替换(C125L)；

(n)对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处的谷氨酰胺残基被亮氨酸替换(Q126L)；

(o)对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处的丙氨酸残基被缬氨酸替换(A150V)；

(p)对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处的半胱氨酸残基被甘氨酸替换(C164G)；

(q)对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处的丙氨酸残基被甘氨酸替换(A171G)；

(r)对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处的亮氨酸残基被丙氨酸(L217A)或缬氨酸(L217V)替换；

(s)对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处的苏氨酸残基被丙氨酸替换(T249A)；

(t)对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处的天冬氨酸残基被甘氨酸替换(D251G)；

(u)对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处的谷氨酰胺残基被丙氨酸(Q270A)、组氨酸(Q270H)、苯丙氨酸(Q270F)或脯氨酸(Q270P)替换；

(v)对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处的色氨酸残基被精氨酸替换(W292R)；

(w)对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处的丝氨酸残基被精氨酸替换(S301R)；

(x)对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处的色氨酸残基被赖氨酸替换(W302K)；

(y)对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处的缬氨酸残基被精氨酸替换(V363R)；或

(z)对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处的亮氨酸残基被谷氨酰胺(L365Q)、组氨酸(L365H)、异亮氨酸(L365I)、赖氨酸(L365K)或丝氨酸(L365S)替换；

或所述唾液酸酶包含任何上述替换的组合。

7.权利要求1-6中的任一项所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶包含选自K9D、P62G、P62N、P62S、P62T、A93E、Q126Y、A242F、A242W、A242Y、Q270A、Q270T、S301A、S301R、W302K、W302R、V363R和L365I的替换或任何上述替换的组合。

8.权利要求1-7中的任一项所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶包含选自K9D、P62G、P62N、P62S、P62T、A93E、Q270A、S301R、W302K、V363R和L365I替换的替换或任何上述替换的组合。

9.权利要求1-8中的任一项所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶还包含：

(a)对应于野生型人类Neu2的第1位的位置处的甲硫氨酸残基(M1)的替换或缺失；

(b)对应于野生型人类Neu2的第6位的位置处的缬氨酸残基(V6)的替换；

(c)对应于野生型人类Neu2的第187位的位置处的异亮氨酸残基(I187)的替换；或

(d)对应于野生型人类Neu2的第332位的位置处的半胱氨酸残基(C332)的替换；

或任何上述替换的组合。

10.权利要求9所述的唾液酸酶，其中在所述唾液酸酶中：

(a)所述对应于野生型人类Neu2的第1位的位置处的甲硫氨酸残基被缺失(ΔM1)、被丙氨酸替换(M1A)或被天冬氨酸替换(M1D)；

(b)所述对应于野生型人类Neu2的第6位的位置处的缬氨酸残基被酪氨酸替换(V6Y)；

(c)所述对应于野生型人类Neu2的第187位的位置处的异亮氨酸残基被赖氨酸替换(I187K)；或

(d)所述对应于野生型人类Neu2的第332位的位置处的半胱氨酸残基被丙氨酸替换(C332A)；

或者所述唾液酸酶包含任何上述替换的组合。

11.权利要求10所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶包含：

(a)M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K和C332A替换；

(b)M1D、V6Y、K9D、A93E、I187K、C332A、V363R和L365I替换；

(c)M1D、V6Y、P62N、I187K和C332A替换；

(d)M1D、V6Y、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换；

(e)M1D、V6Y、P62S、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换；

(f)M1D、V6Y、P62T、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换；

(g)M1D、V6Y、P62N、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换；

(h)M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、W302R和C332A替换；

(i)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、Q270T和C332A替换；

(j)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K和C332A替换；或

(k)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、A242F、Q270T和C332A替换。

12.权利要求10所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶包含：

(a)M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K和C332A替换；

(b)M1D、V6Y、K9D、A93E、I187K、C332A、V363R和L365I替换；

(c)M1D、V6Y、P62N、I187K和C332A替换；

(d)M1D、V6Y、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换；

(e)M1D、V6Y、P62S、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换；

(f)M1D、V6Y、P62T、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换；或

(g)M1D、V6Y、P62N、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换。

13.权利要求1-12中的任一项所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶选自Neu1、Neu2、Neu3和Neu4。

14.权利要求13所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶是Neu2。

15.权利要求1-14中的任一项所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶具有与相应的野生型唾液酸酶不同的底物特异性。

16.权利要求15所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶可以切开α2,3、α2,6和/或α2,8键连接。

17.权利要求15或16所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶可以切开α2,3和α2,8键连接。

18.权利要求1-17中的任一项所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶包含SEQ ID NOs：48-54、149、154、159或191中的任一者。

19.权利要求1-17中的任一项所述的唾液酸酶，其中所述唾液酸酶包含SEQ ID NOs：48-54中的任一者。

20.一种重组突变人唾液酸酶，其包含在表5-9、11-13或15-30中的任一者中阐述的突变或突变的组合，任选地还包含在表1-4中的任一者中阐述的突变或突变的组合。

21.一种融合蛋白，其包含：

(a)权利要求1-20中的任一项所述的重组突变人唾液酸酶；和

(b)免疫球蛋白Fc结构域和/或免疫球蛋白抗原结合结构域；

其中所述唾液酸酶与所述免疫球蛋白Fc结构域和/或免疫球蛋白抗原结合结构域通过肽键或氨基酸连接物相连。

22.权利要求21所述的融合蛋白，其中所述融合蛋白包含免疫球蛋白Fc结构域。

23.权利要求22所述的融合蛋白，其中所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM Fc结构域。

24.权利要求23所述的融合蛋白，其中所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc结构域。

25.权利要求24所述的融合蛋白，其中所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人类IgG1 Fc结构域。

26.权利要求21-25中的任一项所述的融合蛋白，其中所述融合蛋白包含免疫球蛋白抗原结合结构域。

27.权利要求26所述的融合蛋白，其中所述免疫球蛋白抗原结合结构域与第二免疫球蛋白抗原结合结构域结合，以产生抗原结合部位。

28.权利要求26或27所述的融合蛋白，其中所述免疫球蛋白抗原结合结构域源自于选自曲妥珠单抗、达雷木单抗、吉伦妥昔单抗、奥法木单抗、阿维单抗和利妥昔单抗的抗体。

29.一种抗体偶联物，其包含权利要求21-28中的任一项所述的融合蛋白。

30.权利要求29所述的抗体偶联物，其中所述抗体偶联物包含单个唾液酸酶。

31.权利要求30所述的抗体偶联物，其中所述抗体偶联物包含两个唾液酸酶。

32.权利要求31所述的抗体偶联物，其中所述两个唾液酸酶是相同的。

33.权利要求29-32中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述抗体偶联物包含单个抗原结合部位。

34.权利要求29-33中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述抗体偶联物包含两个抗原结合部位。

35.权利要求34所述的抗体偶联物,其中所述两个抗原结合部位是相同的。

36.权利要求29-35中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述抗体偶联物具有约135kDa至约165kDa的分子量。

37.权利要求29-35中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述抗体偶联物具有约215kDa至约245kDa的分子量。

38.权利要求29-37中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述抗体偶联物包含:

(a)包含免疫球蛋白轻链的第一多肽;

(b)包含免疫球蛋白重链的第二多肽;和

(c)包含免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶的第三多肽;

其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽被连接在一起,并且其中所述第一多肽和第二多肽一起定义抗原结合部位。

39.权利要求38所述的抗体偶联物,其中所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。

40.权利要求29-37中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述融合蛋白包含:

(a)包含第一免疫球蛋白轻链的第一多肽;

(b)包含第一免疫球蛋白重链和第一唾液酸酶的第二多肽;

(c)包含第二免疫球蛋白重链和第二唾液酸酶的第三多肽;和

(d)包含第二免疫球蛋白轻链的第四多肽;

其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,所述第三和第四多肽被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽被共价连接在一起,并且其中所述第一多肽和第二多肽一起定义第一抗原结合部位,并且所述第三多肽和第四多肽一起定义第二抗原结合部位。

41.权利要求40所述的抗体偶联物,其中所述第二和第三多肽分别以N-至C-端的方向包含所述第一和第二免疫球蛋白重链和所述第一和第二唾液酸酶。

42.权利要求29-37中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述融合蛋白包含:

(a)包含第一唾液酸酶、第一免疫球蛋白Fc结构域和第一单链可变片段(scFv)的第一多肽;和

(b)包含第二唾液酸酶、第二免疫球蛋白Fc结构域和第二单链可变片段(scFv)的第二多肽;

其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,并且其中所述第一scFv定义第一抗原结合部位,并且所述第二scFv定义第二抗原结合部位。

43.权利要求42所述的抗体偶联物,其中所述第一多肽以N-至C-端的方向包含所述第一唾液酸酶、第一免疫球蛋白Fc结构域和第一scFv,并且所述第二多肽以N-至C-端的方向包含所述第二唾液酸酶、第二免疫球蛋白Fc结构域和第二scFv。

44.权利要求29-37中的任一项所述的抗体偶联物,其中所述抗体偶联物包含:

(a)包含免疫球蛋白轻链的第一多肽;

(b)包含免疫球蛋白重链和单链可变片段(scFv)的第二多肽;和

(c)包含免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶的第三多肽;

其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽被共价连接在一起,并且其中所述免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链一起定义第一抗原结合部位,并且所述scFv定义第二抗原结合部位。

45.权利要求44所述的抗体偶联物,其中所述第二多肽以N-至C-端的方向包含所述免疫球蛋白重链和scFv,并且所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。

46.一种分离的核酸,其包含编码权利要求1-20中的任一项所述的重组突变人唾液酸酶、权利要求21-28中的任一项所述的融合蛋白或权利要求29-45中的任一项所述的抗体偶联物的至少一部分的核苷酸序列。

47.一种表达载体,其包含权利要求46所述的核酸。

48.一种宿主细胞,其包含权利要求47所述的表达载体。

49.一种药物组合物,其包含权利要求1-20中的任一项所述的重组突变人唾液酸酶、权利要求21-28中的任一项所述的融合蛋白或权利要求29-45中的任一项所述的抗体偶联物。

50.一种在需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者给药有效量的权利要求1-20中的任一项所述的重组突变人唾液酸酶、权利要求21-28中的任一项所述的融合蛋白、权利要求29-45中的任一项所述的抗体偶联物或权利要求49所述的药物组合物。

51.权利要求50所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤、软组织肿瘤、造血系肿瘤或转移性病变。

52.权利要求51所述的方法,其中所述实体肿瘤是肉瘤、腺癌或癌。

53.权利要求51或52所述的方法,其中所述实体肿瘤是头颈部(例如咽)、甲状腺、肺(例如小细胞或非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺、淋巴、胃肠道(例如口腔、食道、胃、肝、胰腺、小肠、结肠和直肠、肛管)、生殖或泌尿生殖道(例如肾、尿路上皮、膀胱、卵巢、子宫、宫颈、子宫内膜、前列腺、睾丸)、CNS(例如神经或神经胶质细胞,例如神经母细胞瘤或神经胶质瘤)或皮肤(例如黑色素瘤)肿瘤。

54.权利要求51所述的方法,其中所述造血系肿瘤是白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、B-细胞、T-细胞或FAB ALL、急性髓系白血病(AML)、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)例如转移CLL、弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓增生异常综合征(MDS)、淋巴瘤、霍奇金病、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤或Richter's综合征(Richter's转化)。

重组人唾液酸酶、唾液酸酶融合蛋白及其使用方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年7月3日提交的美国临时专利申请系列号62/870,403和2020年1月3日提交的美国临时专利申请系列号62/957,011的利益和优先权,每个所述临时申请的全部内容整体通过参考并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总的来说涉及重组人唾液酸酶和重组唾液酸酶融合蛋白以及它们在治疗癌症中的用途。

背景技术

[0004] 越来越多的证据支持聚糖、特别是唾液酸聚糖在肿瘤进展的各个不同病理生理步骤中的作用。聚糖调节肿瘤的增殖、侵袭、血源性转移和血管生成(Fuster等,(2005)Nat.Rev.Cancer 5(7):526-42)。在癌症中细胞表面糖缀合物的唾液酸化经常被改变,导致唾液酸化肿瘤相关糖抗原的表达。肿瘤细胞中唾液酸化聚糖的表达通常伴有肿瘤的侵袭性和转移潜力的提高。

[0005] 最近变得越来越明显的是,Siglecs(结合唾液酸的免疫球蛋白样凝集素)这种结合唾液酸的凝集素家族,通过与超唾液酸化的癌细胞结合并介导来自于活化的NK细胞受体的信号的抑制,从而抑制NK细胞介导的肿瘤细胞灭杀,而在癌症免疫抑制中发挥作用(Jandus等,(2014)J.CLIN.INVEST.124:1810-1820;Läubli 等,(2014)PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 111:14211-14216;Hudak等,(2014)NAT.CHEM.BIOL.10:69-75)。同样地,通过用唾液酸酶处理来去除唾液酸可以增强NK细胞介导的肿瘤细胞灭杀(Jandus,同上;Hudak,同上;Xiao等,(2016)PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 113(37):10304-9)。

[0006] 使用包括阻断PD-1/PD-L1途径的抗体在内的免疫检查点抑制剂的癌症免疫疗法改善了许多癌症患者的结果。然而,尽管到目前为止已取得进展,但许多患者对目前可用的免疫检查点抑制剂没有响应。因此,对克服免疫抑制性肿瘤微环境并用于治疗与超唾液酸化的癌细胞相关的癌症的有效干预手段,仍存在着需求。

发明内容

[0007] 本发明部分是基于下述发现,即有可能产生人唾液酸酶的重组突变形式和含有这些酶的融合蛋白和/或抗体偶联物,它们具有适合的底物特异性和活性,可用于从癌细胞表面除去唾液酸和/或含唾液酸分子和/或从肿瘤微环境除去唾液酸和/或含唾液酸分子和/或降低肿瘤微环境中唾液酸和/或含唾液酸分子的浓度。

[0008] 因此,一方面,本发明提供了一种重组突变人唾液酸酶,其中所述唾液酸酶包含:(a)在对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处脯氨酸残基(P5)的替换;(b)在对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处赖氨酸残基(K9)的替换;(c)在对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处赖氨酸残基(K44)的替换;(d)在对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处赖氨

酸残基(K45)的替换;(e)在对应于野生型人类Neu2的第54位的位置处亮氨酸残基(L54)的替换;(f)在对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处脯氨酸残基(P62)的替换;(g)在对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处谷氨酰胺残基(Q69)的替换;(h)在对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处精氨酸残基(R78)的替换;(i)在对应于野生型人类Neu2的第80位的位置处天冬氨酸残基(D80)的替换;(j)在对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处丙氨酸残基(A93)的替换;(k)在对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处甘氨酸残基(G107)的替换;(l)在对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处谷氨酰胺残基(Q108)的替换;(m)在对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处谷氨酰胺残基(Q112)的替换;(n)在对应于野生型人类Neu2的第125位的位置处半胱氨酸残基(C125)的替换;(o)在对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处谷氨酰胺残基(Q126)的替换;(p)在对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处丙氨酸残基(A150)的替换;(q)在对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处半胱氨酸残基(C164)的替换;(r)在对应于野生型人类Neu2的第170位的位置处精氨酸残基(R170)的替换;(s)在对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处丙氨酸残基(A171)的替换;(t)在对应于野生型人类Neu2的第188位的位置处谷氨酰胺残基(Q188)的替换;(u)在对应于野生型人类Neu2的第189位的位置处精氨酸残基(R189)的替换;(v)在对应于野生型人类Neu2的第213位的位置处丙氨酸残基(A213)的替换;(w)在对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处亮氨酸残基(L217)的替换;(x)在对应于野生型人类Neu2的第225位的位置处谷氨酸残基(E225)的替换;(y)在对应于野生型人类Neu2的第239位的位置处组氨酸残基(H239)的替换;(z)在对应于野生型人类Neu2的第240位的位置处亮氨酸残基(L240)的替换;(aa)在对应于野生型人类Neu2的第241位的位置处精氨酸残基(R241)的替换;(bb)在对应于野生型人类Neu2的第242位的位置处丙氨酸残基(A242)的替换;(cc)在对应于野生型人类Neu2的第244位的位置处缬氨酸残基(V244)的替换;(dd)在对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处苏氨酸残基(T249)的替换;(ee)在对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处天冬氨酸残基(D251)的替换;(ff)在对应于野生型人类Neu2的第257位的位置处谷氨酸残基(E257)的替换;(gg)在对应于野生型人类Neu2的第258位的位置处丝氨酸残基(S258)的替换;(hh)在对应于野生型人类Neu2的第260位的位置处亮氨酸残基(L260)的替换;(ii)在对应于野生型人类Neu2的第265位的位置处缬氨酸残基(V265)的替换;(jj)在对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处谷氨酰胺残基(Q270)的替换;(kk)在对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处色氨酸残基(W292)的替换;(ll)在对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处丝氨酸残基(S301)的替换;(mm)在对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处色氨酸残基(W302)的替换;(nn)在对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处缬氨酸残基(V363)的替换;或(oo)在对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处亮氨酸残基(L365)的替换;或任何上述替换的组合。例如,所述唾液酸酶可以包含K9、P62、A93、Q216、A242、Q270、S301、W302、V363或L365的替换或任何上述替换的组合。

[0009] 在某些实施方式中,在所述唾液酸酶中:(a)对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处的脯氨酸残基被组氨酸替换(P5H);(b)对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处的赖氨酸残基被天冬氨酸替换(K9D);(c)对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处的赖氨酸残基被精氨酸(K44R)或谷氨酸(K44E)替换;(d)对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处的赖氨酸残基被丙氨酸(K45A)、精氨酸(K45R)或谷氨酸(K45E)替换;(e)对应于野生型人类

Neu2的第54位的位置处的亮氨酸残基被甲硫氨酸替换(L54M)；(f)对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处的脯氨酸残基被天冬酰胺(P62N)、天冬氨酸(P62D)、组氨酸(P62H)、谷氨酸(P62E)、甘氨酸(P62G)、丝氨酸(P62S)或苏氨酸(P62T)替换；(g)对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q69H)；(h)对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处的精氨酸残基被赖氨酸替换(R78K)；(i)对应于野生型人类Neu2的第80位的位置处的天冬氨酸残基被脯氨酸替换(D80P)；(j)对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处的丙氨酸残基被谷氨酸(A93E)或赖氨酸(A93K)替换；(k)对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处的甘氨酸残基被天冬氨酸替换(G107D)；(l)对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q108H)；(m)对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处的谷氨酰胺残基被精氨酸(Q112R)或赖氨酸(Q112K)替换；(n)对应于野生型人类Neu2的第125位的位置处的半胱氨酸残基被亮氨酸替换(C125L)；(o)对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处的谷氨酰胺残基被亮氨酸(Q126L)、谷氨酸(Q126E)、苯丙氨酸(Q126F)、组氨酸(Q126H)、异亮氨酸(Q126I)或酪氨酸(Q126Y)替换；(p)对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处的丙氨酸残基被缬氨酸替换(A150V)；(q)对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处的半胱氨酸残基被甘氨酸替换(C164G)；(r)对应于野生型人类Neu2的第170位的位置处的精氨酸残基被脯氨酸替换(R170P)；(s)对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处的丙氨酸残基被甘氨酸替换(A171G)；(t)对应于野生型人类Neu2的第188位的位置处的谷氨酰胺残基被脯氨酸替换(Q188P)；(u)对应于野生型人类Neu2的第189位的位置处的精氨酸残基被脯氨酸替换(R189P)；(v)对应于野生型人类Neu2的第213位的位置处的丙氨酸残基被半胱氨酸(A213C)、天冬酰胺(A213N)、丝氨酸(A213S)或苏氨酸(A213T)替换；(w)对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处的亮氨酸残基被丙氨酸(L217A)或缬氨酸(L217V)替换；(x)对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处的苏氨酸残基被丙氨酸替换(T249A)；(y)对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处的天冬氨酸残基被甘氨酸替换(D251G)；(z)对应于野生型人类Neu2的第225位的位置处的谷氨酸残基被脯氨酸替换(E225P)；(aa)对应于野生型人类Neu2的第239位的位置处的组氨酸残基被脯氨酸替换(H239P)；(bb)对应于野生型人类Neu2的第240位的位置处的亮氨酸残基被天冬氨酸(L240D)、天冬酰胺(L240N)或酪氨酸(L240Y)替换；(cc)对应于野生型人类Neu2的第241位的位置处的精氨酸残基被丙氨酸(R241A)、天冬氨酸(R241D)、亮氨酸(R241L)、谷氨酰胺(R241Q)或酪氨酸(R241Y)替换；(dd)对应于野生型人类Neu2的第242位的位置处的丙氨酸残基被半胱氨酸(A242C)、苯丙氨酸(A242F)、甘氨酸(A242G)、组氨酸(A242H)、异亮氨酸(A242I)、赖氨酸(A242K)、亮氨酸(A242L)、甲硫氨酸(A242M)、天冬酰胺(A242N)、谷氨酰胺(A242Q)、精氨酸(A242R)、丝氨酸(A242S)、缬氨酸(A242V)、色氨酸(A242W)或酪氨酸(A242Y)替换；(ee)对应于野生型人类Neu2的第244位的位置处的缬氨酸残基被异亮氨酸(V244I)、赖氨酸(V244K)或脯氨酸(V244P)替换；(ff)对应于野生型人类Neu2的第257位的位置处的谷氨酸残基被脯氨酸替换(E257P)；(gg)对应于野生型人类Neu2的第258位的位置处的丝氨酸残基被半胱氨酸替换(S258C)；(hh)对应于野生型人类Neu2的第260位的位置处的亮氨酸残基被天冬氨酸(L260D)、苯丙氨酸(L260F)、谷氨酰胺(L260Q)或苏氨酸(L260T)替换；(ii)对应于野生型人类Neu2的第265位的位置处的缬氨酸残基被苯丙氨酸替换(V265F)；(jj)对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处的谷氨酰胺残基被丙氨酸

(Q270A)、组氨酸(Q270H)、苯丙氨酸(Q270F)、脯氨酸(Q270P)、丝氨酸(Q270S)或苏氨酸(Q270T)替换;(kk)对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处的色氨酸残基被精氨酸替换(W292R);(ll)对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处的丝氨酸残基被丙氨酸(S301A)、天冬氨酸(S301D)、谷氨酸(S301E)、苯丙氨酸(S301F)、组氨酸(S301H)、赖氨酸(S301K)、亮氨酸(S301L)、甲硫氨酸(S301M)、天冬酰胺(S301N)、脯氨酸(S301P)、谷氨酰胺(S301Q)、精氨酸(S301R)、苏氨酸(S301T)、缬氨酸(S301V)、色氨酸(S301W)或酪氨酸(S301Y)替换;(mm)对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处的色氨酸残基被丙氨酸(W302A)、天冬氨酸(W302D)、苯丙氨酸(W302F)、甘氨酸(W302G)、组氨酸(W302H)、异亮氨酸(W302I)、赖氨酸(W302K)、亮氨酸(W302L)、甲硫氨酸(W302M)、天冬酰胺(W302N)、脯氨酸(W302P)、谷氨酰胺(W302Q)、精氨酸(W302R)、丝氨酸(W302S)、苏氨酸(W302T)、缬氨酸(W302V)或酪氨酸(W302Y)替换;(nn)对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处的缬氨酸残基被精氨酸替换(V363R);或(oo)对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处的亮氨酸残基被谷氨酰胺(L365Q)、组氨酸(L365H)、异亮氨酸(L365I)、赖氨酸(L365K)或丝氨酸(L365S)替换;或所述唾液酸酶包含任何上述替换的组合。例如,所述唾液酸酶可以包含选自K9D、P62G、P62N、P62S、P62T、A93E、Q126Y、A242F、A242W、A242Y、Q270A、Q270T、S301A、S301R、W302K、W302R、V363R或L365I的替换或任何上述替换的组合。

[0010] 在某些实施方式中,所述唾液酸酶还包含:(a)对应于野生型人类Neu2的第1位的位置处的甲硫氨酸残基(M1)的替换或缺失;(b)对应于野生型人类Neu2的第6位的位置处的缬氨酸残基(V6)的替换;(c)对应于野生型人类Neu2的第187位的位置处的异亮氨酸残基(I187)的替换;或(d)对应于野生型人类Neu2的第332位的位置处的半胱氨酸残基(C332)的替换;或任何上述替换的组合。

[0011] 在某些实施方式中,在所述唾液酸酶中:(a)所述对应于野生型人类Neu2的第1位的位置处的甲硫氨酸残基被缺失(ΔM1)、被丙氨酸(M1A)替换或被天冬氨酸(M1D)替换;(b)所述对应于野生型人类Neu2的第6位的位置处的缬氨酸残基被酪氨酸(V6Y)替换;(c)所述对应于野生型人类Neu2的第187位的位置处的异亮氨酸残基被赖氨酸(I187K)替换;或(d)所述对应于野生型人类Neu2的第332位的位置处的半胱氨酸残基被丙氨酸(C332A)替换;或所述唾液酸酶包含任何上述替换的组合。

[0012] 在某些实施方式中,所述唾液酸酶包含:(a)M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K和C332A替换;(b)M1D、V6Y、K9D、A93E、I187K、C332A、V363R和L365I替换;(c)M1D、V6Y、P62N、I187K和C332A替换;(d)M1D、V6Y、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(e)M1D、V6Y、P62S、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(f)M1D、V6Y、P62T、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(g)M1D、V6Y、P62N、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(h)M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、W302R和C332A替换;(i)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、Q270T和C332A替换;(j)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K和C332A替换;或(k)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、A242F、Q270T和C332A替换。

[0013] 在某些实施方式中,所述唾液酸酶具有与相应的野生型唾液酸酶不同的底物特异性。例如在某些实施方式中,所述唾液酸酶可以切开α2,3、α2,6和/或α2,8键连接。在某些实施方式中,所述唾液酸酶可以切开α2,3和α2,8键连接。

[0014] 在某些实施方式中,所述唾液酸酶包含SEQ ID NO:48-54、149、154、159或191中的

任一者或与SEQ ID NO:48-54、149、154、159或191中的任一者具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0015] 另一方面,本发明提供了一种重组突变人唾液酸酶,其包含在表5-9、11-13或15-30中的任一者中阐述的突变或突变的组合。在某些实施方式中,所述唾液酸酶还包含在表1-4中的任一者中阐述的突变或突变的组合。

[0016] 另一方面,本发明提供了一种融合蛋白,其包含(或基本上由下述物质组成):(a)本文中公开的重组突变人唾液酸酶;和(b)免疫球蛋白Fc结构域和/或免疫球蛋白抗原结合结构域;其中所述唾液酸酶与所述Fc结构域和/或抗原结合结构域通过肽键或氨基酸连接物相连。在某些实施方式中,所述融合蛋白还包含连接物例如氨基酸连接物,其将所述唾液酸酶与所述Fc结构域和/或抗原结合结构域相连。在某些实施方式中,所述免疫球蛋白抗原结合结构域与第二免疫球蛋白抗原结合结构域结合(例如共价或非共价结合),以产生抗原结合部位。

[0017] 在某些实施方式中,所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM Fc结构域,例如所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc结构域,例如所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人类IgG1 Fc结构域。

[0018] 在某些实施方式中,所述免疫球蛋白抗原结合结构域源自于选自曲妥珠单抗、达雷木单抗、吉伦妥昔单抗、奥法木单抗、阿维单抗和利妥昔单抗的抗体。

[0019] 另一方面,本发明提供了一种抗体偶联物,其包含任何上述融合蛋白。在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含单个唾液酸酶。在其他实施方式中,所述抗体偶联物包含两个可以相同或不同的唾液酸酶。在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含两个相同的唾液酸酶。在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含单个抗原结合部位。在其他实施方式中,所述抗体偶联物包含两个可以相同或不同的抗原结合部位。在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含两个相同的抗原结合部位。

[0020] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物具有约135kDa至约165kDa的分子量,或者所述抗体偶联物具有约215kDa至约245kDa的分子量。

[0021] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含:(a)包含免疫球蛋白轻链的第一多肽;(b)包含免疫球蛋白重链的第二多肽;和(c)包含免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶的第三多肽;其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽被共价连接在一起,并且其中所述第一多肽和第二多肽一起定义抗原结合部位。所述第三多肽可以例如以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。

[0022] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含:(a)包含第一免疫球蛋白轻链的第一多肽;(b)包含第一免疫球蛋白重链和第一唾液酸酶的第二多肽;(c)包含第二免疫球蛋白重链和第二唾液酸酶的第三多肽;和(d)包含第二免疫球蛋白轻链的第四多肽;其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,所述第三和第四多肽被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽被共价连接在一起,并且其中所述第一多肽和第二多肽一起定义第一抗原结合部位,并且所述第三多肽和第四多肽一起定义第二抗原结合部位。所述第二和第三多肽可以例如分别以N-至C-端的方向包含所述第一和第二免疫球蛋白重链和所述第一和第二唾液酸酶。

[0023] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含:(a)包含第一唾液酸酶、第一免疫球蛋

白Fc结构域和第一单链可变片段(scFv)的第一多肽;和(b)包含第二唾液酸酶、第二免疫球蛋白Fc结构域和任选的第二单链可变片段(scFv)的第二多肽;其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,并且其中所述第一scFv定义第一抗原结合部位,并且所述第二scFv当存在时定义第二抗原结合部位。所述第一多肽可以例如以N-至C-端的方向包含所述第一唾液酸酶、第一免疫球蛋白Fc结构域和第一scFv。所述第二多肽可以例如以N-至C-端的方向包含所述第二唾液酸酶、第二免疫球蛋白Fc结构域和任选的第二scFv。

[0024] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含:(a)包含免疫球蛋白轻链的第一多肽;(b)包含免疫球蛋白重链和单链可变片段(scFv)的第二多肽;和(c)包含免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶的第三多肽,其中所述第一和第二多肽被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽被共价连接在一起,并且其中所述免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链一起定义第一抗原结合部位,并且所述scFv定义第二抗原结合部位。所述第二多肽可以例如以N-至C-端的方向包含所述免疫球蛋白重链和scFv。所述第三多肽可以例如以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。

[0025] 另一方面,本发明提供了一种分离的核酸,其包含编码任何上述重组突变人唾液酸酶、任何上述融合蛋白或任何上述抗体偶联物的至少一部分的核苷酸序列。另一方面,本发明提供了一种表达载体,其包含任何上述核酸。另一方面,本发明提供了一种宿主细胞,其包含任何上述表达载体。

[0026] 另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含任何上述重组突变人唾液酸酶、任何上述融合蛋白或任何上述抗体偶联物。

[0027] 另一方面,本发明提供了一种在需要的受试者中治疗癌症的方法。所述方法包括向所述受试者给药有效量的任何上述唾液酸酶、任何上述融合蛋白、任何上述抗体偶联物或任何上述药物组合物。在某些实施方式中,所述癌症是上皮癌。在某些实施方式中,所述癌症是实体肿瘤、软组织肿瘤、造血系肿瘤或转移性病变。在某些实施方式中,所述实体肿瘤是肉瘤、腺癌或癌。在某些实施方式中,所述实体肿瘤是头颈部(例如咽)、甲状腺、肺(例如小细胞或非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺、淋巴、胃肠道(例如口腔、食道、胃、肝、胰腺、小肠、结肠和直肠、肛管)、生殖或泌尿生殖道(例如肾、尿路上皮、膀胱、卵巢、子宫、宫颈、子宫内膜、前列腺、睾丸)、CNS(例如神经或神经胶质细胞,例如神经母细胞瘤或神经胶质瘤)或皮肤(例如黑色素瘤)肿瘤。在某些实施方式中,所述造血系肿瘤是白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、B-细胞、T-细胞或FAB ALL、急性髓系白血病(AML)、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)例如转移CLL、弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓增生异常综合征(MDS)、淋巴瘤、霍奇金病、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤或Richter's综合征(Richter's转化)。在某些实施方式中,所述癌症选自子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、外阴癌、子宫癌、输卵管癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、泌尿系统癌、膀胱癌、头颈癌、口腔癌和肝癌。

[0028] 另一方面,本发明提供了一种在细胞或组织中提高HLA-DR、CD86、CD83、IFNγ、IL-1b、IL-6、TNFα、IL-17A、IL-2或IL-6的表达的方法。所述方法包括将所述细胞或组织与有效量的任何上述唾液酸酶、任何上述融合蛋白、任何上述抗体偶联物或任何上述药物组合物接触。在某些实施方式中,所述细胞选自树突状细胞和外周血单核细胞(PBMC)。

[0029] 本发明的这些和其他方面和特点在下面的详细描述和权利要求书中描述。

附图说明

[0030] 参考下述附图,本发明可以被更完全地理解。

[0031] 图1描绘的SDS-PAGE凝胶示出了在非还原和还原条件下的重组人类Neu1、Neu2、Neu3和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)(St-唾液酸酶)。单体和二聚体物质被注明。

[0032] 图2是示出了重组人类Neu1、Neu2和Neu3的酶活性的条形图。

[0033] 图3是示出了在所指示的pH下重组人类Neu2和Neu3的酶活性随底物浓度而变的线图。

[0034] 图4描绘了可用于Neu2变体的噬菌体展示或酵母展示筛选的唾液酸生物素化探针的示意图。

[0035] 图5描绘了便于Neu2变体的噬菌体展示筛选的示例性流程。

[0036] 图6描绘了便于Neu2变体的酵母展示筛选的示例性流程。

[0037] 图7A描绘的SDS-PAGE凝胶示出了在非还原和还原条件下的重组Neu2-Fc(野生型)和Neu2-M106-Fc。图7B是Neu2-Fc(野生型和Neu2-M106-Fc的SEC-HPLC迹线。单体物质具有21分钟的保留时间。

[0038] 图8描绘了Neu2变体M106的酶活性的线图。

[0039] 图9A-9I描绘了含有唾液酸酶例如人唾液酸酶和抗原结合部位的某些抗体偶联物构建物的示意图。对于含有超过一个(例如两个)唾液酸酶的每种抗体偶联物构建物来说,每个唾液酸酶可以相同或不同。对于含有超过一个(例如两个)抗原结合部位的每种抗体偶联物构建物来说,每个抗原结合部位可以相同或不同。对于含有Fc结构域的每种抗体偶联物构建物来说,应该理解所述Fc结构域可以是野生型Fc结构域,或者可以是工程化改造的Fc结构域。例如,所述Fc结构域可以被工程化改造以含有“杵”突变例如T366Y或“臼”突变例如Y407T或两者以促进异二聚化,或者所述Fc结构域可以被工程化改造以含有一个或多个修饰例如点突变,以提供任何其他改变的Fc结构域功能。

[0040] 图10描绘了含有唾液酸酶例如人唾液酸酶和抗原结合部位的某些抗体偶联物构建物的示意图。对于含有超过一个(例如两个)抗原结合部位的每种抗体偶联物构建物来说,每个抗原结合部位可以相同或不同。对于含有Fc结构域的每种抗体偶联物构建物来说,应该理解所述Fc结构域可以是野生型Fc结构域,或者可以是工程化改造的Fc结构域。例如,所述Fc结构域可以被工程化改造以含有“杵”突变例如T366Y或“臼”突变例如Y407T或两者以促进异二聚化,或者所述Fc结构域可以被工程化改造以含有一个或多个修饰例如点突变,以提供任何其他改变的Fc结构域功能。

[0041] 图11A-11D是被称为Raptor抗体-唾液酸酶偶联物(图11A)、Janus抗体-唾液酸酶偶联物(图11B)、Lobster抗体-唾液酸酶偶联物(图11C)和Bunk抗体-唾液酸酶偶联物(图11D)的示例性融合蛋白偶联物的示意图。

[0042] 图12描绘的SDS-PAGE凝胶示出了在非还原和还原条件下的纯化的重组人类Janus曲妥珠单抗。

[0043] 图13描绘了纯化的Janus曲妥珠单抗的SEC-HPLC迹线,显示出大约90%的单体纯度。

[0044] 图14描绘了使用4-MU-Neu5Ac作为底物测定的Janus曲妥珠单抗的酶活性。

[0045] 图15描绘了通过ForteBio Octet确定的Janus曲妥珠单抗(顶部)和曲妥珠单抗(底部)与HER2抗原的结合。平衡解离常数(KD)被注明。

[0046] 图16A-D描绘了在利用被工程化改造以表达人类Her2的EMT6小鼠乳腺癌细胞的小鼠同基因肿瘤模型中抗体-唾液酸酶偶联物的各种不同配置的测试。在用黑色三角形标注的日期,通过腹膜内注射10mg/kg的每种测试物对小鼠进行治疗,并记录肿瘤体积(mm^3)。每条线代表单个小鼠。将小鼠用曲妥珠单抗(图16A)、Raptor(图16B)、Janus(图16C)或Lobster(图16D)治疗。

[0047] 图17A-D描绘了在利用被工程化改造以表达人类Her2的EMT6小鼠乳腺癌细胞的小鼠同基因肿瘤模型中Janus抗体-唾液酸酶偶联物的测试。在用黑色三角形标注的日期,通过腹膜内注射10mg/kg的Janus对小鼠进行治疗,并记录肿瘤体积(mm^3)。在与Janus的同一天,小鼠也用抗小鼠NK1.1抗体(10mg/kg)处理以剥夺自然杀伤细胞(图17A),用氯膦酸二钠脂质体(0.5mg/小鼠,每周三次共两周)处理以剥夺巨噬细胞(图17B),或用抗小鼠CD8α抗体(10mg/kg)处理以剥夺CD8+T细胞(图17C)。每条线代表单个小鼠。图17D描绘了来自于实施例5的所注明的治疗组的平均肿瘤体积和误差线。

[0048] 图18A-B描绘了在利用第二种来源的被工程化改造以表达人类Her2的EMT6小鼠乳腺癌细胞的小鼠同基因原位肿瘤模型中Janus抗体-唾液酸酶偶联物的测试。在用黑色三角形(▼)标注的日期,通过腹膜内注射10mg/kg的每种测试物对小鼠进行治疗,并记录肿瘤体积(mm^3)。每条线代表单个小鼠。小鼠用介质、曲妥珠单抗、Janus或失去功能的Janus治疗(图18A)。图18B描绘了来自于图18A的用Janus治疗并且原始EMT6-Her2肿瘤完全消退的三只小鼠(治愈的小鼠)或空白(Naïve)小鼠的再激惹实验。将治愈的小鼠在左和右下胁区域用EMT6-Her2细胞或亲代EMT6细胞接种。将空白(Naïve)小鼠用EMT6-Her2细胞接种。

[0049] 图19A-B描绘了在小鼠同基因原位肿瘤模型中与抗小鼠PD1抗体相组合的Janus抗体-唾液酸酶偶联物的测试。在用黑色三角形(▼)标注的日期,通过腹膜内注射10mg/kg单独的抗小鼠PD1抗体(图19A)或Janus和抗小鼠PD1抗体(各10mg/kg,图19B)对小鼠进行治疗,并记录肿瘤体积(mm^3)。每条线代表单个小鼠。

[0050] 图20描绘了在用表达人类Her2的B16黑素瘤细胞系注射的小鼠同基因肿瘤模型中各种不同测试物的测试。在用黑色三角形(▼)标注的日期,通过腹膜内注射10mg/kg的Janus、曲妥珠单抗或抗小鼠PD1抗体与抗小鼠CTLA4抗体(各10mg/kg)的组合对小鼠进行治疗,并记录肿瘤体积(mm^3)。每条线代表单个小鼠。

[0051] 图21描绘了在利用被工程化改造以表达人类Her2的EMT6小鼠乳腺癌细胞的小鼠同基因肿瘤模型中Janus曲妥珠单抗的测试。每条线代表单个小鼠。刻度标记指示给药频率(总共5剂,每两周一次)。小鼠用Janus曲妥珠单抗或同种型对照治疗。

[0052] 图22A描绘的SDS-PAGE凝胶示出了在非还原和还原条件下的Neu2-M173-Fc。图22B是Neu2-M173-Fc的SEC-HPLC迹线。单体物质具有6.367分钟的保留时间。在通过蛋白A和CHT层析纯化后,单体物质具有大约90%的纯度。

[0053] 图23描绘了Neu2-M173-Fc的酶活性,使用4-MU-Neu5Ac作为底物,并将酶浓度固定到2μg/孔。

[0054] 图24A描绘的SDS-PAGE凝胶示出了在非还原(NR)和还原(R)条件下的Neu2-M106。图24B描绘了Neu2结构的示意图,R243切割位点的位置被注明。

[0055] 图25描绘的还原SDS-PAGE凝胶示出了用(+)或未用(-)胰蛋白酶处理的通过大规模或小规模表达生产的Neu2-M106。

[0056] 图26描绘的SDS-PAGE凝胶示出了在与胰蛋白酶和指定浓度的蛋白酶抑制剂柠檬酸铁(Fe Cit)、抑肽酶、AEBSF、亮抑酶肽或E-64之一温育后的Neu2-M106。

[0057] 图27的表格描绘了在Neu2中胰蛋白酶切割位点周围的不同突变和突变组合。

[0058] 图28A描绘了用或未用胰蛋白酶处理的在A242位置处带有指定突变的Neu2变体的还原SDS-PAGE分析。胰蛋白酶消化使用胰蛋白酶的5,000％稀释液在4℃进行5分钟。通过添加SDS淬灭所述消化，并将2μg蛋白质载样到凝胶上。图28B描绘了在A242位置处带有指定突变的Neu2变体的酶活性。图28C是在A242位置处带有指定突变的Neu2变体的SEC-HPLC迹线。示出了Neu2-M106(在其中测试A242位置处的突变的突变背景)作为对照。

[0059] 图29描绘了用或未用胰蛋白酶处理的指定Neu2变体的还原SDS-PAGE分析。示出了Neu2-M106作为对照。例如，显示出Neu2-M255相对于Neu2-M106具有提高超过10倍的胰蛋白酶抗性。

[0060] 详细描述

[0061] 下面更详细地讨论本发明的各种不同特点和方面。

[0062] 本发明涉及一种重组人唾液酸酶，其相对于野生型人唾液酸酶包含至少一个突变，例如至少一个氨基酸的替换、缺失或添加(插入)。所述突变或突变的组合可以提高所述唾液酸酶的表达、活性或表达和活性两者，以改进它在癌症诊断和/或治疗中的用途。

[0063] 本发明还涉及包含唾液酸酶和抗体或其部分例如免疫球蛋白Fc结构域和/或抗原结合结构域的融合蛋白和/或抗体偶联物。所述融合蛋白和/或抗体偶联物的唾液酸酶部分相对于野生型人唾液酸酶可以包含至少一个突变。

[0064] 本发明还涉及药物组合物和使用融合蛋白和/或抗体偶联物治疗癌症例如实体肿瘤、软组织肿瘤、造血系肿瘤、转移性病变或上皮细胞癌的方法。

[0065] I.重组人唾液酸酶

[0066] 当在本文中使用时，术语“唾液酸酶”是指从底物例如糖蛋白或糖脂切下末端唾液酸残基的任何酶或其功能性片段。术语唾液酸酶包括相对于野生型唾液酸酶序列具有一个或多个氨基酸替换、缺失或插入的变体和/或包括唾液酸酶的融合蛋白或偶联物。唾液酸酶也被称为神经氨酸酶，并且除非另有指明，否则这两个术语在本文中可互换使用。当在本文中使用时，术语唾液酸酶的“功能性片段”是指全长唾液酸酶的片段，其保留了所述相应的全长、天然存在的唾液酸酶的例如至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％或100％的酶活性。唾液酸酶的酶活性可以通过本领域中已知的任何方法来测定，包括例如通过测量唾液酸从产荧光底物4-甲基伞形酮基-N-乙酰神经氨酸(4MU-NeuAc)的释放。在某些实施方式中，所述功能性片段包含在全长、天然存在的唾液酸酶中存在的至少100、150、200、250、300、310、320、330、340、350、360或370个连续氨基酸。

[0067] 在人类基因组中已发现四种唾液酸酶，它们被称为Neu1、Neu2、Neu3和Neu4。

[0068] 人类Neu1是一种溶酶体神经氨酸酶，其在与β-半乳糖苷酶和组织蛋白酶A的复合物中发挥作用。人类Neu1的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:7中，编码人类Neu1的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:23中。

[0069] 人类Neu2是一种胞浆唾液酸酶。人类Neu2的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:1中，编码人类Neu2的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:24中。当在本文中使用时，除非另有陈述，否则野生型人类Neu2是指具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的人类Neu2。

[0070] 人类Neu3是一种质膜唾液酸酶，具有特异性针对神经节苷脂的活性。人类Neu3具有两种同工型:同工型1和同工型2。人类Neu3同工型1的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:8中，编码人类Neu3同工型1的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:25中。人类Neu3同工型2的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:9中，编码人类Neu3同工型2的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:34中。

[0071] 人类Neu4具有两种同工型:同工型1是一种外周膜蛋白，同工型2局限于溶酶体腔。人类Neu4同工型1的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:10中，编码人类Neu4同工型1的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:26中。人类Neu4同工型2的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:11中，编码人类Neu4同工型2的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:35中。

[0072] 在小鼠基因组中也已发现四种唾液酸酶，它们被称为Neu1、Neu2、Neu3和Neu4。小鼠Neu1的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:38中，编码小鼠Neu1的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:42中。小鼠Neu2的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:39中，编码小鼠Neu2的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:43中。小鼠Neu3的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:40中，编码小鼠Neu3的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:44中。小鼠Neu4的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:41中，编码小鼠Neu4的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:45中。

[0073] 示例性的原核唾液酸酶包括来自于鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)和霍乱弧菌(Vibrio cholera)的唾液酸酶。鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)唾液酸酶(St-唾液酸酶)的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:30中，编码鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)唾液酸酶的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:6中。霍乱弧菌(Vibrio cholera)唾液酸酶的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:36中，编码霍乱弧菌(Vibrio cholera)唾液酸酶的核苷酸序列描绘在SEQ ID NO:37中。

[0074] 在某些实施方式中，重组突变人唾液酸酶具有相应的(或模板)野生型人唾液酸酶的约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％、约100％或超过100％的酶活性。

[0075] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶具有与所述相应的野生型人唾液酸酶相同的底物特异性。在其他实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶具有与所述相应的野生型人唾液酸酶不同的底物特异性。例如在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶可以切开α2,3、α2,6和/或α2,8键连接。在某些实施方式中，所述唾液酸酶可以切开α2,3和α2,8键连接。

[0076] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶在哺乳动物细胞例如HEK293细胞、CHO细胞、鼠骨髓瘤细胞(NS0、Sp2/0)或人纤维肉瘤细胞(HT-1080)例如HEK293细胞中的表达量，高于所述相应的野生型人唾液酸酶的表达量的约10％、约20％、约50％、约75％、约100％、约150％、约200％、约250％、约300％、约400％、约500％、约600％、约700％、约800％、约900％或约1,000％。

[0077] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶具有相应的野生型人唾液酸酶的约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约

60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％、约100％或超过100％的酶活性，并且所述重组突变人唾液酸酶在哺乳动物细胞例如HEK293细胞中的表达量高于所述相应的野生型人唾液酸酶的表达量的约10％、约20％、约50％、约75％、约100％、约150％、约200％、约250％、约300％、约400％、约500％、约600％、约700％、约800％、约900％或约1,000％。

[0078] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶的氨基酸序列与相应的野生型人唾液酸酶得氨基酸序列具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性。

[0079] a.半胱氨酸残基的替换

[0080] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含至少一个半胱氨酸(cys，C)残基的替换。已发现，唾液酸酶中的某些半胱氨酸残基可能作为蛋白质聚集的结果而抑制有功能蛋白质的表达。因此，在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶含有至少一个突变以除去游离半胱氨酸(例如对于Neu1(SEQ ID NO:7)来说，例如C111、C117、C171、C183、C218、C240、C242和C252中的一者或多者的突变；对于Neu2(SEQ ID NO:1)来说，例如C125、C196、C219、C272、C332和C352中的一者或多者的突变；对于Neu3(SEQ ID NO:8)来说，例如C7、C90、C99、C106、C127、C136、C189、C194、C226、C242、C250、C273、C279、C295、C356、C365、C368、C384、C383、C394和C415中的一者或多者的突变；以及对于Neu4(SEQ ID NO:10)来说，C88、C125、C126、C186、C191、C211、C223、C239、C276、C437、C453、C480和C481中的一者或多者的突变)。游离半胱氨酸可以被任何氨基酸替换。在某些实施方式中，所述游离半胱氨酸被丝氨酸(ser，S)、异亮氨酸(iso，I)、缬氨酸(val，V)、苯丙氨酸(phe，F)、亮氨酸(leu，L)或丙氨酸(ala，A)替换。Neu2中的示例性半胱氨酸替换包括C125A、C125I、C125S、C125V、C196A、C196L、C196V、C272S、C272V、C332A、C332S、C332V、C352L和C352V。

[0081] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含两个或更多个半胱氨酸替换。Neu2中的示例性双重或三重半胱氨酸替换包括：C125S和C332S；C272V和C332A；C272V和C332S；C332A和C352L；C125S和C196L；C196L和C352L；C196L和C332A；C332A和C352L；以及C196L、C332A和C352L。

[0082] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶是Neu2唾液酸酶并包含替换C322A和C352L(SEQ ID NO:5)。

[0083] 在某些实施方式中，所述唾液酸酶在人唾液酸酶例如Neu2或Neu3中通常存在的2、3、4、5或6个半胱氨酸处含有氨基酸替换。

[0084] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含对应于表1中列出的替换或替换组合的替换或替换组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。

[0085] 表1

[0086]

替换
C125A
C125I
C125S
C125V
C196A
C196L
C196V
C272S

[0087]

替换
C272V
C332A
C332S
C332V
C352L
C352V
C125S + C332S
C272V + C332A
C272V + C332S
C332A + C352L
C125S + C196L
C196L + C352L
C196L + C332A
C196L + C332A + C352L

[0088] b.提高pI和/或降低疏水性的残基替换

[0089] 蛋白质的等电点(pI)是净电荷为零时的pH。pI通常也指示了蛋白质可溶性最低时的pH,其可能影响表达和纯化所述蛋白质的能力。通常,如果蛋白质的pI比溶液的pH高超过2个单位,则它具有良好的溶解性。人类Neu2具有7.5的预测pI。因此,人类Neu2在中性pH附近溶解性最低,这是不合乎需要的,因为表达和生理体系在中性pH处。相反,表现出良好的溶解性和重组表达的来自于鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)的唾液酸酶(St-唾液酸酶)具有9.6的pI。因此,为了提高人类Neu2或其他人唾液酸酶的表达,可以将重组突变人唾液酸酶设计成含有一个或多个氨基酸替换,其中所述替换相对于没有所述替换的唾液酸酶提高所述唾液酸酶的pI。此外,减少唾液酸酶表面上疏水氨基酸的数目可能例如通过减少聚集而改进唾液酸酶的表达。因此,为了提高人类Neu2或其他人唾液酸酶的表达,可以将重组突变人唾液酸酶设计成含有一个或多个氨基酸替换,其中所述替换相对于没有所述替换的唾液酸酶降低所述唾液酸酶表面的疏水性。

[0090] 因此,在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含至少一个氨基酸替换,其中所述替换相对于没有所述替换的唾液酸酶提高所述唾液酸酶的等电点(pI)和/或降低所述唾液酸酶的疏水性。这可以通过将一个或多个带电荷的氨基酸例如带正或负电荷的氨基酸引入到所述重组唾液酸酶中来实现。在某些实施方式中,所述氨基酸替换是替换成带电荷的氨基酸例如带正电荷的氨基酸如赖氨酸(lys,K)、组氨酸(his,H)或精氨酸(arg,R)或

带负电荷的氨基酸如天冬氨酸(asp,D)或谷氨酸(glu,E)。在某些实施方式中,所述氨基酸替换是替换成赖氨酸残基。在某些实施方式中,所述替换将所述唾液酸酶的pI提高到约7.75、约8、约8.25、约8.5、约8.75、约9、约9.25、约9.5或约9.75。

[0091] 在某些实施方式中,所述氨基酸替换发生在表面暴露的D或E氨基酸处,在螺旋或环中,或在St-唾液酸酶的相应位置中具有K或R的位置中。在某些实施方式中,所述氨基酸替换发生在远离催化位点或不参与催化的氨基酸、不与其他人类Neu蛋白或与St-唾液酸酶或梭菌(Clostridium)NanH保守的氨基酸或不位于对功能重要的结构域(例如Asp-盒或β链)中的氨基酸处。

[0092] Neu2中相对于没有替换的唾液酸酶提高所述唾液酸酶的等电点(pI)和/或降低所述唾液酸酶的疏水性的示例性氨基酸替换包括A2E、A2K、D215K、V325E、V325K、E257K和E319K。在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含两个或更多个氨基酸替换,包括例如A2K和V325E、A2K和V325K、E257K和V325K、A2K和E257K以及E257K和A2K和V325K。

[0093] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含对应于表2中列出的替换或替换组合的替换或替换组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。

[0094] 表2

[0095]

替换
A2K
E72K
D215K
E257K
V325K
A2K + E257K
A2K + V325E
A2K + V325K

[0096]

替换
E257K + V325K

[0097] c.N-端肽的添加和N-或C-端替换

[0098] 已发现,向人唾液酸酶的N-端添加两个或更多个氨基酸的肽序列可以提高所述唾液酸酶的表达和/或活性。在某些实施方式中,所述肽的长度为至少2个氨基酸,例如长度为2至20、2至10、2至5或2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。在某些实施方式中,所述肽可以形成α-螺旋或具有形成α-螺旋的倾向性。

[0099] 在小鼠中,在胸腺中发现的Neu2同工型(B型)含有在骨骼肌中发现的Neu2的经典(canonical)同工型中不存在的6个氨基酸。在本文的某些实施方式中,可以将所述小鼠胸腺Neu2同工型的N-端6个氨基酸MEDLRP(SEQ ID NO:4)或其变体添加到人类Neu例如人类Neu2上。在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含与所述唾液酸酶的N-端氨基酸共价结合的长度为至少2个氨基酸残基的肽。在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含与所述唾液酸酶的N-端氨基酸共价结合的肽MEDLRP(SEQ ID NO:4)或EDLRP(SEQ ID NO:3)。在某些实施方式中,所述唾液酸酶还可以包含位于所述肽例如MEDLRP(SEQ ID NO:4)或EDLRP(SEQ ID NO:3)与所述唾液酸酶的其余部分之间的切割位点,例如蛋白水解切割

位点。在某些实施方式中，所述肽例如MEDLRP(SEQ ID NO:4)或EDLRP(SEQ ID NO:3)可以在翻译后从所述唾液酸酶的其余部分上切掉。

[0100] 可选地或与所述N-端添加相组合，可以移除所述重组突变人唾液酸酶的12个氨基酸的N-端区域的1-5个氨基酸，例如可以移除N-端甲硫氨酸。在某些实施方式中，如果所述重组突变人唾液酸酶是Neu2，则可以移除N-端甲硫氨酸，可以移除前5个氨基酸(MASLP;SEQ ID NO:12)，或者可以移除第二至第四个氨基酸(ASLP;SEQ ID NO:13)。

[0101] 在某些实施方式中，将所述重组突变人唾液酸酶的12个氨基酸的N-端区域的1-5个氨基酸用MEDLRP(SEQ ID NO:4)、EDLRP(SEQ ID NO:3)或TVEKSVVF(SEQ ID NO:14)替换。例如在某些实施方式中，如果所述重组突变人唾液酸酶是Neu2，则将氨基酸MASLP(SEQ ID NO:12)、ASLP(SEQ ID NO:13)或M用MEDLRP(SEQ ID NO:4)、EDLRP(SEQ ID NO:3)或TVEKSVVF(SEQ ID NO:14)替换。

[0102] 人唾液酸酶具有β-螺旋桨结构，其特征是围绕中心轴呈环形排列的6个叶片形β-片层。通常，β-螺旋桨的叶片之间、包括N-和C-端叶片之间的疏水相互作用增强稳定性。因此，为了提高人类Neu2或其他人唾液酸酶的表达，可以将重组突变人唾液酸酶设计成包含提高所述唾液酸酶的N-和C-端β-螺旋桨叶片之间的疏水相互作用和/或氢键结合的氨基酸替换。

[0103] 因此，在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含至少一个野生型氨基酸残基的替换，其中所述替换相对于没有所述替换的唾液酸酶提高所述唾液酸酶的N-和C-端之间的疏水相互作用和/或氢键结合。在某些实施方式中，将所述野生型氨基酸用天冬酰胺(asn,N)、赖氨酸(lys,K)、酪氨酸(tyr,Y)、苯丙氨酸(phe,F)或色氨酸(trp,W)替换。Neu2中提高N-和C-端之间的疏水相互作用和/或氢键结合的示例性替换包括L4N、L4K、V6Y、L7N、L4N和L7N、L4N和V6Y和L7N、V12N、V12Y、V12L、V6Y、V6F或V6W。在某些实施方式中，所述唾液酸酶包含V6Y替换。

[0104] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含上述替换的组合。例如，重组突变人类Neu2唾液酸酶可以在N-端处包含添加的氨基酸MEDLRP(SEQ ID NO:4)、EDLRP(SEQ ID NO:3)或TVEKSVVF(SEQ ID NO:14)，并且相组合，可以包含L4N、L4K、V6Y、L7N、L4N和L7N、L4N和V6Y和L7N、V12N、V12Y、V12L、V6Y、V6F或V6W替换中的至少一者。在某些实施方式中，将重组突变人类Neu2唾液酸酶的氨基酸MASLP(SEQ ID NO:12)、ASLP(SEQ ID NO:13)或M用MEDLRP(SEQ ID NO:4)、EDLRP(SEQ ID NO:3)或TVEKSVVF(SEQ ID NO:14)代替，并且所述重组突变人类Neu2唾液酸酶还包含L4N、L4K、V6Y、L7N、L4N和L7N、L4N和V6Y和L7N、V12N、V12Y、V12L、V6Y、V6F或V6W替换中的至少一者。

[0105] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含对应于表3中列出的突变或突变组合的突变或突变组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。

[0106] 表3

[0107]

突变
将 N-端处的 M 用 EDLRP（SEQ ID NO：3）替换
将 N-端处的 M 用 MEDLRP（SEQ ID NO：4）替换
在 N-端处插入 MEDLRP（SEQ ID NO：4）
将 N-端处的 MASLP（SEQ ID NO：12）用 MEDLRP（SEQ ID NO：4）替换
L4N
V6Y
L7N
V6F
V6W

[0108] 此外，在某些实施方式中，所述唾液酸酶在所述唾液酸酶的N-端处包含N-端甲硫氨酸的替换或缺失。例如，在某些实施方式中，所述唾液酸酶在对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第1位的位置处包含甲硫氨酸残基的替换，例如将所述在对应于野生型人类Neu2的第1位的位置处的甲硫氨酸替换为丙氨酸(M1A)或天冬氨酸(M1D)。在其他实施方式中，所述唾液酸酶在对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第1位的位置处包含甲硫氨酸残基的缺失(ΔM1)。

[0109] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含对应于表4中列出的替换或替换组合的替换或替换组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。

[0110] 表4

[0111]

突变
M1 的缺失，V6Y，I187K
M1R，V6Y，I187K

[0112]

突变
M1H，V6Y，I187K
M1K，V6Y，I187K
M1D，V6Y，I187K
M1T，V6Y，I187K
M1N，V6Y，I187K
M1Q，V6Y，I187K
M1G，V6Y，I187K
M1A，V6Y，I187K
M1V，V6Y，I187K
M1L，V6Y，I187K
M1F，V6Y，I187K
M1Y，V6Y，I187K

[0113] d.降低蛋白水解切割的残基的替换

[0114] 已发现，某些唾液酸酶(例如人类Neu2)易于被蛋白酶(例如胰蛋白酶)切割。结果，

所述唾液酸酶的蛋白水解切割可能在重组蛋白生产、收获、纯化或配制期间、向受试者给药期间或在给药到受试者之后发生。因此，在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含至少一个野生型氨基酸残基的替换，其中所述替换降低所述唾液酸酶相对于没有所述替换的唾液酸酶被蛋白酶(例如胰蛋白酶)的切割。

[0115] 在某些实施方式中，将所述重组突变人唾液酸酶与蛋白酶(例如胰蛋白酶)温育，产生约1％至约50％、约1％至约40％、约1％至约30％、约1％至约20％、约1％至约10％、约1％至约5％、约5％至约50％、约5％至约40％、约5％至约30％、约5％至约20％、约5％至约10％、约10％至约50％、约10％至约40％、约10％至约30％、约10％至约20％、约20％至约50％、约20％至约40％、约20％至约30％、约30％至约50％、约30％至约40％或约40％至约50％的相应的野生型唾液酸酶在与所述蛋白酶在相同条件下温育时的蛋白水解切割。在某些实施方式中，将所述重组突变人唾液酸酶与蛋白酶(例如胰蛋白酶)温育，产生低于50％、低于40％、低于30％、低于10％、低于5％、低于3％、低于1％或低于0.5％的相应的野生型唾液酸酶在与所述蛋白酶在相同条件下温育时的蛋白水解切割。蛋白水解切割可以通过本领域中已知的任何方法来测量，包括例如通过在本文实施例5中所描述的SDS-PAGE。

[0116] 提高对蛋白水解切割的抗性的示例性替换包括：(i)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第242位的位置处丙氨酸残基的替换，例如被半胱氨酸(A242C)、苯丙氨酸(A242F)、甘氨酸(A242G)、组氨酸(A242H)、异亮氨酸(A242I)、赖氨酸(A242K)、亮氨酸(A242L)、甲硫氨酸(A242M)、天冬酰胺(A242N)、谷氨酰胺(A242Q)、精氨酸(A242R)、丝氨酸(A242S)、缬氨酸(A242V)、色氨酸(A242W)或酪氨酸(A242Y)替换；(ii)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第243位的位置处精氨酸残基的替换，例如被谷氨酸(R243E)、组氨酸(R243H)、天冬酰胺(R243N)、谷氨酰胺(R243Q)或赖氨酸(R243K)替换；(iii)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第244位的位置处缬氨酸残基的替换，例如被异亮氨酸(V244I)、赖氨酸(V244K)或脯氨酸(V244P)替换；或(iv)任何上述替换的组合。在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含选自A242C、A242F、A242Y和A242W的替换。在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含对应于在表5中列出的替换或替换组合的替换或替换组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。

[0117] 表5

[0118]

野生型人类 Neu2（SEQ ID NO：1）氨基酸	在特定位置处的示例性替换
A242	C、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、Y
R243	E、H、N、Q、K
V244	I、K、P

[0119] 提高对蛋白水解切割的抗性(和/或提高表达量和/或酶活性)的另外的示例性替换包括：(i)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第240位的位置处亮氨酸残基的替换，例如被天冬氨酸(L240D)、天冬酰胺(L240N)或酪氨酸(L240Y)替换；(ii)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第213位的位置处丙氨酸残基的替换，例如被半胱氨酸(A213C)、天冬酰胺(A213N)、丝氨酸(A213S)或苏氨酸(A213T)替换；(iii)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID

NO:1)的第241位的位置处精氨酸残基的替换,例如被丙氨酸(R241A)、天冬氨酸(R241D)、亮氨酸(R241L)、谷氨酰胺(R241Q)或酪氨酸(R241Y)替换;(iv)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第258位的位置处丝氨酸残基的替换,例如被半胱氨酸(S258C)替换;(v)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第260位的位置处亮氨酸残基的替换,例如被天冬氨酸(L260D)、苯丙氨酸(L260F)、谷氨酰胺(L260Q)或苏氨酸(L260T)替换;(vi)对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)的第265位的位置处缬氨酸残基的替换,例如被苯丙氨酸替换(V265F);或(vii)任何上述替换的组合。设想了在某些实施方式中,在这些位置处的替换或替换组合可以改善所述唾液酸酶中二级结构元件之间(例如α-螺旋与最近的β-片层之间)的疏水和/或芳香性相互作用,从而使所述结构稳定并提高对蛋白水解切割的抗性。

[0120] 在某些实施方式中,所述重组突变唾液酸酶包含在L240位置处的突变。在某些实施方式中,所述重组突变唾液酸酶包含在下述位置处的突变的组合:(i)A213和A242;(ii)A213、A242和S258;(iii)L240和L260;(iv)R241和A242;(v)A242和L260;(vi)A242和V265;或(vii)L240和A242。在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含选自下述的替换组合:(i)A213C、A242F和S258C;(ii)A213C和A242F;(iii)A213T和A242F;(iv)R241Y和A242F;和(v)L240Y和A242F。在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含对应于在表6中列出的替换或替换组合的替换或替换组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。

[0121] 表6

[0122]

替换
A242C，V244P
A242R，V244R
A242R，V244H

[0123]

A242Y，V244P
A242T，V244P
A242N，V244P
A213C，A242F
A213S，A242F
A213T，A242F
A213N，A242F
A213C，A242F，S258C
A242F，L260F
A242F，V265F
L240Y
L240Y，L260F
L240D，L260T
L240N，L260T
L240N，L260D
L240N，L260Q
L240Y，A242F
R241A，A242F
R241Y，A242F

[0124] e.其他替换

[0125] 本发明还提供了一种重组突变人唾液酸酶，其包含下述替换中的至少一者：I187K，A328E，K370N或H210N。在某些实施方式中，重组突变人类Neu2包含氨基酸GDYDAPTHQVQW(SEQ ID NO:15)被氨基酸SMDQGSTW(SEQ ID NO:16)或STDGGKTW(SEQ ID NO:17)的替换。在某些实施方式中，重组突变人类Neu2包含氨基酸PRPPAPEA(SEQ ID NO:18)被氨基酸QTPLEAAC(SEQ ID NO:19)的替换。在某些实施方式中，重组突变人类Neu2包含氨基酸NPRPPAPEA(SEQ ID NO:20)被氨基酸SQNDGES(SEQ ID NO:21)的替换。

[0126] 本发明还提供了一种重组突变人唾液酸酶，其包含在对应于V212、A213、Q214、D215、T216、L217、E218、C219、Q220、V221、A222、E223、V224、E225或T225的位置处的至少一个替换。

[0127] 本发明还提供了一种重组突变人唾液酸酶，其在表7中列出的位置处包含氨基酸替换(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)。在某些实施方式中，所述唾液酸酶包含在表7中鉴定的氨基酸替换。在某些实施方式中，所述唾液酸酶包含在表7中鉴定的任何氨基酸替换的组合。

[0128] 表7

[0129]

野生型人类 Neu2 (SEQ ID NO：1）氨基酸	在特定位置处的示例性替换
M1	D
L4	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D 或 H
P5	G
V6	Y
L7	F、Y、S、I、T 或 N
K9	D
V12	L、A、P、V、N、D 或 H
F13	S、N、R、K、T、G、D、E 或 A
I22	S、N、R、K、T、G、D、E、A、Y、L、F、P、V、I 或 H
A24	S、N、R、K、T、G、D、E、A、Y、L、F、P、V、I 或 H
L34	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D 或 H
A36	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D 或 H
K44	R 或 E
K45	A、E 或 R
L54	M
P62	H、G、N、T、S、F、I、D 或 E
H64	F、Y、S、I、T 或 N
Q69	H
R78	K
D80	P
P89	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H 或 M
A93	E 或 K
G107	D
Q108	H
Q112	R 或 K
C125	Y、F 或 L
Q126	E、F、H、I、L 或 Y
A150	V
T156	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A、P 或 T

[0130]

野生型人类 Neu2 (SEQ ID NO：1）氨基酸	在特定位置处的示例性替换
F157	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A 或 P
A158	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A、P 或 T
V159	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A 或 P
G160	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A、P 或 T
P161	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A 或 P
G162	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A、P 或 T
H163	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A 或 P
C164	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A、P 或 T
L165	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、A 或 P
R170	P
A171	G
V176	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V、P 或 A
P177	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D 或 H
A178	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D 或 H
L184	S、N、R、K、T、G、D、E、A、F、H、I、L、P、V 或 Y
H185	S、N、R、K、T、G、D、E 或 A
P186	S、N、R、K、T、G、D、E、A、F、H、I、L、P、V 或 Y
I187	S、N、R、K、T、G、D、E 或 A
Q188	P、S、N、R、K、T、G、D、E 或 A
R189	P
P190	F、M、A、D、G、H、N、P、R、S 或 T
I191	M、A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y、E、G、K 或 R
A194	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D 或 H
A213	C、N、S 或 T
L217	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y 或 V
C219	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y 或 V
A222	D
E225	P
H239	P
L240	D、N 或 Y
R241	A、D、L、Q 或 Y
A242	C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、V、W

[0131]

野生型人类 Neu2 (SEQ ID NO：1) 氨基酸	在特定位置处的示例性替换
	或 Y
V244	I 或 P
T249	A
D251	G
E257	P
S258	C
L260	D、F、Q 或 T
V265	F
Q270	S、T、A、H、P 或 F
G271	S、N、R、K、T、G、D、E 或 A
C272	S、N、R、K、T、G、D、E、A、C、H、Y、F、H、L、P 或 V
W292	R
S301	A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、T、V、W、Y、C 或 R
W302	A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、Y 或 K
E319	D
V325	F、Y、S、I、T、N、A、D、H、L、P 或 V
L326	F、Y、S、I、T、N、A、D、H、L、P 或 V
L327	F、Y、S、I、T、N、A、D、H、L、P 或 V
C332	A、D、G、H、N、P、R、S 或 T
Y359	A 或 S
V363	R、S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D 或 H
L365	K、Q、F、Y、S、I、T、N、A、D、H、L、P 或 V

[0132] 例如，在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含：(a)在对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处脯氨酸残基(P5)的替换；(b)在对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处赖氨酸残基(K9)的替换；(c)在对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处赖氨酸残基(K44)的替换；(d)在对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处赖氨酸残基(K45)的替换；(e)在对应于野生型人类Neu2的第54位的位置处亮氨酸残基(L54)的替换；(f)在对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处脯氨酸残基(P62)的替换；(g)在对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处谷氨酰胺残基(Q69)的替换；(h)在对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处精氨酸残基(R78)的替换；(i)在对应于野生型人类Neu2的第80位的位置处天冬氨酸残基(D80)的替换；(j)在对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处丙氨酸残基(A93)的替换；(k)在对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处甘氨酸残基(G107)的替换；(l)在对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处谷氨酰胺残基(Q108)的替换；(m)在对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处谷氨酰胺残基(Q112)的替换；(n)在对应于野生型人类Neu2的第125位的位置处半胱氨酸残基(C125)的替换；(o)在对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处谷氨酰胺残基(Q126)的替换；(p)在对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处丙氨酸

残基(A150)的替换;(q)在对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处半胱氨酸残基(C164)的替换;(r)在对应于野生型人类Neu2的第170位的位置处精氨酸残基(R170)的替换;(s)在对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处丙氨酸残基(A171)的替换;(t)在对应于野生型人类Neu2的第188位的位置处谷氨酰胺残基(Q188)的替换;(u)在对应于野生型人类Neu2的第189位的位置处精氨酸残基(R189)的替换;(v)在对应于野生型人类Neu2的第213位的位置处丙氨酸残基(A213)的替换;(w)在对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处亮氨酸残基(L217)的替换;(x)在对应于野生型人类Neu2的第225位的位置处谷氨酸残基(E225)的替换;(y)在对应于野生型人类Neu2的第239位的位置处组氨酸残基(H239)的替换;(z)在对应于野生型人类Neu2的第240位的位置处亮氨酸残基(L240)的替换;(aa)在对应于野生型人类Neu2的第241位的位置处精氨酸残基(R241)的替换;(bb)在对应于野生型人类Neu2的第242位的位置处丙氨酸残基(A242)的替换;(cc)在对应于野生型人类Neu2的第244位的位置处缬氨酸残基(V244)的替换;(dd)在对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处苏氨酸残基(T249)的替换;(ee)在对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处天冬氨酸残基(D251)的替换;(ff)在对应于野生型人类Neu2的第257位的位置处谷氨酸残基(E257)的替换;(gg)在对应于野生型人类Neu2的第258位的位置处丝氨酸残基(S258)的替换;(hh)在对应于野生型人类Neu2的第260位的位置处亮氨酸残基(L260)的替换;(ii)在对应于野生型人类Neu2的第265位的位置处缬氨酸残基(V265)的替换;(jj)在对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处谷氨酰胺残基(Q270)的替换;(kk)在对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处色氨酸残基(W292)的替换;(ll)在对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处丝氨酸残基(S301)的替换;(mm)在对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处色氨酸残基(W302)的替换;(nn)在对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处缬氨酸残基(V363)的替换;或(oo)在对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处亮氨酸残基(L365)的替换;或任何上述替换的组合。例如,所述唾液酸酶可以包含K9、P62、A93、Q216、A242、Q270、S301、W302、V363或L365的替换或任何上述替换的组合。

[0133] 在某些实施方式中,在所述唾液酸酶中:(a)对应于野生型人类Neu2的第5位的位置处的脯氨酸残基被组氨酸替换(P5H);(b)对应于野生型人类Neu2的第9位的位置处的赖氨酸残基被天冬氨酸替换(K9D);(c)对应于野生型人类Neu2的第44位的位置处的赖氨酸残基被精氨酸(K44R)或谷氨酸(K44E)替换;(d)对应于野生型人类Neu2的第45位的位置处的赖氨酸残基被丙氨酸(K45A)、精氨酸(K45R)或谷氨酸(K45E)替换;(e)对应于野生型人类Neu2的第54位的位置处的亮氨酸残基被甲硫氨酸替换(L54M);(f)对应于野生型人类Neu2的第62位的位置处的脯氨酸残基被天冬酰胺(P62N)、天冬氨酸(P62D)、组氨酸(P62H)、谷氨酸(P62E)、甘氨酸(P62G)、丝氨酸(P62S)或苏氨酸(P62T)替换;(g)对应于野生型人类Neu2的第69位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q69H);(h)对应于野生型人类Neu2的第78位的位置处的精氨酸残基被赖氨酸替换(R78K);(i)对应于野生型人类Neu2的第80位的位置处的天冬氨酸残基被脯氨酸替换(D80P);(j)对应于野生型人类Neu2的第93位的位置处的丙氨酸残基被谷氨酸(A93E)或赖氨酸(A93K)替换;(k)对应于野生型人类Neu2的第107位的位置处的甘氨酸残基被天冬氨酸替换(G107D);(l)对应于野生型人类Neu2的第108位的位置处的谷氨酰胺残基被组氨酸替换(Q108H);(m)对应于野生型人类Neu2的第112位的位置处的谷氨酰胺残基被精氨酸(Q112R)或赖氨酸(Q112K)替换;(n)对应于野生型人类

Neu2的第125位的位置处的半胱氨酸残基被亮氨酸替换(C125L)；(o)对应于野生型人类Neu2的第126位的位置处的谷氨酰胺残基被亮氨酸(Q126L)、谷氨酸(Q126E)、苯丙氨酸(Q126F)、组氨酸(Q126H)、异亮氨酸(Q126I)或酪氨酸(Q126Y)替换；(p)对应于野生型人类Neu2的第150位的位置处的丙氨酸残基被缬氨酸替换(A150V)；(q)对应于野生型人类Neu2的第164位的位置处的半胱氨酸残基被甘氨酸替换(C164G)；(r)对应于野生型人类Neu2的第170位的位置处的精氨酸残基被脯氨酸替换(R170P)；(s)对应于野生型人类Neu2的第171位的位置处的丙氨酸残基被甘氨酸替换(A171G)；(t)对应于野生型人类Neu2的第188位的位置处的谷氨酰胺残基被脯氨酸替换(Q188P)；(u)对应于野生型人类Neu2的第189位的位置处的精氨酸残基被脯氨酸替换(R189P)；(v)对应于野生型人类Neu2的第213位的位置处的丙氨酸残基被半胱氨酸(A213C)、天冬酰胺(A213N)、丝氨酸(A213S)或苏氨酸(A213T)替换；(w)对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处的亮氨酸残基被丙氨酸(L217A)或缬氨酸(L217V)替换；(x)对应于野生型人类Neu2的第249位的位置处的苏氨酸残基被丙氨酸替换(T249A)；(y)对应于野生型人类Neu2的第251位的位置处的天冬氨酸残基被甘氨酸替换(D251G)；(z)对应于野生型人类Neu2的第225位的位置处的谷氨酸残基被脯氨酸替换(E225P)；(aa)对应于野生型人类Neu2的第239位的位置处的组氨酸残基被脯氨酸替换(H239P)；(bb)对应于野生型人类Neu2的第240位的位置处的亮氨酸残基被天冬氨酸(L240D)、天冬酰胺(L240N)或酪氨酸(L240Y)替换；(cc)对应于野生型人类Neu2的第241位的位置处的精氨酸残基被丙氨酸(R241A)、天冬氨酸(R241D)、亮氨酸(R241L)、谷氨酰胺(R241Q)或酪氨酸(R241Y)替换；(dd)对应于野生型人类Neu2的第242位的位置处的丙氨酸残基被半胱氨酸(A242C)、苯丙氨酸(A242F)、甘氨酸(A242G)、组氨酸(A242H)、异亮氨酸(A242I)、赖氨酸(A242K)、亮氨酸(A242L)、甲硫氨酸(A242M)、天冬酰胺(A242N)、谷氨酰胺(A242Q)、精氨酸(A242R)、丝氨酸(A242S)、缬氨酸(A242V)、色氨酸(A242W)或酪氨酸(A242Y)替换；(ee)对应于野生型人类Neu2的第244位的位置处的缬氨酸残基被异亮氨酸(V244I),赖氨酸(V244K)或脯氨酸(V244P)替换；(ff)对应于野生型人类Neu2的第257位的位置处的谷氨酸残基被脯氨酸替换(E257P)；(gg)对应于野生型人类Neu2的第258位的位置处的丝氨酸残基被半胱氨酸替换(S258C)；(hh)对应于野生型人类Neu2的第260位的位置处的亮氨酸残基被天冬氨酸(L260D)、苯丙氨酸(L260F)、谷氨酰胺(L260Q)或苏氨酸(L260T)替换；(ii)对应于野生型人类Neu2的第265位的位置处的缬氨酸残基被苯丙氨酸替换(V265F)；(jj)对应于野生型人类Neu2的第270位的位置处的谷氨酰胺残基被丙氨酸(Q270A)、组氨酸(Q270H)、苯丙氨酸(Q270F)、脯氨酸(Q270P)、丝氨酸(Q270S)或苏氨酸(Q270T)替换；(kk)对应于野生型人类Neu2的第292位的位置处的色氨酸残基被精氨酸替换(W292R)；(ll)对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处的丝氨酸残基被丙氨酸(S301A)、天冬氨酸(S301D)、谷氨酸(S301E)、苯丙氨酸(S301F)、甘氨酸(S301G)、组氨酸(S301H)、异亮氨酸(S301I)、赖氨酸(S301K)、亮氨酸(S301L)、甲硫氨酸(S301M)、天冬酰胺(S301N)、脯氨酸(S301P)、谷氨酰胺(S301Q)、精氨酸(S301R)、苏氨酸(S301T)、缬氨酸(S301V)、色氨酸(S301W)或酪氨酸(S301Y)替换；(mm)对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处的色氨酸残基被丙氨酸(W302A)、天冬氨酸(W302D)、谷氨酸(W302E)、苯丙氨酸(W302F)、甘氨酸(W302G)、组氨酸(W302H)、异亮氨酸(W302I)、赖氨酸(W302K)、亮氨酸(W302L)、甲硫氨酸(W302M)、天冬酰胺(W302N)、脯氨酸(W302P)、谷氨酰胺(W302Q)、精氨酸(W302R)、丝氨酸

(W302S)、苏氨酸(W302T)、缬氨酸(W302V)或酪氨酸(W302Y)替换;(nn)对应于野生型人类Neu2的第363位的位置处的缬氨酸残基被精氨酸替换(V363R);或(oo)对应于野生型人类Neu2的第365位的位置处的亮氨酸残基被谷氨酰胺(L365Q)、组氨酸(L365H)、异亮氨酸(L365I)、赖氨酸(L365K)或丝氨酸(L365S)替换;或所述唾液酸酶包含任何上述替换的组合。例如,所述唾液酸酶可以包含选自K9D、P62G、P62N、P62S、P62T、D80P、A93E、Q126H、Q126Y、R189P、H239P、A242T、Q270A、Q270S、Q270T、S301A、S301R、W302K、W302R、V363R或L365I的替换或任何上述替换的组合。

[0134] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含对应于野生型人类Neu2的第184位的位置处的亮氨酸残基的缺失(ΔL184)、对应于野生型人类Neu2的第185位的位置处的组氨酸残基的缺失(ΔH185)、对应于野生型人类Neu2的第186位的位置处的脯氨酸残基的缺失(ΔP186)、对应于野生型人类Neu2的第187位的位置处的异亮氨酸残基的缺失(ΔI187)和对应于野生型人类Neu2的第184位的位置处的谷氨酰胺残基的缺失(ΔQ188),或任何上述缺失的组合。

[0135] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含在对应于野生型人类Neu2的第216位的位置处的苏氨酸残基与对应于野生型人类Neu2的第217位的位置处的亮氨酸残基之间的插入,例如选自S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、and H的氨基酸的插入。

[0136] 其他的示例性唾液酸酶突变和唾液酸酶突变的组合描述在2019年1月3日提交的国际(PCT)专利申请号PCT/US2019/012207中,包括在详细描述中题为"I.重组人唾液酸酶"的章节中和实施例中的实施例1、2、3、4、5和6中。

[0137] f.替换的组合

[0138] 本发明还提供了一种重组突变人唾液酸酶,其包含本文中设想的任何突变的组合。例如,所述重组突变唾液酸酶可以包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个本文中设想的突变的组合。设想了所述重组突变唾液酸酶可以包含1-15、1-10、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-15、2-10、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-15、3-10、3-7、3-6、3-5或3-4个本文中设想的突变。

[0139] 例如,所述重组突变唾液酸酶可以包含M1缺失(ΔM1)、M1A替换、M1D替换、V6Y替换、K9D替换、P62G替换、P62N替换、P62S替换、P62T替换、A93E替换、I187K替换、Q270A替换、S301R替换、W302K替换、C332A替换、V363R替换、L365I替换或任何上述缺失和替换的组合。

[0140] 在某些实施方式中,所述重组突变唾液酸酶包含M1缺失(ΔM1)、M1A替换、M1D替换、V6Y替换、I187K替换、C332A替换或任何上述缺失和替换的组合。例如,所述重组突变唾液酸酶可以包含选自下述的突变的组合:M1A和V6Y;M1A和I187K;M1A和C332A;M1D和V6Y;M1D和I187K;M1D和C332A;ΔM1和V6Y;ΔM1和I187K;ΔM1和C332A;V6Y和I187K;V6Y和C332A;I187K和C332A;M1A、V6Y和I187K;M1A、V6Y和C332A;M1A、I187K和C332A;M1D、V6Y和I187K;M1D、V6Y和C332A;M1D、I187K和C332A;ΔM1、V6Y和I187K;ΔM1、V6Y和C332A;ΔM1、I187K和C332A;V6Y、I187K和C332A;M1A、V6Y、I187K和C332A;M1D、V6Y、I187K和C332A;以及ΔM1、V6Y、I187K和C332A。

[0141] 在某些实施方式中,所述重组突变唾液酸酶包含:(i)表7中鉴定的氨基酸替换或表7中鉴定的任何氨基酸替换的组合,和(ii)M1缺失(ΔM1)、M1A替换、M1D替换、V6Y替换、I187K替换、C332A替换或任何上述缺失和替换的组合。例如,所述重组突变唾液酸酶可以包

含:(i)表7中鉴定的氨基酸替换或表7中鉴定的任何氨基酸替换的组合,和(ii)选自下述的突变的组合:M1A和V6Y;M1A和I187K;M1A和C332A;M1D和V6Y;M1D和I187K;M1D和C332A;ΔM1和V6Y;ΔM1和I187K;ΔM1和C332A;V6Y和I187K;V6Y和C332A;I187K和C332A;M1A、V6Y和I187K;M1A、V6Y和C332A;M1A、I187K和C332A;M1D、V6Y和I187K;M1D、V6Y和C332A;M1D、I187K和C332A;ΔM1、V6Y和I187K;ΔM1、V6Y和C332A;ΔM1、I187K和C332A;V6Y、I187K和C332A;M1A、V6Y、I187K和C332A;M1D、V6Y、I187K和C332A;以及ΔM1、V6Y、I187K和C332A。

[0142] 在某些实施方式中,所述重组突变唾液酸酶包含:(a)M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K和C332A替换;(b)M1D、V6Y、K9D、A93E、I187K、C332A、V363R和L365I替换;(c)M1D、V6Y、P62N、I187K和C332A替换;(d)M1D、V6Y、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(e)M1D、V6Y、P62S、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(f)M1D、V6Y、P62T、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(g)M1D、V6Y、P62N、I187K、Q270A、S301R、W302K和C332A替换;(h)M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、W302R和C332A替换;(i)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、Q270T和C332A替换;(j)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K和C332A替换;或(k)M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、A242F、Q270T和C332A替换。

[0143] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含在对应于野生型人类Neu2的第301位的位置处丝氨酸残基(S301)的替换与在对应于野生型人类Neu2的第302位的位置处色氨酸残基(W302)的替换的组合。例如,所述重组突变人唾液酸酶可以包含对应于表8的行中列出的替换组合的替换组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。例如,所述重组突变人唾液酸酶可以包含:S301K和W302R替换;S301K和W302K替换;或S301A和W302S替换。

[0144] 表8

[0145]

替换
S301A，W302R
S301A，W302S
S301A，W302T
S301K，W302S
S301N，W302S
S301T，W302S
S301T，W302T
S301T，W302R
S301A，W302A
S301K，W302R
S301K，W302T
S301N，W302T

[0146]

S301K，W302K
S301P，W302R
S301P，W302S
S301P，W302T

[0147] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含对应于表9的行中列出的替换组合的替换组合(氨基酸位置对应于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1))。

[0148] 表9

[0149]

替换
M1D、V6Y、P62G、I187K、C332A
M1D、V6Y、K9D、I187K、C332A、V363R、L365I
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、C332A
M1D、V6Y、K9D、I187K、C332A、V363R、L365K
M1D、V6Y、K9D、I187K、C332A、V363R、L365S
M1D、V6Y、K9D、I187K、C332A、V363R、L365Q
M1D、V6Y、K9D、I187K、C332A、V363R、L365H
M1D、V6Y、A93K、I187K、C332A
M1D、V6Y、A93E、I187K、C332A
V6Y、I187K、W292R
V6Y、G107D、I187K
V6Y、C125L
C125L、I187K
V6Y、C125L、I187K
M1D、V6Y、K45A、I187K、C332A
M1D、V6Y、Q270A、I187K、C332A
M1D、V6Y、K44R、K45R、I187K、C332A
M1D、V6Y、Q112R、I187K、C332A
M1D、V6Y、Q270F、I187K、C332A
M1D、V6Y、I187K、S301R、W302K、C332A
M1D、V6Y、K44E、K45E、I187K、C332A
M1D、V6Y、I187K、L217V、C332A
M1D、V6Y、I187K、L217A、C332A
M1D、V6Y、K44E、K45E、I187K、S301R、W302K、C332A
M1D、V6Y、Q112R、I187K、S301R、W302K、C332A
M1D、V6Y、I187K、Q270A、S301R、W302K、C332A
M1D、V6Y、K44E、K45E、Q112R、I187K、C332A
M1D、V6Y、K44E、K45E、I187K、Q270A、C332A

[0150]

替换
M1D、V6Y、K45A、I187K、Q270A、C332A
M1D、V6Y、I187K、Q270H、C332A
M1D、V6Y、I187K、Q270P、C332A
M1D、V6Y、Q112K、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62S、I187K、Q270A、S301R、W302K、C332A
M1D、V6Y、P62T、I187K、Q270A、S301R、W302K、C332A
M1D、V6Y、P62N、I187K、Q270A、S301R、W302K、C332A
V6Y、P62H、I187K
V6Y、Q108H、I187K
M1D、V6Y、P62H、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、I187K、C332A
V6Y、P62G、I187K
M1D、V6Y、P62H、I187K
M1D、V6Y、Q108H、I187K
M1D、V6Y、P62N、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62D、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62E、I187K、C332A
V6Y、C164G、I187K、T249A
V6Y、C164G、I187K
V6Y、Q126L、I187K、D251G
V6Y、L54M、Q69H、R78K、A171G、I187K
V6Y、P62T、I187K
V6Y、A150V、I187K
P5H、V6Y、P62S、I187K
V6Y、C164G、I187K
Q126Y、Q170T
Q126Y、A242F、Q270T
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126E、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126I、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126L、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126F、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126H、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、Q270S、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、Q270T、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、Q270T、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、Q126Y、I187K、A242F、Q270T、C332A
M1D、V6Y、P62G、D80P、A93E、I187K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、R170P、I187K、C332A

[0151]

替换
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、Q188P、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、R189P、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、E225P、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、H239P、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、E257P、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301D、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301E、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301F、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301H、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301K、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301L、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301M、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301N、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301P、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301Q、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301R、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301T、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301V、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301W、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301Y、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302A、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302D、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302F、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302G、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302H、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302I、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302L、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302M、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302N、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302P、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302Q、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302R、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302S、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302T、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302V、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、W302Y、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、W302A、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、W302R、C332A

[0152]

替换
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、W302S、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301A、W302T、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301K、W302S、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301K、W302R、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301K、W302T、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301N、W302S、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301N、W302T、C332A
M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K、S301T、W302R、C332A
Q126Y、Q270T
Q126Y、A242F、Q270T

[0153] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含SEQ ID NO:48-54、149、154、159或191中的任一者的氨基酸序列或与SEQ ID NO:48-54、149、154、159或191中的任一者具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0154] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含氨基酸序列$X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX_7X_8DEHAELIVX_9RRGDYDAX_{10}THQVQWX_{11}AQEVVAQAX_{12}LDGHRSMNPCPLYDX_{13}QTGTLFLFFIAIPX_{14}X_{15}VTEX_{16}QQLQTRANVTRLX_{17}X_{18}VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX_{19}YREWSTFAVGPGHX_{20}LQLHDRX_{21}RSLVVPAYAYRKLHPX_{22}QRPIPSAFX_{23}FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX_{24}ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX_{25}NX_{26}GLDFQX_{27}SQLVKKLVEPPPX_{28}GX_{29}QGSVISFPSPRSGPGSPAQX_{30}LLYTHPTHX_{31}X_{32}QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX_{33}LLAKGSX_{34}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX_{35}LYEANDYEEIX_{36}FX_{37}MFTLKQAFPAEYLPQ$(SEQ ID NO:47),其中$X_1$是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Ala或Lys,X_3是Asn或Leu,X_4是Pro或His,X_5是Phe、Trp、Tyr或Val,X_6是Lys或Asp,X_7是Lys、Arg或Glu,X_8是Lys、Ala、Arg或Glu,X_9是Leu或Met,X_{10}是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr,X_{11}是Gln或His,X_{12}是Arg或Lys,X_{13}是Ala、Glu或Lys,X_{14}是Gly或Asp,X_{15}是Gln或His,X_{16}是Gln、Arg或Lys,X_{17}是Ala、Cys、Ile、Ser、Val或Leu,X_{18}是Gln或Leu,X_{19}是Ala或Val,X_{20}是Cys或Gly,X_{21}是Ala或Gly,X_{22}是Arg、Ile或Lys,X_{23}是Ala、Cys、Leu或Val,X_{24}是Leu、Ala或Val,X_{25}是Thr或Ala,X_{26}是Asp或Gly,X_{27}是Glu或Lys,X_{28}是Gln、Ala、His、Phe或Pro,X_{29}是Cys或Val,X_{30}是Trp或Arg,X_{31}是Ser或Arg,X_{32}是Trp或Lys,X_{33}是Lys或Val,X_{34}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{35}是Cys、Leu或Val,X_{36}是Val或Arg,并且X_{37}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。

[0155] 在某些实施方式中,所述重组突变人唾液酸酶包含氨基酸序列$X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX_4THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX_5QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX_6QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX_7GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX_8X_9QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX_{10}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX_{11}FX_{12}MFTLKQAFPAEYLPQ$

[0156] (SEQ ID NO:46),其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Phe、Trp、Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Asp、His、Glu、

Gly、Ser或Thr，X_5是Ala、Glu或Lys，X_6是Arg、Ile或Lys，X_7是Gln、Ala、His、Phe或Pro，X_8是Ser或Arg，X_9是Trp或Lys，X_{10}是Ala、Cys、Ser或Val，X_{11}是Val或Arg，并且X_{12}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser，并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。在某些实施方式中，X_1是Ala、Asp、Met或不存在，X_2是Tyr或Val，X_3是Lys或Asp，X_4是Pro、Asn、Gly、Ser或Thr，X_5是Ala或Glu，X_6是Ile或Lys，X_7是Gln或Ala，X_8是Ser或Arg，X_9是Trp或Lys，X_{10}是Ala或Cys，X_{11}是Val或Arg，并且X_{12}是Leu或Ile。

[0157] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含氨基酸序列$X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX_7X_8DEHAELIVX_9RRGDYDAX_{10}THQVQWX_{11}AQEVVAQAX_{12}LX_{13}GHRSMNPCPLYDX_{14}QTGTLFLFFIAIPX_{15}X_{16}VTEX_{17}QQLQTRANVTRLX_{18}X_{19}VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX_{20}YREWSTFAVGPGHX_{21}LQLHDX_{22}X_{23}RSLVVPAYAYRKLHPX_{24}X_{25}X_{26}PIPSAFX_{27}FLSHDHGRTWARGHFVX_{28}QDTX_{29}ECQVAEVX_{30}TGEQRVVTLNARSX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}RX_{35}QAQSX_{36}NX_{37}GLDFQX_{38}X_{39}QX_{40}VKKLX_{41}EPPPX_{42}GX_{43}QGSVISFPSPRSGPGSPAQX_{44}LLYTHPTHX_{45}X_{46}QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX_{47}LLAKGSX_{48}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX_{49}LYEANDYEEIX_{50}FX_{51}MFTLKQAFPAEYLPQ$

[0158] (SEQ ID NO:182)，其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在，X_2是Ala或Lys，X_3是Asn或Leu，X_4是Pro或His，X_5是Phe、Trp、Tyr或Val，X_6是Lys或Asp，X_7是Lys、Arg或Glu，X_8是Lys、Ala、Arg或Glu，X_9是Leu或Met，X_{10}是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr，X_{11}是Gln或His，X_{12}是Arg或Lys，X_{13}是Asp或Pro，X_{14}是Ala、Glu或Lys，X_{15}是Gly或Asp，X_{16}是Gln或His，X_{17}是Gln、Arg或Lys，X_{18}是Ala、Cys、Ile、Ser、Val或Leu，X_{19}是Gln、Leu、Glu、Phe、His、Ile、Leu或Tyr，X_{20}是Ala或Val，X_{21}是Cys或Gly，X_{22}是Arg或Pro，X_{23}是Ala或Gly，X_{24}是Arg、Ile或Lys，X_{25}是Gln或Pro，X_{26}是Arg或Pro，X_{27}是Ala、Cys、Leu或Val，X_{28}是Ala、Cys、Asn、Ser或Thr，X_{29}是Leu、Ala或Val，X_{30}是Glu或Pro，X_{31}是His或Pro，X_{32}是Leu、Asp、Asn或Tyr，X_{33}是Arg、Ala、Asp、Leu、Gln或Tyr，X_{34}是Ala、Cys、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr，X_{35}是Val、Ile或Lys，X_{36}是Thr或Ala，X_{37}是Asp或Gly，X_{38}是Glu、Lys或Pro，X_{39}是Ser或Cys，X_{40}是Leu、Asp、Phe、Gln或Thr，X_{41}是Val或Phe，X_{42}是Gln、Ala、His、Phe、Pro、Ser或Thr，X_{43}是Cys或Val，X_{44}是Trp或Arg，X_{45}是Ser、Arg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Thr、Val、Trp或Tyr，X_{46}是Trp、Lys、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Tyr，X_{47}是Lys或Val，X_{48}是Ala、Cys、Ser或Val，X_{49}是Cys、Leu或Val，X_{50}是Val或Arg，并且X_{51}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser，并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。

[0159] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶包含氨基酸序列$X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX_4THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX_5QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCX_6VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX_7QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRX_8RVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX_9GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX_{10}X_{11}QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX_{12}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX_{13}FX_{14}MFTLKQAFPAEYLPQ$

[0160] (SEQ ID NO:183)，其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在，X_2是Phe、Trp、Tyr或Val，X_3是Lys或Asp，X_4是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr，X_5是Ala、Glu或Lys，X_6是Gln、Leu、Glu、Phe、His、Ile、Leu或Tyr，X_7是Arg、Ile

或Lys，X_8是Ala、Cys、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr，X_9是Gln、Ala、His、Phe、Pro、Ser或Thr，X_{10}是Ser、Arg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Thr、Val、Trp或Tyr，X_{11}是Trp、Lys、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Tyr，X_{12}是Ala、Cys、Ser或Val，X_{13}是Val或Arg，并且X_{14}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser，并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。在某些实施方式中，X_1是Ala、Asp、Met或不存在，X_2是Tyr或Val，X_3是Lys或Asp，X_4是Pro、Asn、Gly、Ser或Thr，X_5是Ala或Glu，X_6是Gln或Tyr，X_7是Ile或Lys，X_8是Ala或Thr，X_9是Gln、Ala或Thr，X_{10}是Ser、Arg或Ala，X_{11}是Trp、Lys或Arg，X_{12}是Ala或Cys，X_{13}是Val或Arg，并且X_{14}是Leu或Ile。

[0161] 在某些实施方式中，所述重组突变人唾液酸酶相对于本文中公开的重组突变人唾液酸酶序列包含保守替换。当在本文中使用时，术语“保守替换”是指使用结构上相似的氨基酸的替换。例如，保守替换可以包括下述组内的替换：Ser和Cys；Leu、Ile和Val；Glu和Asp；Lys和Arg；Phe、Tyr和Trp；以及Gln、Asn、Glu、Asp和His。保守替换也可以由BLAST(基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool))算法、BLOSUM替换矩阵(例如BLOSUM 62矩阵)或PAM替换:p矩阵(例如PAM 250矩阵)定义。

[0162] 序列同一性可以以本领域技术人员的技术范围之内的各种不同方式确定，例如使用可公开获得的计算机软件例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。使用被程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx利用的算法的BLAST(基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool))分析(Karlin等，(1990)PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 87:2264-2268；Altschul，(1993)J.MOL.EVOL.36:290-300；Altschul等，(1997)NUCLEIC ACIDS RES.25:3389-3402，其通过引用并入本文)被定制用于序列相似性搜索。对于搜索序列数据库中的基本问题的讨论，参见Altschul等，(1994)NATURE GENETICS 6:119-129，其整体通过引用并入本文。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适合的参数，包括在被比较的序列的全长内实现最大对齐所需的任何算法。用于直方图、描述、比对、期望值(即用于报告与数据库序列匹配的统计显著性阈值)、截止值、矩阵和过滤器的搜索参数处于默认设置。被blastp、blastx、tblastn和tblastx使用的默认评分矩阵是BLOSUM62矩阵(Henikoff等，(1992)PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 89:10915-10919，其整体通过引用并入本文)。四个blastn参数可以如下调整：Q＝10(间隙生成罚分)；R＝10(间隙延伸罚分)；wink＝1(在沿着 查询序列的每个第wink位置处产生单词命中)；和gapw＝16(设置在其中生成带间隙的对齐的窗口宽度)。等效的blastp参数设置可以是Q＝9；R＝2；wink＝1；和gapw＝32。搜索也可以使用NCBI(国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information))的BLAST高级选项参数来进行(例如：-G，开放间隙成本[整数]：默认值＝对于核苷酸来说5/对于蛋白质来说11；-E，延伸间隙成本[整数]：默认值＝对于核苷酸来说2/对于蛋白质来说1；-q，核苷酸错配罚分[整数]：默认值＝-3；-r，核苷酸匹配奖励[整数]：默认值＝1；-e，预期值[实数]：默认值＝10；-W，词长[整数]：默认值＝对于核苷酸来说11/对于megablast来说28/对于蛋白质来说3；-y，以字节为单位的blast延伸的衰减(X)：默认值＝对于blastn来说20/对于其他来说7；-X，带间隙的比对的X衰减值(以字节为单位)：默认值＝对于所有程序来说15，不适用于blastn；和-Z，带间隙的比对的最终X衰减值(以字节为单位)：对于blastn来说50，对于其他来说25)。用于逐对蛋白质比对

的ClustalW也可以使用(默认参数可以包括例如Blosum62矩阵和间隙开放罚分＝10和间隙延伸罚分＝0.1)。在GCG软件包10.0版中可用的序列之间的Bestfit比较使用DNA参数GAP＝50(间隙生成罚分)和LEN＝3(间隙延伸罚分)。Bestfit蛋白质比较中的等效设置是GAP＝8和LEN＝2。

[0163] II.融合蛋白/抗体偶联物

[0164] 为了促进超唾液酸化癌细胞上和/或肿瘤微环境中唾液酸的选择性去除,将本文中所描述的唾液酸酶靶向这种细胞或这种肿瘤微环境可能是有帮助的。此外,为了在受试者中促进用唾液酸酶除去唾液酸,延长所述唾液酸酶在受试者中的血浆半衰期可能是有帮助的。这些可以通过将所述唾液酸酶包含在融合蛋白和/或抗体偶联物(例如化学偶联的偶联物)中来实现。

[0165] 因此,本发明还提供了融合蛋白,其包含唾液酸酶或其功能性片段和抗体的部分或片段例如免疫球蛋白Fc结构域(在本文中也被称为Fc结构域)或免疫球蛋白抗原结合结构域(在本文中也被称为抗原结合结构域)。在某些实施方式中,所述唾液酸酶和所述抗体或其部分(例如免疫球蛋白Fc结构域或抗原结合结构域)通过肽键或氨基酸连接物相连。

[0166] 当在本文中使用时,除非另有指明,否则术语“融合蛋白”被理解为是指包含基于两个或更多个分开的蛋白质或多肽链的氨基酸序列的单一多肽链,其中所述两个氨基酸序列可以直接地或通过居间的连接物序列例如通过居间的氨基酸连接物融合在一起。编码融合蛋白的核苷酸序列可以例如使用常规的重组DNA技术来产生。

[0167] 在某些实施方式中,所述融合蛋白包含标签例如Strep标签(例如Strep II标签)、His标签(例如10x His标签)、myc标签或FLAG标签。所述标签可以位于所述融合蛋白的C-端或N-端上。在某些实施方式中,融合蛋白以N-至C-端的方向包含唾液酸酶部分和与其联结的包含免疫球蛋白重链的多肽,其中所述唾液酸酶部分包含MEDLRP(SEQ ID NO:4)的N-端添加,并且Strep II标签位于所述免疫球蛋白重链的C-端或所述唾液酸酶部分的N-端上。

[0168] a.唾液酸酶部分

[0169] 本文中描述的融合蛋白的唾液酸酶部分可以是任何唾液酸酶,例如真菌、细菌、非人类哺乳动物或人类的唾液酸酶。在某些实施方式中,所述唾液酸酶部分是如上所述的重组人唾液酸酶,其相对于野生型人唾液酸酶包含至少一个突变,例如至少一个氨基酸的替换、缺失或添加。

[0170] 在某些实施方式中,所述唾液酸酶是本文中公开的任何重组突变人唾液酸酶或其功能性片段。

[0171] 在某些实施方式中,所述唾液酸酶部分包含C332A和C352L突变。在某些实施方式中,所述唾液酸酶包含MEDLRP(SEQ ID NO:4)或EDLRP(SEQ ID NO:3)的N-端添加。在某些实施方式中,所述唾液酸酶部分在N-端上包含LSHSLST(SEQ ID NO:22)肽。在某些实施方式中,所述唾液酸酶部分包含MEDLRP(SEQ ID NO:4)的N-端添加和A2K替换、在某些实施方式中,所述唾液酸酶部分包含MEDLRP(SEQ ID NO:4)的N-端添加和C332A替换。在某些实施方式中,所述唾液酸酶部分包含MEDLRP(SEQ ID NO:4)的N-端添加、C332A替换和C352L替换。

[0172] 在某些实施方式中,所述唾液酸酶部分包含M1缺失(ΔM1)、M1A替换、M1D替换、V6Y替换、K9D替换、P62G替换、P62N替换、P62S替换、P62T替换、A93E替换、Q126Y替换、I187K替换、A242T替换、Q270A替换、Q270T替换、S301R替换、S301R替换、W302K替换、W302R替换、

C332A替换、V363R替换、L365I替换或任何上述缺失和替换的组合。

[0173] 在某些实施方式中，所述唾液酸酶部分包含SEQ ID NO:48-54、149、154、159或191中的任一者的氨基酸序列与SEQ ID NO:48-54、149、154、159或191中的任一者具有至少85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的氨基酸序列。

[0174] b.抗体部分

[0175] 当在本文中使用时，除非另有指明，否则术语“抗体”被理解为意味着完整抗体(例如完整单克隆抗体)或其片段，例如抗体的Fc片段(例如单克隆抗体的Fc片段)或抗体的抗原结合片段(例如单克隆抗体的抗原结合片段)，包括完整抗体、已被修饰、工程化改造或化学偶联的抗原结合片段或Fc片段。抗原结合片段的实例包括Fab、Fab’、$(Fab')_2$、Fv、单链抗体(例如scFv)、微型抗体和双体抗体。已被修饰或工程化改造的抗体的实例包括嵌合抗体、人源化抗体和多特异性抗体(例如双特异性抗体)。化学偶联的抗体的实例是偶联到毒素组成部分的抗体。

[0176] 在某些实施方式中，所述融合蛋白包含免疫球蛋白Fc结构域。当在本文中使用时，除非另有指明，否则术语“免疫球蛋白Fc结构域”是指免疫球蛋白重链恒定区的一个片段，其单独地或与第二免疫球蛋白Fc结构域相组合能够结合到Fc受体。免疫球蛋白Fc结构域可以包括例如免疫球蛋白CH2和CH3结构域。免疫球蛋白Fc结构域可以包括例如免疫球蛋白CH2和CH3结构域和免疫球蛋白铰链区。免疫球蛋白铰链区、CH2和CH3结构域之间的边界在本领域中是公知的，并且可以在例如PROSITE数据库(可以在万维网网址prosite.expasy.org处获得)中找到。

[0177] 在某些实施方式中，所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM Fc结构域。可以引入单个氨基酸替换(根据Kabat编号系统S228P；被称为IgG4Pro)以废除在重组IgG4抗体中观察到的非均质性。参见Angal,S等，(1993)MOL.IMMUNOL.30:105-108。

[0178] 在某些实施方式中，所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人IgG1同种型或引发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体介导的细胞毒性(CDC)的另一种同种型。在某些实施方式中，所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人IgG1同种型(例如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:5)。

[0179] 在某些实施方式中，所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人IgG4同种型或很少或不引发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体介导的细胞毒性(CDC)的另一种同种型。在某些实施方式中，所述免疫球蛋白Fc结构域源自于人IgG4同种型。

[0180] 在某些实施方式中，所述免疫球蛋白Fc结构域包含“杵”突变例如T366Y或“臼”突变例如Y407T，用于与第二多肽的异二聚化(残基号码根据EU编号系统，Kabat,E.A.等，(1991)《免疫学重要的蛋白质的序列》(SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST)第五版，U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。

[0181] 在某些实施方式中，所述融合蛋白包含免疫球蛋白抗原结合结构域。这个结构域的包含可以改进融合蛋白向唾液酸化癌细胞和/或肿瘤微环境的靶向。当在本文中使用时，除非另有指明，否则术语“免疫球蛋白抗原结合结构域”是指单独地或与另一个免疫球蛋白抗原结合结构域相组合定义了抗原结合部位的多肽。示例性的免疫球蛋白抗原结合结构域

包括例如免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述可变区一起定义了抗原结合部位。

[0182] 所述免疫球蛋白抗原结合结构域和/或抗原结合部位可以源自于选自例如阿达卡莫单抗、阿斯库昔单抗、西妥木单抗、卡那妥单抗、达雷木单抗、屈西他单抗、杜利他单抗、杜伐单抗、杜昔单抗、enfortumab、恩提库单抗、依帕妥珠单抗、figitumumab、盖尼塔单抗、glembatumumab、intetumumab、伊匹单抗、英妥木单抗、icrucumab、lexatumumab、lucatumumab、马帕木单抗、narnatumab、奈昔木单抗、nesvacumab、奥法木单抗、奥拉木单抗、帕尼单抗、patritumab、pritumumab、radretumab、雷莫芦单抗、rilotumumab、罗妥木单抗、seribantumab、tarextumab、teprotumumab、tovetumab、vantictumab、vesencumab、伏妥莫单抗、扎鲁目单抗、flanvotumab、阿妥莫单抗、anatumomab、阿西莫单抗、贝妥莫单抗、博纳吐单抗、地莫单抗、替伊莫单抗、明瑞莫单抗、米妥莫单抗、moxetumomab、naptumomab、nofetumomab、培妥莫单抗、pintumomab、racotumomab、沙妥莫单抗、solitomab、taplitumomab、替妥莫单抗、托西莫单抗、曲美目单抗、abagovomab、阿特珠单抗、德瓦鲁单抗、阿维单抗、igovomab、奥戈伏单抗、capromab、依决洛单抗、nacolomab、amatuximab、巴维昔单抗、本妥昔单抗、西妥昔单抗、derlotuximab、达妥昔单抗、恩昔妥昔单抗、弗图希单抗、吉伦妥昔单抗、indatuximab、isatuximab、margetuximab、利妥昔单抗、司妥昔单抗、ublituximab、ecromeximab、abituzumab、阿仑单抗、贝伐单抗、bivatuzumab、brontictuzumab、cantuzumab、cantuzumab、citatuzumab、clivatuzumab、dacetuzumab、demcizumab、dalotuzumab、丹因珠单抗、埃罗妥珠单抗、emactuzumab、emibetuzumab、enoblituzumab、etaracizumab、farletuzumab、ficlatuzumab、吉妥单抗、尹戈妥珠单抗、英妥珠单抗、labetuzumab、lifastuzumab、林妥珠单抗、lirilumab、lorvotuzumab、lumretuzumab、马妥珠单抗、milatuzumab、moxetumomab、尼妥珠单抗、奥滨尤妥珠单抗、ocaratuzumab、otlertuzumab、onartuzumab、oportuzumab、巴萨妥珠单抗、帕妥珠单抗、pidilizumab、pinatuzumab、polatuzumab、西罗珠单抗、simtuzumab、tacatuzumab、tigatuzumab、曲妥珠单抗、tucotuzumab、urelumab、vandortuzumab、vanucizumab、veltuzumab、vorsetuzumab、sofituzumab、卡妥索单抗、厄妥索单抗、depatuxizumab、ontuxizumab、blontuvetmab、tamtuvetmab、纳武单抗、派姆单抗、依帕珠单抗、MEDI9447、urelumab、utomilumab、hu3F8、hu14.18-IL-2、3F8/OKT3BsAb、lirilumab、BMS-986016pidilizumab、AMP-224、AMP-514、BMS-936559、阿特珠单抗和阿维单抗的抗体。在某些实施方式中，所述免疫球蛋白抗原结合结构域可以源自于选自曲妥珠单抗、达雷木单抗、吉伦妥昔单抗、奥法木单抗和利妥昔单抗的抗体。

[0183] 在某些实施方式中，所述免疫球蛋白抗原结合结构域源自于曲妥珠单抗。曲妥珠单抗重链氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:63中，并且曲妥珠单抗轻链氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:64中。源自于曲妥珠单抗的示例性scFv的氨基酸序列描绘在SEQ ID NO:65中。

[0184] 所述免疫球蛋白抗原结合结构域和/或抗原结合部位可以源自于结合癌抗原的抗体，所述癌抗原选自例如腺苷A2a受体(A2aR)、A激酶锚定蛋白4(AKAP4)、B黑素瘤抗原(BAGE)、印迹位点调控物家族(BORIS)、断裂点簇集区Abelson酪氨酸激酶(BCR/ABL)、CA125、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD52、CD73、CD137、癌胚抗原(CEA)、CS1、细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)、雌激素受体结合位点相关抗原9(EBAG9)、表皮生长因子

(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGF样模块受体2(EMR2)、表皮细胞粘附分子(EpCAM)(17-1A)、FR-α、G抗原(GAGE)、二唾液酸神经节苷脂GD2(GD2)、糖蛋白100(gp100)、人表皮生长因子受体2(Her2)、肝细胞生长因子(HGF)、人乳头状瘤病毒16(HPV-16)、热休克蛋白105(HSP105)、异柠檬酸脱氢酶1型(IDH1)、独特型(NeuGcGM3)、吲哚胺-2,3-双加氧酶1(IDO1)、IGF-1、IGF1R、IGG1K、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)、淋巴细胞抗原6复合体K(LY6K)、基质金属蛋白酶-16(MMP16)、黑素转铁蛋白(MFI2)、黑素瘤抗原3(MAGE-A3)、黑素瘤抗原C2(MAGE-C2)、黑素瘤抗原D4(MAGE-D4)、被T-细胞识别的黑素瘤抗原1(Melan-A/MART-1)、N-甲基-N'-亚硝基胍人骨肉瘤转化基因(MET)、粘蛋白1(MUC1)、粘蛋白4(MUC4)、粘蛋白16(MUC16)、纽约食管鳞状细胞癌1(NY-ESO-1)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、程序化细胞死亡受体1(PD-1)、程序化细胞死亡受体配体1(PD-L1)、磷脂酰丝氨酸、黑素瘤的偏好性表达抗原(PRAME)、前列腺特异性抗原(PSA)、蛋白质酪氨酸激酶7(PTK7,也被称为结肠癌激酶4(CCK4))、受体酪氨酸激酶孤儿受体1(ROR1)、离散因子受体激酶、唾液酸基-Tn、精子相关抗原9(SPAG-9)、滑膜肉瘤X-染色体断裂点1(SSX1)、生存素、端粒酶、T-细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域-3(TIM-3)、血管内皮生长因子(VEGF)(例如VEGF-A)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、T-细胞活化的含有V-结构域免疫球蛋白的抑制物(VISTA)、威尔姆氏瘤-1(WT1)、X染色体抗原1b(XAGE-1b)、5T4、间皮素、磷脂酰肌醇聚糖3(GPC3)、叶酸受体α(FRα)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、cMET、CD38、B细胞成熟抗原(BCMA)、CD123、CLDN6、CLDN9、LRRC15、PRLR(催乳素受体)、RING指蛋白43(RNF43)、尿路斑块蛋白-1B(UPK1B)、肿瘤坏死因子超家族成员9(TNFSF9)、肿瘤坏死因子受体超家族成员21(TNFSRF21)、骨形态发生蛋白受体1B型(BMPR1B)、含有Kringle结构域的跨膜蛋白2(KREMEN2)、Delta样蛋白3(DLL3)、Siglec7和Siglec9。其他示例性癌抗原包括在癌症干细胞上发现的癌抗原,例如SSEA3、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA1、CD133(AC133)、CD90(Thy-1)、CD326(EpCAM)、Cripto-1(TDGF1)、PODXL-1(足细胞标志蛋白样蛋白1)、ABCG2、CD24、CD49f(整合蛋白α6)、Notch2、CD146(MCAM)、CD10(脑啡肽酶)、CD117(c-KIT)、CD26(DPP-4)、CXCR4、CD34、CD271、CD13(丙氨酸氨肽酶)、CD56(NCAM)、CD105(内皮因子)、LGR5、CD114(CSF3R)、CD54(ICAM-1)、CXCR1、2、TIM-3(HAVCR2)、CD55(DAF)、DLL4(Delta样配体4)、CD20(MS4A1)和CD96。

[0185] 本发明还提供了含有一个或多个本文中公开的融合蛋白的抗体偶联物。当在本文中使用时,除非另有指明,否则术语"抗体偶联物"被理解为是指偶联(例如共价偶联)到其他有功能的组成部分的抗体或其包含抗原结合活性和/或Fc受体结合活性的功能性片段。在某些实施方式中,所述抗体或功能性抗体片段被偶联到唾液酸酶例如本文中公开的重组突变人唾液酸酶。在某些实施方式中,抗体偶联物包含单一多肽链。在某些实施方式中,抗体偶联物包含共价或非共价结合在一起的2、3、4个或更多个多肽链,以产生多聚体复合物例如二聚体、三聚体或四聚体复合物。

[0186] 表10示出了适合于按照本发明使用的抗体和抗体-药物偶联物、被所述抗体或抗体-药物偶联物结合的抗原以及对于某些抗体来说被所述抗体或抗体-药物偶联物靶向的癌症类型。

[0187] 表10

[0188]

抗体或抗体-药物偶联物	癌抗原	癌症类型
奥戈伏单抗	CA125	
吉伦妥昔单抗	CAIX	
奥滨尤妥珠单抗	CD20	
奥法木单抗	CD20	
利妥昔单抗	CD20	
阿仑单抗	CD52	
伊匹单抗	细胞毒性 T-淋巴细胞相关抗原 4（CTLA-4）	
曲美单抗	CTLA-4	
西妥昔单抗	表皮生长因子受体（EGFR）	
耐昔妥珠单抗	EGFR	
帕尼单抗	EGFR	
扎鲁目单抗	EGFR	
依决洛单抗	表皮细胞粘附分子（EpCAM）（17-1A）	
farletuzumab	FR-α	
帕妥珠单抗	人表皮生长因子受体 2（Her2）	
曲妥珠单抗	Her2	
rilotumumab	HGF	
figitumumab	IGF-1	
盖尼塔单抗	IGF1R	
德瓦鲁单抗	IGG1K	
巴维昔单抗	磷脂酰丝氨酸	
onartuzumab	扩散因子受体激酶	
贝伐单抗	血管内皮生长因子-A（VEGF-A）	
雷莫芦单抗	血管内皮生长因子受	

[0189]

抗体或抗体-药物偶联物	癌抗原	癌症类型
	体 2（VEGFR2）	
博纳吐单抗	CD19	急性成淋巴细胞性白血病（ALL）
利妥昔单抗； 奥法木单抗； 替伊莫单抗（例如 ^{90}Y-替伊莫单抗）； 托西莫单抗（例如 ^{131}I-托西莫单抗）	CD20	非霍奇金淋巴瘤（NHL），慢性淋巴细胞性白血病（CLL） B 细胞 NHL 前 B 细胞 ALL
本妥昔单抗（例如本妥昔单抗 vedotin）	CD30	霍奇金淋巴瘤
吉妥单抗（例如奥吉妥单抗）	CD33	急性髓系白血病（AML）
阿仑单抗	CD52	CLL
伊匹单抗	细胞毒性 T-淋巴细胞相关抗原 4（CTLA-4）	不可切除的或转移性黑素瘤
西妥昔单抗； 帕尼单抗	表皮生长因子受体（EGFR）	结肠直肠癌（CRC） 头颈癌
卡妥索单抗	表皮细胞粘附分子（EpCAM）	恶性腹水
曲妥珠单抗； 帕妥珠单抗	人表皮生长因子受体 2（HER2）	乳腺癌
纳武单抗； 派姆单抗	程序化细胞死亡受体 1（PD-1）	转移黑素瘤，非小细胞肺癌（NSCLC）
贝伐单抗	血管内皮生长因子（VEGF）	乳腺癌，宫颈癌，CRC，NSCLC 肾细胞癌（RCC），卵巢癌 成胶质细胞瘤
雷莫芦单抗	血管内皮生长因子受体 2（VEGF-R2）	胃癌 NSCLC
依帕珠单抗； moxetumomab； 英妥珠单抗 （例如奥英妥珠单抗）	CD22	急性成淋巴细胞性白血病（ALL）
MEDI9447	CD73	晚期实体肿瘤
Urelumab； utomilumab （ PF-05082566）	CD137	晚期实体肿瘤

[0190]

抗体或抗体-药物偶联物	癌抗原	癌症类型
埃罗妥珠单抗	CD2 亚组 1（CS1）	多发性骨髓瘤
曲美单抗	细胞毒性 T-淋巴细胞相关抗原 4（CTLA-4）	恶性间皮瘤
耐昔妥珠单抗	表皮生长因子受体（EGFR）	非小细胞肺癌（NSCLC）
dinutuximab；hu3F8；hu14.18-IL-2；3F8/OKT3BsAb	二唾液酸神经节苷脂 GD2（GD2）	成神经细胞瘤 成视网膜细胞瘤 黑素瘤 其他实体肿瘤
Racotumomab	独特型（NeuGcGM3）	NSCLC，乳腺癌，黑素瘤
Lirilumab	killer cell immunoglobulin-like 受体（KIR）	淋巴瘤
BMS-986016	淋巴细胞活化基因 3（LAG-3）	乳腺癌，血液肿瘤，晚期实体肿瘤
Onartuzumab	N-甲基-N'-亚硝基胍人类骨肉瘤转化基因（MET）	NSCLC
abagovomab；奥戈伏单抗	粘蛋白 16（MUC16）	卵巢癌
pidilizumab；AMP-224； AMP-514	程序化细胞死亡受体 1（PD-1）	B-细胞淋巴瘤；黑素瘤，CRC
BMS-936559；阿特珠单抗； 德瓦鲁单抗；阿维单抗	程序化细胞死亡受体配体 1（PD-L1）	NSCLC，肾细胞癌（RCC） 膀胱癌，乳腺癌 黑素瘤，头颈部鳞状细胞癌（SCCHN）
naptumomab（例如 naptumomab estafenatox）	5T4	RCC，CRC 前列腺癌

[0191] c.连接物

[0192] 在某些实施方式中，所述融合蛋白的唾液酸酶部分可以被直接连接或融合到所述融合蛋白的抗体部分（例如免疫球蛋白Fc结构域和/或免疫球蛋白抗原结合结构域）。在其他实施方式中，所述唾液酸酶部分可以通过连接物共价结合到所述抗体部分。

[0193] 所述连接物可以与一个或多个天然氨基酸、所述唾液酸酶或其功能性片段、所述抗体部分或片段偶联，其中所述氨基酸（例如半胱氨酸氨基酸）可以通过定点突变引入。所述连接物可以包括一个或多个非天然氨基酸。设想了在某些情况下，含有例如一个或多个巯基反应性基团（例如马来酰亚胺）的连接物可以共价连接所述唾液酸酶部分或抗体部分中的半胱氨酸，其是天然存在的半胱氨酸残基或者是位点特异性突变的产物。

[0194] 所述连接物可以是可切断的连接物或不可切断的连接物。任选地或此外，所述连

接物可以是柔性连接物或非柔性连接物。

[0195] 所述连接物应该具有足够长的长度，以允许所述唾液酸酶和抗体部分没有空间位阻地彼此连接，并且应该足够短，以保留所述融合蛋白的目标活性。所述连接物优选地足够亲水，以避免或最小化所述融合蛋白的不稳定性。所述连接物优选地足够亲水，以避免或最小化所述融合蛋白的不溶性。所述连接物应该在体内足够稳定(例如它不被血清、酶等切断)，以允许在体内操作所述融合蛋白。

[0196] 所述连接物可以具有约1 埃(Å)至约150 Å的长度或约1 Å至约120 Å的长度或约5 Å至约110 Å的长度或约10 Å至约100 Å的长度。所述连接物可以具有大于约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27、30埃或更大的长度和/或小于约110、100、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31 Å或更小的长度。此外，所述连接物可以具有约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110和120 Å的长度。

[0197] 在某些实施方式中，所述连接物包含将所述融合蛋白的唾液酸酶部分连接或融合到所述融合蛋白的抗体部分(例如免疫球蛋白Fc结构域和/或免疫球蛋白抗原结合结构域)的多肽连接物。例如，设想了编码直接或间接(例如通过含有氨基酸的连接物)连接到抗体部分的唾液酸酶部分的基因，可以使用常规重组DNA技术来产生和表达。例如，唾液酸酶部分的氨基端可以被连接到抗体部分的轻链或重链的羧基端。例如，对于Fab片段来说，可以将所述唾液酸酶的氨基端或羧基端连接到抗体重链的第一恒定结构域(CH1)。当使用连接物时，所述连接物可以包含亲水性氨基酸残基例如Gln、Ser、Gly、Glu、Pro、His和Arg。在某些实施方式中，所述连接物是含有1-25个氨基酸残基、1-20个氨基酸残基、2-15个氨基酸残基、3-10个氨基酸残基、3-7个氨基酸残基、4-25个氨基酸残基、4-20个氨基酸残基、4-15个氨基酸残基、4-10个氨基酸残基、5-25个氨基酸残基、5-20个氨基酸残基、5-15个氨基酸残基或5-10个氨基酸残基的肽。示例性连接物包括富含甘氨酸和丝氨酸的连接物例如$(GlyGlyPro)_n$或$(GlyGlyGlyGlySer)_n$，其中n是1-5。在某些实施方式中，所述连接物包含GGGGS(SEQ ID NO:184)、由其组成或基本上由其组成。在某些实施方式中，所述连接物包含GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:145)、由其组成或基本上由其组成。在某些实施方式中，所述连接物包含EPKSS(SEQ ID NO:146)、由其组成或基本上由其组成。其他示例性连接物序列被公开在例如George等，(2003)PROTEIN ENGINEERING 15:871-879和美国专利号5,482,858和5,525,491中。

[0198] 在某些实施方式中，所述融合蛋白包含SEQ ID NO:66-85、98-142、150-153、155-158、160-163、166-178、185、187、189或192-197中的任一者的氨基酸序列或与SEQ ID NO:66-85、98-142、150-153、155-158、160-163、166-178、185、187、189或192-197中的任一者具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0199] d.抗体偶联物

[0200] 本发明还提供了包含本文中公开的融合蛋白的抗体偶联物。所述抗体偶联物可以包含单个多肽链(即本文中公开的融合蛋白)，或者所述抗体偶联物可以包含另外的多肽链(例如1、2或3个另外的多肽链)。例如，抗体偶联物可以包含含有重组突变人唾液酸酶和免疫球蛋白重链的第一多肽(融合蛋白)和含有免疫球蛋白轻链的第二多肽，其中例如所述免

疫球蛋白重链和轻链一起定义了单个抗原结合部位。

[0201] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物可以包括单个唾液酸酶。在其他实施方式中,所述抗体偶联物可以包括超过一个(例如两个)唾液酸酶。如果包括超过一个唾液酸酶,则所述唾液酸酶可以相同或不同。在某些实施方式中,所述抗体偶联物可以包括单个抗原结合部位。在其他实施方式中,所述抗体偶联物可以包括超过一个(例如两个)抗原结合部位。如果使用两个抗原结合部位,则它们可以相同或不同。在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含免疫球蛋白Fc片段。

[0202] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含一个或两个免疫球蛋白重链或其功能性片段。在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含一个或两个免疫球蛋白轻链或其功能性片段。在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含融合到免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链的N-或C-端的唾液酸酶。

[0203] 图9描绘了含有一个或多个唾液酸酶的示例性抗体偶联物构建物。例如,在图9A中,第一抗原结合部位被描绘为10,第二抗原结合部位被描绘为20,唾液酸酶被描绘为30,Fab被描绘为40。在图9A-9I中描绘的每个构建物中,应该理解所述Fc可以任选地以某些方式修饰,例如使用杵臼(Knobs-into-Holes)类型的技术,例如由图9B中的50所示。在整个图9中,相似的结构用相似的示意图描绘。

[0204] 图9A描绘的抗体偶联物构建物包含:包含第一免疫球蛋白轻链的第一多肽;包含第一免疫球蛋白重链的第二多肽;包含第二免疫球蛋白重链的第三多肽;和包含第二免疫球蛋白轻链的第四多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起,所述第三和第四多肽可以被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中,所述第一多肽和第二多肽一起定义了被描绘为10的第一抗原结合部位,并且所述第三多肽和第四多肽一起定义了被描绘为20的第二抗原结合部位。被描绘为30的唾液酸酶可以被偶联到所述第一和第二免疫球蛋白轻链或所述第一和第二免疫球蛋白重链的的N-或C-端。

[0205] 图9B描绘的抗体偶联物构建物包含:包含第一免疫球蛋白轻链的第一多肽;包含第一免疫球蛋白重链的第二多肽;包含第二免疫球蛋白重链的第三多肽;和包含第二免疫球蛋白轻链的第四多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起,所述第三和第四多肽可以被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中,所述第一多肽和第二多肽一起定义了第一抗原结合部位,并且所述第三多肽和第四多肽一起定义了第二抗原结合部位。唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白轻链或第一免疫球蛋白重链的N-或C-端。

[0206] 图9C描绘的抗体偶联物构建物包含:包含免疫球蛋白轻链的第一多肽;包含免疫球蛋白重链的第二多肽;和包含免疫球蛋白Fc结构域的第三多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中,所述第一多肽和第二多肽一起定义了抗原结合部位。唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白轻链或第一免疫球蛋白重链的N-或C-端。

[0207] 图9D描绘的抗体偶联物构建物包含:包含免疫球蛋白轻链的第一多肽;包含免疫球蛋白重链的第二多肽;和包含免疫球蛋白Fc结构域和第一唾液酸酶的第三多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。

所述共价键连接可以是二硫键。所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。在某些实施方式中，所述第一多肽和第二多肽一起定义了抗原结合部位。任选的第二唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白轻链或第一免疫球蛋白重链的N-或C-端。

[0208] 图9E描绘的抗体偶联物构建物包含：包含免疫球蛋白轻链的第一多肽；包含免疫球蛋白重链的第二多肽；和包含免疫球蛋白Fc结构域和第一唾液酸酶的第三多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起，并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶。在某些实施方式中，所述第一多肽和第二多肽一起定义了抗原结合部位。任选的第二唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白轻链或第一免疫球蛋白重链的N-或C-端。

[0209] 图9F描绘的抗体偶联物构建物包含：包含第一免疫球蛋白Fc结构域的第一多肽，和包含第二免疫球蛋白Fc结构域的第二多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白Fc结构域的N-或C-端或所述第二免疫球蛋白Fc结构域的N-或C-端。任选的第二唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白Fc结构域的N-或C-端或所述第二免疫球蛋白Fc结构域的N-或C-端。

[0210] 图9G描绘的抗体偶联物构建物包含：包含免疫球蛋白轻链的第一多肽；和包含免疫球蛋白重链可变区的第二多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中，所述第一多肽和第二多肽一起定义了抗原结合部位。所述唾液酸酶可以被偶联到所述免疫球蛋白轻链或免疫球蛋白重链可变区的N-或C-端。

[0211] 图9H描绘的抗体偶联物构建物包含：包含第一免疫球蛋白Fc结构域的第一多肽，和包含第二免疫球蛋白Fc结构域的第二多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白Fc结构域或第二免疫球蛋白Fc结构域的N-端。任选的第二唾液酸酶可以被分别偶联到所述第二免疫球蛋白Fc结构域或第一免疫球蛋白Fc结构域的N-端。单链可变区片段(scFv)可以被偶联到所述第一免疫球蛋白Fc结构域或第二免疫球蛋白Fc结构域的C-端。任选的第二单链可变区片段(scFv)可以被分别偶联到所述第一免疫球蛋白Fc结构域或第二免疫球蛋白Fc结构域的C-端。

[0212] 图9I描绘了与图9H中描绘的相似的抗体偶联物构建物，区别在于每个scFv被免疫球蛋白抗原结合片段例如Fab代替。例如，图9I描绘的抗体偶联物构建物包含：包含第一免疫球蛋白Fc结构域的第一多肽，和包含第二免疫球蛋白Fc结构域的第二多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。唾液酸酶可以被偶联到所述第一免疫球蛋白Fc结构域或第二免疫球蛋白Fc结构域的N-端。任选的第二唾液酸酶可以被分别偶联到所述第二免疫球蛋白Fc结构域或第一免疫球蛋白Fc结构域的N-端。抗体片段(Fab)可以被偶联或融合到所述第一免疫球蛋白Fc结构域或第二免疫球蛋白Fc结构域的C-端。任选的第二抗体片段(Fab)可以被分别偶联或融合到所述第二免疫球蛋白Fc结构域或第一免疫球蛋白Fc结构域的C-端。在融合的情况下，所述Fc结构域的C端被连接(通过键或氨基酸连接物)到定义免疫球蛋白抗原结合片段的第一多肽链。在具有由单个可变区定

义的抗原结合部位的抗体的情况下，这可能足以提供对靶抗原的结合亲和性。在其他情况下，例如在人类抗体的情况下，所述定义了免疫球蛋白抗原结合片段的第一多肽链可以被偶联(例如共价偶联，例如通过二硫键)到定义了免疫球蛋白抗原结合片段的第二多肽链，所述两个抗原结合片段一起定义了用于结合所述靶抗原的抗原结合部位。

[0213] 图10描绘了另外的抗体偶联物构建物。例如图10描绘了能够抗体偶联物构建物，其包含：包含免疫球蛋白轻链的第一多肽；包含免疫球蛋白重链和scFv的第二多肽；和包含免疫球蛋白Fc结构域和第一唾液酸酶的第三多肽。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起，并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。所述第二多肽以N-至C-端的方向包含所述重链和scFv。所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。在某些实施方式中，所述第一多肽和第二多肽一起定义了第一抗原结合部位。在某些实施方式中，所述scFv定义了第二抗原结合部位。图10描绘了一种另外的抗体构建物，其包含：包含免疫球蛋白轻链的第一多肽；包含免疫球蛋白重链的第二多肽；和包含免疫球蛋白Fc结构域和第一唾液酸酶的第三多肽，其中Fab片段被偶联到所述免疫球蛋白重链的N-端。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起，并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。在某些实施方式中，所述第一多肽和第二多肽一起定义了第一抗原结合部位。在某些实施方式中，所述Fab片段定义了第二抗原结合部位。在图10中描绘的每种构建物中，应该理解scFv在存在时可以被Fab片段代替，或者Fab片段在存在时可以被scFv代替。在图10中描绘的每种构建物中，应该理解所述Fc可以任选地以某种方式被修饰。

[0214] 在某些实施方式中，所述抗体偶联物包含：包含第一免疫球蛋白轻链的第一多肽；包含第一免疫球蛋白重链和第一唾液酸酶的第二多肽；包含第二免疫球蛋白重链和第二唾液酸酶的第三多肽；和包含第二免疫球蛋白轻链的第四多肽。这个实施方式的实例示出在图11A中。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起，所述第三和第四多肽可以被共价连接在一起，并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中，所述第一多肽和第二多肽一起定义了第一抗原结合部位，并且所述第三多肽和第四多肽一起定义了第二抗原结合部位。在某些实施方式中，所述第二和第三多肽分别以N-至C-端的方向包含所述第一和第二免疫球蛋白重链和所述第一和第二唾液酸酶。在某些实施方式中，所述第二和第三多肽分别以N-至C-端的方向包含所述第一和第二唾液酸酶和所述第一和第二免疫球蛋白重链。

[0215] 在某些实施方式中，所述抗体偶联物包含：包含免疫球蛋白轻链的第一多肽；包含免疫球蛋白重链的第二多肽；和包含免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶的第三多肽。这个实施方式的实例示出在图11B中。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起，并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中，所述第一多肽和第二多肽一起定义了抗原结合部位。在某些实施方式中，所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域，或以N-至C-端的方向包含所述免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶。

[0216] 在某些实施方式中，所述第一多肽包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列或与SEQ ID NO:66具有至少85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的氨基酸序列。在某些

实施方式中，所述第二多肽包含SEQ ID NO:67或189的氨基酸序列或与SEQ ID NO:67或189具有至少85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述第三多肽包含SEQ ID NO:68-74、98-112、150、151、155、156、160、161、185、187、192或195中的任一者的氨基酸序列或与SEQ ID NO:68-74、98-112、150、151、155、156、160、161、185、187、192或195中的任一者具有至少85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的氨基酸序列。

[0217] 在某些实施方式中，所述第三多肽包含氨基酸序列$X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7X_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_{10}$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LDGHRSMNPCPLYDX$_{13}$QTGTLFLFFIAIPX$_{14}X_{15}$VTEX$_{16}$QQLQTRANVTRLX$_{17}X_{18}$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{19}$YREWSTFAVGPGHX$_{20}$LQLHDRX$_{21}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{22}$QRPIPSAFX$_{23}$FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX$_{24}$ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX$_{25}$NX$_{26}$GLDFQX$_{27}$SQLVKKLVEPPPX$_{28}$GX$_{29}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{30}$LLYTHPTHX$_{31}X_{32}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{33}$LLAKGSX$_{34}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{35}$LYEANDYEEIX$_{36}$FX$_{37}$MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0218] (SEQ ID NO:76)，其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在，X_2是Ala或Lys，X_3是Asn或Leu，X_4是Pro或His，X_5是Phe、Trp、Tyr或Val，X_6是Lys或Asp，X_7是Lys、Arg或Glu，X_8是Lys、Ala、Arg或Glu，X_9是Leu或Met，X_{10}是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr，X_{11}是Gln或His，X_{12}是Arg或Lys，X_{13}是Ala、Glu或Lys，X_{14}是Gly或Asp，X_{15}是Gln或His，X_{16}是Gln、Arg或Lys，X_{17}是Ala、Cys、Ile、Ser、Val或Leu，X_{18}是Gln或Leu，X_{19}是Ala或Val，X_{20}是Cys或Gly，X_{21}是Ala或Gly，X_{22}是Arg、Ile或Lys，X_{23}是Ala、Cys、Leu或Val，X_{24}是Leu、Ala或Val，X_{25}是Thr或Ala，X_{26}是Asp或Gly，X_{27}是Glu或Lys，X_{28}是Gln、Ala、His、Phe或Pro，X_{29}是Cys或Val，X_{30}是Trp或Arg，X_{31}是Ser或Arg，X_{32}是Trp或Lys，X_{33}是Lys或Val，X_{34}是Ala、Cys、Ser或Val，X_{35}是Cys、Leu或Val，X_{36}是Val或Arg，并且X_{37}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser，并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。

[0219] 在某些实施方式中，所述第三多肽包含氨基酸序列X_1ASLPX$_2$LQX$_3$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX$_4$THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX$_5$QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX$_6$QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_7$GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX$_8X_9$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{10}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_{11}$FX$_{12}$MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0220] (SEQ ID NO:75)，其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在，X_2是Phe、Trp、Tyr或Val，X_3是Lys或Asp，X_4是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr，X_5是Ala、Glu或Lys，X_6是Arg、Ile或Lys，X_7是Gln、Ala、His、Phe或Pro，X_8是

Ser或Arg,X_9是Trp或Lys,X_{10}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{11}是Val或Arg,并且X_{12}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。在某些实施方式中,X_1是Ala、Asp、Met或不存在,X_2是Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Gly、Ser或Thr,X_5是Ala或Glu,X_6是Ile或Lys,X_7是Gln或Ala,X_8是Ser或Arg,X_9是Trp或Lys,X_{10}是Ala或Cys,X_{11}是Val或Arg,并且X_{12}是Leu或Ile。

[0221] 在某些实施方式中,所述第三多肽包含氨基酸序列$X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7X_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_{10}$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LDGHRSMNPCPLYDX$_{13}$QTGTLFLFFIAIPX$_{14}X_{15}$VTEX$_{16}$QQLQTRANVTRLX$_{17}X_{18}$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{19}$YREWSTFAVGPGHX$_{20}$LQLHDRX$_{21}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{22}$QRPIPSAFX$_{23}$FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX$_{24}$ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX$_{25}$NX$_{26}$GLDFQX$_{27}$SQLVKKLVEPPPX$_{28}$GX$_{29}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{30}$LLYTHPTHX$_{31}X_{32}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{33}$LLAKGSX$_{34}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{35}$LYEANDYEEIX$_{36}$FX$_{37}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{38}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:144),其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Ala或Lys,X_3是Asn或Leu,X_4是Pro或His,X_5是Phe、Trp、Tyr或Val,X_6是Lys或Asp,X_7是Lys、Arg或Glu.X_8是Lys、Ala、Arg或Glu,X_9是Leu或Met,X_{10}是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr,X_{11}是Gln或His,X_{12}是Arg或Lys,X_{13}是Ala、Glu或Lys,X_{14}是Gly或Asp,X_{15}是Gln或His,X_{16}是Gln、Arg或Lys,X_{17}是Ala、Cys、Ile、Ser、Val或Leu,X_{18}是Gln或Leu,X_{19}是Ala或Val,X_{20}是Cys或Gly,X_{21}是Ala或Gly,X_{22}是Arg、Ile或Lys,X_{23}是Ala、Cys、Leu或Val,X_{24}是Leu、Ala或Val,X_{25}是Thr或Ala,X_{26}是Asp或Gly,X_{27}是Glu或Lys,X_{28}是Gln、Ala、His、Phe或Pro,X_{29}是Cys或Val,X_{30}是Trp或Arg,X_{31}是Ser或Arg,X_{32}是Trp或Lys,X_{33}是Lys或Val,X_{34}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{35}是Cys、Leu或Val,X_{36}是Val或Arg,X_{37}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,X_{38}是GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:145)或EPKSS(SEQ ID NO:146),并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。

[0222] 在某些实施方式中,所述第三多肽包含氨基酸序列X_1ASLPX$_2$LQX$_3$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX$_4$THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX$_5$QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX$_6$QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_7$GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX$_8X_9$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{10}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_{11}$FX$_{12}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{13}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0223] (SEQ ID NO:143),其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Phe、Trp、Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr,X_5是Ala、Glu或Lys,X_6是Arg、Ile或Lys,X_7是Gln、Ala、His、Phe或Pro,X_8是Ser或Arg,X_9是Trp或Lys,X_{10}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{11}是Val或Arg,X_{12}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,并且X_{13}是GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:145)或EPKSS(SEQ ID NO:146),并且所述唾液

酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。在某些实施方式中,X_1是Ala、Asp、Met或不存在,X_2是Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Gly、Ser或Thr,X_5是Ala或Glu,X_6是Ile或Lys,X_7是Gln或Ala,X_8是Ser或Arg,X_9是Trp或Lys,X_{10}是Ala或Cys,X_{11}是Val或Arg,并且X_{12}是Leu或Ile。

[0224] 在某些实施方式中,所述第三多肽包含氨基酸序列$X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7X_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_{10}$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LX$_{13}$GHRSMNPCPLYDX$_{14}$QTGTLFLFFIAIPX$_{15}X_{16}$VTEX$_{17}$QQLQTRANVTRLX$_{18}X_{19}$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{20}$YREWSTFAVGPGHX$_{21}$LQLHDX$_{22}X_{23}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{24}X_{25}X_{26}$PIPSAFX$_{27}$FLSHDHGRTWARGHFVX$_{28}$QDTX$_{29}$ECQVAEVX$_{30}$TGEQRVVTLNARSX$_{31}X_{32}X_{33}X_{34}$RX$_{35}$QAQSX$_{36}$NX$_{37}$GLDFQX$_{38}X_{39}$QX$_{40}$VKKLX$_{41}$EPPPX$_{42}$GX$_{43}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{44}$LLYTHPTHX$_{45}X_{46}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{47}$LLAKGSX$_{48}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{49}$LYEANDYEEIX$_{50}$FX$_{51}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{52}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0225] (SEQ ID NO:165),其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Ala或Lys,X_3是Asn或Leu,X_4是Pro或His,X_5是Phe、Trp、Tyr或Val,X_6是Lys或Asp,X_7是Lys、Arg或Glu,X_8是Lys、Ala、Arg或Glu,X_9是Leu或Met,X_{10}是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr,X_{11}是Gln或His,X_{12}是Arg或Lys,X_{13}是Asp或Pro,X_{14}是Ala、Glu或Lys,X_{15}是Gly或Asp,X_{16}是Gln或His,X_{17}是Gln、Arg或Lys,X_{18}是Ala、Cys、Ile、Ser、Val或Leu,X_{19}是Gln、Leu、Glu、Phe、His、Ile、Leu或Tyr,X_{20}是Ala或Val,X_{21}是Cys或Gly,X_{22}是Arg或Pro,X_{23}是Ala或Gly,X_{24}是Arg、Ile或Lys,X_{25}是Gln或Pro,X_{26}是Arg或Pro,X_{27}是Ala、Cys、Leu或Val,X_{28}是Ala、Cys、Asn、Ser或Thr,X_{29}是Leu、Ala或Val,X_{30}是Glu或Pro,X_{31}是His或Pro,X_{32}是Leu、Asp、Asn或Tyr,X_{33}是Arg、Ala、Asp、Leu、Gln或Tyr,X_{34}是Ala、Cys、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr,X_{35}是Val、Ile或Lys,X_{36}是Thr或Ala,X_{37}是Asp或Gly,X_{38}是Glu、Lys或Pro,X_{39}是Ser或Cys,X_{40}是Leu、Asp、Phe、Gln或Thr,X_{41}是Val或Phe,X_{42}是Gln、Ala、His、Phe、Pro、Ser或Thr,X_{43}是Cys或Val,X_{44}是Trp或Arg,X_{45}是Ser、Arg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Thr、Val、Trp或Tyr,X_{46}是Trp、Lys、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Tyr,X_{47}是Lys或Val,X_{48}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{49}是Cys、Leu或Val,X_{50}是Val或Arg,X_{51}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,X_{52}是GGGGS(SEQ ID NO:184)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:145)或EPKSS(SEQ ID NO:146),并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。

[0226] 在某些实施方式中,所述第三多肽包含氨基酸序列X_1ASLPX$_2$LQX$_3$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX$_4$THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX$_5$QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCX$_6$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX$_7$QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRX$_8$RVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_9$GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX$_{10}$X$_{11}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{12}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_{13}$FX$_{14}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{15}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV

LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0227] (SEQ ID NO:164),其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Phe、Trp、Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr,X_5是Ala、Glu或Lys,X_6是Gln、Leu、Glu、Phe、His、Ile、Leu或Tyr,X_7是Arg、Ile或Lys,X_8是Ala、Cys、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr,X_9是Gln、Ala、His、Phe、Pro、Ser或Thr,X_{10}是Ser、Arg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Thr、Val、Trp或Tyr,X_{11}是Trp、Lys、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Tyr,X_{12}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{13}是Val或Arg,X_{14}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,X_{15}是GGGGS(SEQ ID NO:184)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:145)或EPKSS(SEQ ID NO:146),并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。在某些实施方式中,X_1是Ala、Asp、Met或不存在,X_2是Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Gly、Ser或Thr,X_5是Ala或Glu,X_6是Gln或Tyr,X_7是Ile或Lys,X_8是Ala或Thr,X_9是Gln、Ala或Thr,X_{10}是Ser、Arg或Ala,X_{11}是Trp、Lys或Arg,X_{12}是Ala或Cys,X_{13}是Val或Arg,并且X_{14}是Leu或Ile。

[0228] 在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:68。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:69。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:70。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:71。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:72。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:73。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:74。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:98。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:99。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:100。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:101。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:102。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:103。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:104。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:105。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:106。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ

ID NO:107。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:108。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:109。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:110。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:111。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:112。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:150。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:151。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:155。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:156。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:160。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:161。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:192。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:67,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:195。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:189,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:185。在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:66,所述第二多肽包含SEQ ID NO:189,并且所述第三多肽包含SEQ ID NO:187。

[0229] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含:包含第一唾液酸酶、第一免疫球蛋白Fc结构域和第一单链可变区片段(scFv)(也应该理解所述scFv可以被免疫球蛋白抗原结合片段例如Fab片段的第一多肽链代替)的第一多肽;和包含第二唾液酸酶、第二免疫球蛋白Fc结构域和第二单链可变区片段(scFv)(也应该理解所述scFv可以被免疫球蛋白抗原结合片段例如Fab片段的第二多肽链代替)的第二多肽。这个实施方式的实例示出在图11C中。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中,所述第一scFv定义了第一抗原结合部位,并且所述第二scFv定义了第二抗原结合部位。在某些实施方式中,所述第一多肽以N-至C-端的方向包含所述第一唾液酸酶、第一免疫球蛋白Fc结构域和第一scFv。在某些实施方式中,所述第一多肽以N-至C-端的方向包含所述第一scFv、第一免疫球蛋白Fc结构域和第一唾液酸酶。在某些实施方式中,所述第二多肽以N-至C-端的方向包含所述第二唾液酸酶、第二免疫球蛋白Fc结构域和第二scFv。在某些实施方式中,所述第二多肽以N-至C-端的方向包含所述第二scFv、第二免疫球蛋白Fc结构域和第二唾液酸酶。

[0230] 在某些实施方式中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:77-83、166-178、194或197中的任一者的氨基酸序列或与SEQ ID NO:77-83、166-178、194或197中的任一者具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述第二多肽包含SEQ ID NO:77-83、166-178、194或197中的任一者的氨基酸序列或与SEQ ID

NO:77-83、166-178、194或197中的任一者具有至少85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的氨基酸序列。

[0231] 在某些实施方式中，所述第一和/或第二多肽包含氨基酸序列$X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6ESV$FQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7$X$_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_{10}$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LDGHRSMNPCPLYDX$_{13}$QTGTLFLFFIAIPX$_{14}$X$_{15}$VTEX$_{16}$QQLQTRANVTRLX$_{17}$X$_{18}$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{19}$YREWSTFAVGPGHX$_{20}$LQLHDRX$_{21}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{22}$QRPIPSAFX$_{23}$FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX$_{24}$ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX$_{25}$NX$_{26}$GLDFQX$_{27}$SQLVKKLVEPPPX$_{28}$GX$_{29}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{30}$LLYTHPTHX$_{31}$X$_{32}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{33}$LLAKGSX$_{34}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{35}$LYEANDYEEIX$_{36}$FX$_{37}$MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0232] (SEQ ID NO:85)，其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在，X_2是Ala或Lys，X_3是Asn或Leu，X_4是Pro或His，X_5是Phe、Trp、Tyr或Val，X_6是Lys或Asp，X_7是Lys、Arg或Glu，X_8是Lys、Ala、Arg或Glu，X_9是Leu或Met，X_{10}是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr，X_{11}是Gln或His，X_{12}是Arg或Lys，X_{13}是Ala、Glu或Lys，X_{14}是Gly或Asp，X_{15}是Gln或His，X_{16}是Gln、Arg或Lys，X_{17}是Ala、Cys、Ile、Ser、Val或Leu，X_{18}是Gln或Leu，X_{19}是Ala或Val，X_{20}是Cys或Gly，X_{21}是Ala或Gly，X_{22}是Arg、Ile或Lys，X_{23}是Ala、Cys、Leu或Val，X_{24}是Leu、Ala或Val，X_{25}是Thr或Ala，X_{26}是Asp或Gly，X_{27}是Glu或Lys，X_{28}是Gln、Ala、His、Phe或Pro，X_{29}是Cys或Val，X_{30}是Trp或Arg，X_{31}是Ser或Arg，X_{32}是Trp或Lys，X_{33}是Lys或Val，X_{34}是Ala、Cys、Ser或Val，X_{35}是Cys、Leu或Val，X_{36}是Val或Arg，并且X_{37}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser，并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。

[0233] 在某些实施方式中，所述第一和/或第二多肽包含氨基酸序列X_1ASLPX$_2$LQX$_3$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX$_4$THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX$_5$QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX$_6$QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_7$GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX$_8$X$_9$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{10}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_{11}$FX$_{12}$MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0234] (SEQ ID NO:84),其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Phe、Trp、Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr,X_5是Ala、Glu或Lys,X_6是Arg、Ile或Lys,X_7是Gln、Ala、His、Phe或Pro,X_8是Ser或Arg,X_9是Trp或Lys,X_{10}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{11}是Val或Arg,并且X_{12}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。在某些实施方式中,X_1是Ala、Asp、Met或不存在,X_2是Tyr或Val,X_3是Lys或Asp,X_4是Pro、Asn、Gly、Ser或Thr,X_5是Ala或Glu,X_6是Ile或Lys,X_7是Gln或Ala,X_8是Ser或Arg,X_9是Trp或Lys,X_{10}是Ala或Cys,X_{11}是Val或Arg,并且X_{12}是Leu或Ile。

[0235] 在某些实施方式中,所述第一和/或第二多肽包含氨基酸序列$X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX_7X_8DEHAELIVX_9RRGDYDAX_{10}THQVQWX_{11}AQEVVAQAX_{12}LX_{13}GHRSMNPCPLYDX_{14}QTGTLFLFFIAIPX_{15}X_{16}VTEX_{17}QQLQTRANVTRLX_{18}X_{19}VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX_{20}YREWSTFAVGPGHX_{21}LQLHDX_{22}X_{23}RSLVVPAYAYRKLHPX_{24}X_{25}X_{26}PIPSAFX_{27}FLSHDHGRTWARGHFVX_{28}QDTX_{29}ECQVAEVX_{30}TGEQRVVTLNARSX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}RX_{35}QAQSX_{36}NX_{37}GLDFQX_{38}X_{39}QX_{40}VKKLX_{41}EPPPX_{42}GX_{43}QGSVISFPSPRSGPGSPAQX_{44}LLYTHPTHX_{45}X_{46}QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX_{47}LLAKGSX_{48}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX_{49}LYEANDYEEIX_{50}FX_{51}MFTLKQAFPAEYLPQX_{52}DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:180),其中X_1是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在,X_2是Ala或Lys,X_3是Asn或Leu,X_4是Pro或His,X_5是Phe、Trp、Tyr或Val,X_6是Lys或Asp,X_7是Lys、Arg或Glu,X_8是Lys、Ala、Arg或Glu,X_9是Leu或Met,X_{10}是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr,X_{11}是Gln或His,X_{12}是Arg或Lys,X_{13}是Asp或Pro,X_{14}是Ala、Glu或Lys,X_{15}是Gly或Asp,X_{16}是Gln或His,X_{17}是Gln、Arg或Lys,X_{18}是Ala、Cys、Ile、Ser、Val或Leu,X_{19}是Gln、Leu、Glu、Phe、His、Ile、Leu或Tyr,X_{20}是Ala或Val,X_{21}是Cys或Gly,X_{22}是Arg或Pro,X_{23}是Ala或Gly,X_{24}是Arg、Ile或Lys,X_{25}是Gln或Pro,X_{26}是Arg或Pro,X_{27}是Ala、Cys、Leu或Val,X_{28}是Ala、Cys、Asn、Ser或Thr,X_{29}是Leu、Ala或Val,X_{30}是Glu或Pro,X_{31}是His或Pro,X_{32}是Leu、Asp、Asn或Tyr,X_{33}是Arg、Ala、Asp、Leu、Gln或Tyr,X_{34}是Ala、Cys、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr,X_{35}是Val、Ile或Lys,X_{36}是Thr或Ala,X_{37}是Asp或Gly,X_{38}是Glu、Lys或Pro,X_{39}是Ser或Cys,X_{40}是Leu、Asp、Phe、Gln或Thr,X_{41}是Val或Phe,X_{42}是Gln、Ala、His、Phe、Pro、Ser或Thr,X_{43}是Cys或Val,X_{44}是Trp或Arg,X_{45}是Ser、Arg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Thr、Val、Trp或Tyr,X_{46}是Trp、Lys、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Tyr,X_{47}是Lys或Val,X_{48}是Ala、Cys、Ser或Val,X_{49}是Cys、Leu或Val,X_{50}是Val或Arg,X_{51}是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser,X_{52}是GGGGS(SEQ ID NO:184)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:145)或EPKSS(SEQ ID NO:146),并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。

[0236] 在某些实施方式中,所述第一和/或第二多肽包含氨基酸序列X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQ

SGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX$_4$THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCP
LYDX$_5$QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCX$_6$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHC
LQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX$_7$QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSH
LRX$_8$RVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_9$GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX$_{10}$X$_{11}$QRADLGAYL
NPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{12}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_{13}$FX$_{14}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{15}$D
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM
TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:179)，其中X$_1$是Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Val或不存在，X$_2$是Phe、Trp、Tyr或Val，X$_3$是Lys或Asp，X$_4$是Pro、Asn、Asp、His、Glu、Gly、Ser或Thr，X$_5$是Ala、Glu或Lys，X$_6$是Gln、Leu、Glu、Phe、His、Ile、Leu或Tyr，X$_7$是Arg、Ile或Lys，X$_8$是Ala、Cys、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr，X$_9$是Gln、Ala、His、Phe、Pro、Ser或Thr，X$_{10}$是Ser、Arg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Thr、Val、Trp或Tyr，X$_{11}$是Trp、Lys、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Tyr，X$_{12}$是Ala、Cys、Ser或Val，X$_{13}$是Val或Arg，X$_{14}$是Leu、Gln、His、Ile、Lys或Ser，X$_{15}$是GGGGS(SEQ ID NO:184)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:145)或EPKSS(SEQ ID NO:146)，并且所述唾液酸酶相对于野生型人类Neu2(SEQ ID NO:1)包含至少一个突变。在某些实施方式中，X$_1$是Ala、Asp、Met或不存在，X$_2$是Tyr或Val，X$_3$是Lys或Asp，X$_4$是Pro、Asn、Gly、Ser或Thr，X$_5$是Ala或Glu，X$_6$是Gln或Tyr，X$_7$是Ile或Lys，X$_8$是Ala或Thr，X$_9$是Gln、Ala或Thr，X$_{10}$是Ser、Arg或Ala，X$_{11}$是Trp、Lys或Arg，X$_{12}$是Ala或Cys，X$_{13}$是Val或Arg，并且X$_{14}$是Leu或Ile。

[0237] 在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:77。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:78。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:79。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:80。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:81。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:82。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:83。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:166。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:167。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:168。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:169。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:170。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:171。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:172。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:173。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:174。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:175。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:176。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:177。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:178。在某些实施方式中，所述第一和第二多肽包含SEQ ID NO:194。在某些实施方式中，所述第一和第二多

肽包含SEQ ID NO:197。

[0238] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含:包含免疫球蛋白轻链的第一多肽;包含免疫球蛋白重链和单链可变片段(scFv)的第二多肽(也应该理解所述scFv可以被免疫球蛋白抗原结合片段例如Fab片段的第一多肽链代替);和包含免疫球蛋白Fc结构域和唾液酸酶的第三多肽。这个实施方式的实例示出在图11D中。所述第一和第二多肽可以被共价连接在一起,并且所述第二和第三多肽可以被共价连接在一起。所述共价键连接可以是二硫键。在某些实施方式中,所述第一多肽和第二多肽一起定义了第一抗原结合部位(即所述免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链一起定义了第一抗原结合部位)。在某些实施方式中,所述scFv定义了第二抗原结合部位。在某些实施方式中,所述第二多肽以N-至C-端的方向包含所述免疫球蛋白重链和scFv,或者以N-至C-端的方向包含所述scFv和免疫球蛋白重链。在某些实施方式中,所述第三多肽以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域,或者以N-至C-端的方向包含所述唾液酸酶和免疫球蛋白Fc结构域。

[0239] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物具有约135kDa至约165kDa例如约140kDa的分子量。在其他实施方式中,所述抗体偶联物具有约215kDa至约245kDa例如约230kDa的分子量。

[0240] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物包含各自包含免疫球蛋白Fc结构域的两个多肽,并且所述第一多肽具有“杵”突变例如T366Y或“臼”突变例如Y407T,用于与所述第二多肽异二聚化,并且所述第二多肽具有“杵”突变例如T366Y或“臼”突变例如Y407T,用于与所述第一多肽异二聚化(残基编号根据EU编号系统,Kabat,E.A.等,(1991)同上)。例如,在某些实施方式中,所述抗体包含各自包含源自于人IgG1 Fc结构域的免疫球蛋白Fc结构域的两个多肽,并且所述第一多肽包含Y407T突变(例如所述第一多肽包含SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:147),并且所述第二多肽包含T366Y突变(例如所述第二多肽包含SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:148)。

[0241] 当在本文中使用时,术语“多特异性抗体”被理解为意味着特异性结合到至少两种不同抗原的抗体,即包含至少两个抗原结合部位、结合到至少两种不同抗原的抗体。当在本文中使用时,术语“双特异性抗体”被理解为意味着特异性结合到两种不同抗原的抗体,即包含两个抗原结合部位的抗体,每个所述抗原结合部位结合到分开且不同的抗原。换句话说,第一结合位点结合第一抗原,并且第二结合位点结合第二种不同抗原。多特异性或双特异性抗体可以是例如人类或人源化抗体,和/或可以是全长抗体或抗体片段(例如$F(ab')_2$双特异性抗体)。

[0242] 本发明涵盖了包含抗体片段的抗体偶联物,所述抗体片段可以通过传统手段例如酶消化或通过重组技术产生。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等,(2003),同上。

[0243] 在某些实施方式中,所述抗体偶联物或融合蛋白可以与生物修饰剂共价或非共价结合,所述生物修饰剂可用于增强所述抗体的溶解性,提高结合特异性,降低免疫原性或毒性,或改变所述抗体的药物动力学特性。例如,所述生物修饰剂可用于提高所述抗体的分子量以增加其循环半衰期。

[0244] 设想了所述抗体偶联物或融合蛋白可以被共价键合到一个或多个(例如2、3、4、5、6、8、9、10个或更多个)生物修饰剂,所述生物修饰剂可以包含直链或支链聚合物。示例性的生物修饰剂可以包括例如各种不同的聚合物,例如在美国专利号7,842,789中所描述的。特

别有用的是聚亚烷基醚例如聚乙二醇(PEG)及其衍生物(例如烷氧基聚乙二醇,例如甲氧基聚乙二醇、乙氧基聚乙二醇等),聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的嵌段共聚物(Pluronics),聚甲基丙烯酸酯,卡波姆,以及包含糖单体例如D-甘露糖、D-和L-半乳糖、岩藻糖、果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖和D-葡糖醛酸的支链或直链多糖。

[0245] 在其他实施方式中,所述生物修饰剂可以是亲水性聚乙烯基聚合物,例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)类型的聚合物。所述生物修饰剂可以是官能化的聚乙烯吡咯烷酮,例如在所述聚合物的一个(或两个)末端上羧基或胺官能化(正如可以从PolymerSource获得的)。或者,所述生物修饰剂可以包括聚N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)或官能化的HPMA(胺、羧基等)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)或官能化的聚(N-异丙基丙烯酰胺)。或者,所述生物修饰剂可以包括聚N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)或官能化的HPMA(胺、羧基等)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)或官能化的聚(N-异丙基丙烯酰胺)。所述修饰剂在偶联之前不必须但优选是水溶性的,但所述最终偶联物应该是水溶性的。

[0246] 通常,所述生物修饰剂可以具有约2kDa至约5kDa、约2kDa至约10kDa、约2kDa至约20kDa、约2kDa至约30kDa、约2kDa至约40kDa、约2kDa至约50kDa、约2kDa至约60kDa、约2kDa至约70kDa、约2kDa至约80kDa、约2kDa至约90kDa、约2kDa至约100kDa、约2kDa至约150kDa、约5kDa至约10kDa、约5kDa至约20kDa、约5kDa至约30kDa、约5kDa至约40kDa、约5kDa至约50kDa、约5kDa至约60kDa、约5kDa至约70kDa、约5kDa至约80kDa、约5kDa至约90kDa、约5kDa至约100kDa、约5kDa至约150kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约30kDa、约10kDa至约40kDa、约10kDa至约50kDa、约10kDa至约60kDa、约10kDa至约70kDa、约10kDa至约80kDa、约10kDa至约90kDa、约10kDa至约100kDa、约10kDa至约150kDa、约20kDa至约30kDa、约20kDa至约40kDa、约20kDa至约50kDa、约20kDa至约60kDa、约20kDa至约70kDa、约20kDa至约80kDa、约20kDa至约90kDa、约20kDa至约100kDa、约20kDa至约150kDa、约30kDa至约40kDa、约30kDa至约50kDa、约30kDa至约60kDa、约30kDa至约70kDa、约30kDa至约80kDa、约30kDa至约90kDa、约30kDa至约100kDa、约30kDa至约150kDa、约40kDa至约50kDa、约40kDa至约60kDa、约40kDa至约70kDa、约40kDa至约80kDa、约40kDa至约90kDa、约40kDa至约100kDa、约40kDa至约150kDa、约50kDa至约60kDa、约50kDa至约70kDa、约50kDa至约80kDa、约50kDa至约90kDa、约50kDa至约100kDa、约50kDa至约150kDa、约60kDa至约70kDa、约60kDa至约80kDa、约60kDa至约90kDa、约60kDa至约100kDa、约60kDa至约150kDa、约70kDa至约80kDa、约70kDa至约90kDa、约70kDa至约100kDa、约70kDa至约150kDa、约80kDa至约90kDa、约80kDa至约100kDa、约80kDa至约150kDa、约90kDa至约100kDa、约90kDa至约150kDa或约100kDa至约150kDa的分子量。

[0247] 设想了将所述抗体偶联物或融合蛋白附连到约10个或更少的聚合物分子(例如9、8、7、6、5、4、3、2或1个),每个聚合物分子具有至少约20,000D或至少约30,000D或至少约40,000D的分子量。

[0248] 尽管各种不同的聚合物可用作生物修饰剂,但设想了可以将本文中描述的抗体偶联物或融合蛋白附连到聚乙二醇(PEG)聚合物。在一个实施方式中,本文中描述的抗体偶联物或融合蛋白被共价附连到至少一个真实MW为至少约20,000D的PEG。在另一个实施方式中,本文中描述的抗体偶联物或融合蛋白被共价附连到至少一个真实MW为至少约30,000D的PEG。在另一个实施方式中,本文中描述的抗体偶联物或融合蛋白被共价附连到至少一个

真实MW为至少约40,000D的PEG。在某些实施方式中,所述PEG是甲氧基PEG(5000)-琥珀酰亚胺基丙酸酯(mPEG-SPA)、甲氧基PEG(5000)-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(mPEG-SS)。这些PEG可以从Nektar Therapeutics或SunBiowest商购。

[0249] 抗体偶联物或融合蛋白上用于生物修饰剂的附连位点包括N-端氨基和赖氨酸残基上存在的ε氨基,以及其他氨基、亚氨基、羧基、巯基、羟基或其他亲水性基团。利用或不利用本领域中已知并使用的利用化学原理的多功能(通常为双功能)交联剂,可以将所述聚合物直接共价键合到所述抗体偶联物或融合蛋白。例如,巯基可以通过偶联到马来酰亚胺基取代的PEG(例如烷氧基-PEG胺加上4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺基酯或可以从Shearwater Polymers,Inc.,Huntsville,Ala.商购的PEG-马来酰亚胺)进行衍生。

[0250] III.制造重组人唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物的方法

[0251] 用于生产重组人唾液酸酶、融合蛋白例如本文中公开的融合蛋白、抗体或抗体偶联物例如本文共公开的抗体偶联物的方法,在本领域中是已知的。例如,编码轻链可变区和/或重链可变区的DNA分子可以通过化学法或通过重组DNA方法合成。例如,通过常规的杂交技术或聚合酶链反应(PCR)技术,使用适合的合成核酸引物,可以从杂交瘤克隆所述抗体的序列。得到的编码感兴趣的可变区的DNA分子可以被连接到其他适合的核苷酸序列包括例如恒定区编码序列和表达控制序列,以产生编码所需抗体的常规基因表达构建物(即表达载体)。确定基因构建物的产生在本领域的常规技术之内。

[0252] 编码所需重组人唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物的核酸可以被并入(连接)到表达载体中,所述表达载体可以通过常规转染或转化技术引入到宿主细胞中。示例性的宿主细胞是原本不产生IgG蛋白的大肠杆菌细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾293(HEK 293)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如HepG2)和骨髓瘤细胞。可以将转化的宿主细胞在允许所述宿主细胞表达编码所述免疫球蛋白轻链和/或重链可变区的基因的条件下生长。

[0253] 具体表达和纯化条件将随着使用的表达系统而变。例如,如果将要在大肠杆菌中表达基因,首先通过将所述工程化改造的基因放置在适合的细菌启动子例如Trp或Tac和原核信号序列的下游,将它克隆到表达载体中。所述表达的蛋白可能被分泌。所述表达的蛋白可能积累在折光体或包含体中,其可以在通过弗氏压碎器或超声破碎细胞后收获。然后将所述折光体溶解,并且可以通过本领域中已知的方法将所述蛋白质重新折叠和/或切断。

[0254] 如果将要在真核宿主细胞例如CHO细胞中表达所述工程化改造的基因,则首先将它插入到含有适合的真核启动子、分泌信号、poly A序列和终止密码子的表达载体中。任选地,所述载体或基因构建物可能含有增强子和内含子。在涉及包含抗体或其部分的融合蛋白的实施方式中,所述表达载体任选地含有编码全部或一部分恒定区的序列,使得能够表达整个或一部分重链或轻链。可以使用常规技术将所述基因构建物引入到真核宿主细胞中。

[0255] 所述宿主细胞表达重组人唾液酸酶或包含唾液酸酶和V_L或V_H片段、V_L-V_H异二聚体、V_H-V_L或V_L-V_H单链多肽、完整的免疫球蛋白重链或轻链或其部分(其各自可以被附连到具有另一种功能(例如细胞毒性)的组成部分)的融合蛋白和/或抗体偶联物。在涉及融合蛋白和/或抗体偶联物的某些实施方式中,将宿主细胞用表达编码唾液酸酶和整个或一部分

重链(例如重链可变区)或唾液酸酶和轻链(例如轻链可变区)的多肽或编码完整或一部分重链(例如重链可变区)或轻链(例如轻链可变区)的多肽的单一载体转染。在某些实施方式中,将宿主细胞用单一载体转染,所述载体编码(a)包含重链可变区的多肽和包含轻链可变区的多肽,或(b)完整免疫球蛋白重链和完整免疫球蛋白轻链,其中在(a)中或(b)中,所述多肽还可以包含唾液酸酶。在某些实施方式中,将宿主细胞用超过一个表达载体共转染(例如一个表达载体表达包含完整或一部分重链或重链可变区的多肽,任选地包含融合到它的唾液酸酶,并且另一个表达载体表达包含完整或一部分轻链或轻链可变区的多肽,任选地包含融合到它的唾液酸酶)。

[0256] 包含唾液酸酶或融合蛋白例如包含免疫球蛋白重链可变区或轻链可变区的融合蛋白的多肽,可以通过将用编码这种可变区的表达载体转染的宿主细胞在允许所述多肽表达的条件下生长(培养)来生产。在表达后,所述多肽可以被收获,并使用本领域中已知的技术例如亲和标签例如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或组氨酸标签来纯化或分离。

[0257] 在生产融合蛋白和/或抗体偶联物的实施方式中,融合到单克隆抗体、抗体的Fc结构域或抗原结合结构域的唾液酸酶,可以通过将宿主细胞在允许两条链表达的条件下生长(培养)来生产,所述宿主细胞用下述表达载体转染:(a)编码完整或部分免疫球蛋白重链的表达载体,和编码完整或部分免疫球蛋白轻链的分开的表达载体;或(b)编码两条链(例如完整或部分重链和轻链)的单一表达载体。所述唾液酸酶将被融合到所述链中的一者或多者。所述完整的融合蛋白和/或抗体偶联物可以被收获,并使用本领域中已知的技术例如蛋白A、蛋白G、亲和标签例如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或组氨酸标签来纯化或分离。从单一表达载体或两个分开的表达载体表达重链和轻链,在本领域的常规技术之内。

[0258] 在某些实施方式中,为了将蛋白质例如重组人唾液酸酶作为分泌蛋白表达,将所述蛋白质的本源N-端信号序列用例如MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC(SEQ ID NO:28)代替。在某些实施方式中,为了将蛋白质例如重组人唾液酸酶作为分泌蛋白表达,添加N-端信号序列例如MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC(SEQ ID NO:28)。其他示例性的N-端信号序列包括来自于白介素-2、CD-5、IgGκ轻链、胰蛋白酶原、血清白蛋白和催乳素的信号序列。在某些实施方式中,为了将蛋白质例如重组人唾液酸酶作为分泌蛋白表达,将C端溶酶体信号基序例如YGTL(SEQ ID NO:29)移除。

[0259] 用于降低或消除抗体和抗体片段的抗原性的方法在本领域中是已知的。当所述抗体将要给药到人类时,优选地将所述抗体“人源化”以降低或消除在人类中的抗原性。优选地,每个人源化抗体与它所源自的非人源化小鼠抗体对所述抗原具有相同或基本上相同的亲和性。

[0260] 在一种人源化方法中,产生了其中将小鼠免疫球蛋白恒定区用人类免疫球蛋白恒定区代替的嵌合蛋白。参见例如Morrison等,1984,PROC.NAT.ACAD.SCI.81:6851-6855;Neuberger等,1984,NATURE 312:604-608;美国专利号6,893,625(Robinson);5,500,362(Robinson);和4,816,567(Cabilly)。

[0261] 在被称为CDR嫁接的方法中,将轻链和重链可变区的CDR嫁接刀来自于另一个物种的构架中。例如,可以将鼠类CDR嫁接到人类FR中。在某些实施方式中,将抗体的轻链和重链可变区的CDR嫁接到人类FR或共有人类FR中。为了产生共有人类FR,将来自于几个人类重链或轻链氨基酸序列的FR比对以鉴定共有氨基酸序列。CDR嫁接被描述在美国专利号7,022,

500(Queen);6,982,321(Winter);6,180,370(Queen);6,054,297(Carter);5,693,762(Queen);5,859,205(Adair);5,693,761(Queen);5,565,332(Hoogenboom);5,585,089(Queen);5,530,101(Queen);Jones等,(1986)NATURE 321:522-525;Riechmann等,(1988)NATURE 332:323-327;Verhoeyen等,(1988)SCIENCE 239:1534-1536;和Winter(1998)FEBS LETT 430:92-94中。

[0262] 在被称为"超级人源化(SUPERHUMANIZATION™)"的方法中,在人类CDR与待人源化的小鼠抗体的CDR的结构相似性的基础上,从人类胚系基因选择人类CDR序列。参见例如美国专利号6,881,557(Foote);和Tan等,2002,J.IMMUNOL.169:1119-1125。

[0263] 降低免疫原性的其他方法包括"重塑"、"过度嵌合"和"镶饰/表面重修"。参见例如Vaswami等,1998,ANNALS OF ALLERGY,ASTHMA,&IMMUNOL.81:105;Roguska等,1996,PROT.ENGINEER 9:895-904;和美国专利号6,072,035(Hardman)。在镶饰/表面重修方法中,将鼠类抗体中表面可接近的氨基酸残基用在人类抗体中在相同位置处更频繁存在的氨基酸残基代替。这种类型的抗体表面重修被描述在例如美国专利号5,639,641(Pedersen)中。

[0264] 用于将小鼠抗体转变成适合于人类中的医学用途的形式的另一种方法被称为ACTIVMAB™技术(Vaccinex,Inc.,Rochester,NY),其涉及基于痘苗病毒的载体以在哺乳动物细胞中表达抗体。可以产生高水平的IgG重链和轻链的组合多样性。参见例如美国专利号6,706,477(Zauderer);6,800,442(Zauderer);和6,872,518(Zauderer)。用于将小鼠抗体转变成适合于人类使用的形式的另一种方法是一种在由KaloBios Pharmaceuticals,Inc.(Palo Alto,CA)商业实践的技术。这种技术涉及使用专有的人类"受体"文库来生产"聚焦于表位的"文库用于抗体选择。用于将小鼠抗体修改成适合于人类中的医学用途的形式的另一种方法是"人类工程"(HUMAN ENGINEERING™)技术,其由XOMA(US)LLC商业实践。参见例如国际(PCT)公布号WO 93/11794和美国专利号5,766,886(Studnicka);5,770,196(Studnicka);5,821,123(Studnicka);和5,869,619(Studnicka)。

[0265] 任何适合的方法,包括任何上述方法,可用于降低或消除抗体的人类免疫原性。

[0266] 此外,可以在小鼠中产生全人抗体。缺少任何非人类序列的全人mAb可以从人免疫球蛋白转基因小鼠,通过在例如Lonberg等,NATURE 368:856-859,1994;Fishwild等,NATURE BIOTECHNOLOGY 14:845-851,1996;和Mendez等,NATURE GENETICS 15:146-156,1997中参考的技术来制备。全人单克隆抗体也可以从噬菌体展示文库,通过在例如Knappik等,J.MOL.BIOL.296:57-86,2000;和Krebs等,J.IMMUNOL.METH.254:67-84 2001中参考的技术来制备和优化。

[0267] 本发明涵盖了包含抗体片段的融合蛋白,所述抗体片段可以通过传统手段例如酶消化或通过重组技术来产生。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等,(2003)NAT.MED.9:129-134。

[0268] 已开发了各种不同的技术用于生产抗体片段。传统上,这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化来衍生(参见例如Morimoto等,(1992)JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS 24:107-117;和Brennan等,(1985)SCIENCE 229:81)。然而,这些片段现在可以通过重组宿主细胞直接生产。Fab、Fv和ScFv抗体片段都可以在大肠杆菌中表达并从其分泌,从而允许容易地生产大量这些片段。抗体片段可以从抗体噬菌体文库分离。或者,可以将Fab'-SH片段从大肠杆菌直接回收并化学偶联,以形成$F(ab')_2$片段(Carter等,

(1992)BIO/TECHNOLOGY10:163-167)。根据另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物直接分离F(ab')$_2$片段。包含援救受体结合表位残基的具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')$_2$片段,被描述在美国专利号5,869,046中。用于生产抗体片段的其他技术对于专业技术人员来说是显而易见的。在某些实施方式中,抗体是单链Fv片段(scFv)。参见美国专利号5,571,894和5,587,458。

[0269] 用于制造双特异性抗体的方法在本领域中是已知的。参见Milstein和Cuello(1983)NATURE 305:537,国际(PCT)公布号WO93/08829,和Traunecker等,(1991)EMBO J.,10:3655。对于产生双特异性抗体的进一步细节,参见例如Suresh等,(1986)METHODS ENZYMOL.121:210。双特异性抗体包括交联的或"异体偶联的"或"异二聚体"抗体。例如,所述异二聚体中的抗体之一可以被偶联到亲和素,另一者被偶联到生物素。异二聚体抗体可以使用任何方便的交联方法来制造。适合的交联剂在本领域中是公知的,并与大量交联技术一起公开在美国专利号4,676,980中。

[0270] 异二聚体或不对称IgG样分子的实例包括但不限于使用下述技术获得会使用下述格式的分子:Triomab/Quadroma,杵臼(Knobs-into-Holes),CrossMabs,静电匹配的抗体,LUZ-Y,链交换工程化结构域体,Biclonic和DuoBody。

[0271] 使用抗体片段(例如F(ab)和F(ab')$_2$片段)的优点包括消除抗体的Fc部分与细胞(例如巨噬细胞、树突状细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和B细胞)上的Fc受体之间的非特异性结合。此外,由于它们更小的尺寸,它们可能能够更高效地穿透组织。

[0272] 异二聚体抗体或不对称抗体允许更大的灵活性和新的格式,用于将各种不同药物附连到抗体臂。用于产生异二聚体抗体的通用格式之一是"杵臼"(knobs-into-holes)格式。这种格式特异性针对抗体中恒定区的重链部分。所述"杵"部分通过将小的氨基酸用更大的氨基酸代替来构造,其适合被纳入"臼"中,所述臼通过将大的氨基酸用更小的氨基酸代替来构造。将所述"杵"连接到"臼"的是每条链之间的二硫键。所述"杵臼"形状促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。将单链可变区片段(scFv)通过短的连接物肽连接到所述重链和轻链的可变结构域。所述连接物富含提供更大柔性的甘氨酸和提供特异性的丝氨酸/苏氨酸。两个不同的scFv片段可以通过铰链区一起连接到重链的恒定结构域或轻链的恒定结构域。这为所述抗体提供了双特异性,允许两种不同抗原的结合特异性。所述"杵臼"格式加强异二聚体形成但不抑制同二聚体形成。

[0273] 几种支持异二聚化的方法已被描述在例如国际(PCT)公布号WO96/27011、WO98/050431、WO2007/110205、WO2007/147901、WO2009/089004、WO2010/129304、WO2011/90754、WO2011/143545、WO2012/058768、WO2013/157954和WO2013/096291以及欧洲专利公布号EP1870459中。通常,在本领域中已知的方法中,将第一重链的CH_3结构域和第二重链的CH_3结构域两者以互补的方式工程化,使得包含一个工程化的CH_3结构域的重链不再能够与另一个具有相同结构的重链同二聚化(例如CH_3工程化的第一重链不再能够与另一个CH_3工程化的第一重链同二聚化;并且CH_3工程化的第二重链不再能够与另一个CH_3工程化的第二重链同二聚化)。由此迫使包含一个工程化的CH_3结构域的重链与包含以互补方式工程化的CH_3结构域的另一个重链异二聚化。作为结果,所述第一重链的CH_3结构域和第二重链的CH_3结构域通过氨基酸替换以互补的方式工程化,使得所述第一重链和第二重链被迫异二聚化,而所述第一重链和第二重链不再能够同二聚化(例如由于空间位阻的原因)。

[0274] IV.药物组合物

[0275] 对于治疗使用来说，优选地将重组人唾液酸酶或其融合蛋白和/或抗体偶联物与可药用载体组合。当在本文中使用时，术语“可药用”是指那些在合理的医学判断范围内，适合与人类和动物的组织相接触使用而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的利益/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0276] 当在本文中使用时，术语“可药用载体”是指适合与人类和动物的组织相接触使用而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的利益/风险比相称的缓冲剂、载体和赋形剂。可药用载体包括任何标准的制药载体例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如油/水或水/油乳液)和各种不同类型的润湿剂。所述组合物也可以包含稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例，参见例如Martin，《Remington制药学》(Remington’s Pharmaceutical Sciences)，第15版，Mack Publ.Co.,Easton,PA[1975]。可药用载体包括与药物给药相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、包衣、等渗和吸收延迟剂等。这些介质和试剂对药物活性物质的用途在本领域中是已知的。

[0277] 在某些实施方式中，药物组合物可以含有用于修改、维持或保持例如所述组合物的pH、渗透压、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的制剂材料。在这些实施方式中，适合的制剂材料包括但不限于氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸)，抗微生物剂，抗氧化剂(例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠)，缓冲剂(例如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸)，增量剂(例如甘露糖醇或甘氨酸)，螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA))，络合剂(例如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β-环糊精)，填充剂，单糖、二糖和其他糖类(例如葡萄糖、甘露糖或糊精)，蛋白质(例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白)，着色、调味和稀释剂，乳化剂，亲水性聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮)，低分子量多肽，成盐平衡离子(例如钠)，防腐剂(例如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢)，溶剂(例如甘油、丙二醇或聚乙二醇)，糖醇(例如甘露糖醇或山梨糖醇)，悬浮剂，表面活性剂或润湿剂(例如普朗尼克、PEG、失水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯、曲拉通、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、四丁酚醇)，稳定性增强剂(例如蔗糖或山梨糖醇)，渗涨度增强剂(例如碱金属卤化物优选为氯化钠或氯化钾、甘露糖醇、山梨糖醇)，递送介质，稀释剂，赋形剂和/或药物佐剂(参见《Remington制药学》(Remington’s Pharmaceutical Sciences)，第18版，Mack Publishing Company，1990)。

[0278] 在某些实施方式中，药物组合物可以含有纳米粒子例如聚合物纳米粒子、脂质体或胶束(参见Anselmo等，(2016)BIOENG.TRANSL.MED.1:10-29)。

[0279] 在某些实施方式中，药物组合物可以含有持续或受控递送配方。用于配制持续或受控递送手段例如脂质体载体、可生物侵蚀的微粒或多孔珠和储库注射剂的技术，对于本领域技术人员来说也是已知的。持续释放制剂可以包括例如多孔聚合物微粒或采取塑形制品例如薄膜或微胶囊形式的半透性聚合物基质。持续释放基质可以包括聚酯、水凝胶、聚丙交酯、L-谷氨酸与γ-乙基-L-谷氨酸的共聚物、聚(甲基丙烯酸2-羟乙基酯)、乙烯-乙酸乙烯酯或聚D(-)-3-羟基丁酸。持续释放组合物也可以包括脂质体，其可以通过本领域中已知的几种方法中的任一种来制备。

[0280] 含有本文中公开的重组人唾液酸酶、重组人唾液酸酶融合蛋白或抗体偶联物的药物组合物可以以剂量单位形式存在，并且可以通过任何适合的方法制备。药物组合物应该被配制成与其打算的给药途径相容。给药途径的实例是静脉内(IV)、真皮内、吸入、透皮、局部、透粘膜、鞘内和直肠给药。在某些实施方式中，本文中公开的重组人唾液酸酶、重组人唾液酸酶融合蛋白或抗体偶联物通过IV输注给药。在某些实施方式中，本文中公开的重组人唾液酸酶、重组人唾液酸酶融合蛋白或抗体偶联物通过肿瘤内注射给药。有用的剂型可以通过制药领域中已知的方法来制备。例如参见《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第18版，(Mack Publishing Company,1990)。适合于肠胃外给药的剂型组分包括无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂，抗细菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯，抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠，螯合剂例如EDTA，缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及用于调节渗涨度的试剂例如氯化钠或右旋糖。

[0281] 对于静脉内给药来说，适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。所述载体在制造和储存的条件下应该稳定，并且应该针对微生物进行防腐。所述载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其适合的混合物的溶剂或分散介质。

[0282] 在某些实施方式中，药物组合物可以含有稳定剂。在某些实施方式中，所述稳定剂是阳离子，例如二价阳离子。在某些实施方式中，所述阳离子是钙或镁。所述阳离子可以采取盐的形式，例如氯化钙($CaCl_2$)或氯化镁($MgCl_2$)。

[0283] 在某些实施方式中，所述稳定剂以约0.05mM至约5mM的量存在。例如，所述稳定剂可以以约0.05mM至约4mM、约0.05mM至约3mM、约0.05mM至约2mM、约0.05mM至约1mM、约0.05mM至约0.5mM、约0.5mM至约4mM、约0.5mM至约3mM、约0.5mM至约2mM、约0.5mM至约1mM、约1mM至约4mM、约1mM至约3mM或约1mM至约2mM的量存在。

[0284] 药物制剂优选为无菌的。除菌可以通过任何适合的方法来实现，例如通过无菌滤膜过滤。在所述组合物被冷冻干燥的情况下，可以在冷冻干燥和重构之前或之后进行过滤除菌。

[0285] 本文描述的组合物可以局部或系统性给药。给药通常是肠胃外给药。在优选实施方式中，所述药物组合物被皮下给药，并且在甚至更优选实施方式中被静脉内给药。用于肠胃外给药的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬液和乳液。

[0286] 通常，活性组分例如重组人唾液酸酶或其融合蛋白和/或抗体偶联物的治疗有效量在0.1mg/kg至100mg/kg例如1mg/kg至100mg/kg、1mg/kg至10mg/kg的范围内。所述给药的量将取决于变量例如待治疗的疾病或指征的类型和程度、患者的总体健康、所述抗体的体内效能、药物配方和给药途径。可以将初始剂量提高到超过上限水平，以便快速达到所需的血液水平或组织水平。或者，初始剂量可以低于最佳剂量，并且可以在治疗过程中逐渐提高每日剂量。人类剂量可以例如在被设计在0.5mg/kg至20mg/kg运行的常规I期剂量递增研究中优化。给药频率可以随着多种因素而变，例如给药途径、剂量、所述重组人唾液酸酶或其融合蛋白和/或抗体偶联物的血清半衰期和待治疗的疾病。示例性的给药频率是每日一次、每周一次和每两周一次。优选的给药途径是肠胃外，例如静脉内输注。在某些实施方式中，将重组人唾液酸酶或其融合蛋白和/或抗体偶联物冷冻干燥，然后在给药时在缓冲盐水中

重构。

[0287] V.治疗用途

[0288] 本文中公开的组合物和方法可用于在受试者中治疗各种不同形式的癌症或在受试者中抑制癌生长。本发明提供了一种在受试者中治疗癌症的方法。所述方法包括单独地或与另一种治疗剂相组合向所述受试者给药有效量的重组人唾液酸酶或其融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文中公开的重组人唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物，以在所述受试者中治疗所述癌症。当在本文中使用时，术语“有效量”是指足以实现有益或所需结果的活性药剂(例如根据本发明的重组人唾液酸酶或其融合蛋白)的量。有效量可以在一次或多次给药、施用或剂量中给药，并且不打算限于特定制剂或给药途径。

[0289] 当在本文中使用时，“治疗”意味着在受试者例如人类中治疗疾病。这包括：(a)抑制所述疾病，即停止其发展；和(b)缓解所述疾病，即引起疾病状态的减退。当在本文中使用时，术语“受试者”和“患者”是指将要通过本文中描述的方法和组合物治疗的生物体。这些生物体优选地包括但不限于哺乳动物(例如鼠类、猿类、马科、牛科、猪科、犬科、猫科动物等)，并且更优选地包括人类。

[0290] 癌症的实例包括实体肿瘤、软组织肿瘤、血液肿瘤和转移性病变。血液肿瘤的实例包括白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、B-细胞、T-细胞或FAB ALL、急性髓系白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)例如转化的CLL、弥散性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓增生异常综合症(MDS)、淋巴瘤、霍奇金病、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤或Richter’s综合征(Richter’s转化)。实体肿瘤的例子包括各种不同器官系统的恶性肿瘤，例如肉瘤、腺癌和恶性上皮肿瘤，例如那些影响头颈部(包括咽)、甲状腺、肺(小细胞或非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺、淋巴系、胃肠道(例如口腔、食道、胃、肝、胰腺、小肠、结肠和直肠、肛管)、生殖器和泌尿生殖道(例如肾、泌尿上皮、膀胱、卵巢、子宫、宫颈、子宫内膜、前列腺、睾丸)、CNS(例如神经或神经胶质细胞，例如成神经细胞瘤或神经胶质瘤)或皮肤(例如黑素瘤)的恶性肿瘤。

[0291] 在某些实施方式中，所述癌症是上皮癌，例如上调唾液酸化聚糖的表达的上皮癌。上皮癌的实例包括但不限于子宫内膜癌、结肠癌、卵巢癌、宫颈癌、外阴癌、子宫癌或输卵管癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、泌尿系统癌症、膀胱癌、头颈癌、口腔癌和肝癌。上皮癌还包括恶性上皮肿瘤，例如腺泡癌、腺癌、腺囊性癌、腺样囊性癌、腺瘤癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌、基底细胞癌、基底类癌、基底、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、支气管癌、支气管癌、脑样癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶样癌、粉刺状癌、子宫体癌、筛状癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、导管癌、硬癌、胚胎癌、脑样癌、表皮样癌、癌样上皮癌、外植癌、溃疡性癌、纤维状癌，胶样癌、胶状癌、巨细胞癌、巨细胞癌、腺癌、粒层细胞癌、毛发基质癌、多血癌、、肝细胞癌、嗜酸细胞癌、玻璃样癌、肾上腺样癌、婴儿期胚胎癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、Krompecher癌、Kulchitzky细胞癌、大细胞癌、豆状癌、豆状癌、脂肪瘤癌、淋巴上皮癌、髓样癌、髓样癌、黑色素癌、软癌、粘液癌、粘液癌、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌、粘液癌、粘液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化癌、类骨癌、乳头状癌、门周癌、浸润前癌、棘细胞癌、脑样癌、肾脏肾细胞癌、储备细胞癌、肉瘤样癌、施奈德癌、硬癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯性癌、小细胞癌、马铃薯状癌、球状细胞癌、纺锤细胞癌、海绵状癌、鳞状癌、鳞

状细胞癌、串状癌、血管扩张性癌、血管扩张性癌、移行细胞癌、结节性癌、结节性癌、疣状癌和绒毛状癌。

[0292] 在某些实施方式中，所述癌症是乳腺癌。在某些实施方式中，所述癌症是腺癌。在某些实施方式中，所述癌症是转移性癌症。在某些实施方式中，所述癌症是难治性癌症。

[0293] 在某些实施方式中，所述癌症对使用抗体例如具有ADCC活性的抗体例如曲妥珠单抗的治疗具有抗性或无反应。

[0294] 本文描述的方法和组合物可以单独地或与其他治疗剂和/或方式相组合使用。当在本文中使用时，术语“相组合”给药被理解为意味着在所述受试者患有障碍的过程中向所述受试者递送两种(或更多种)不同治疗，使得对所述患者的治疗效果在时间点上交叠。在某些实施方式中，在一种治疗的递送仍在进行时开始第二种治疗的递送，使得在给药方面存在交叠。这在本文中有时被称为“同时”或“并行递送”。在其他实施方式中，一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的某些实施方式中，由于组合给药，所述治疗更加有效。例如，所述第二种治疗更加有效，例如使用更少的第二种治疗看到等同的效果，或者所述第二种治疗以比在不存在第一种治疗的情况下给药所述第二种治疗时观察到的更大的程度减轻症状，或者在使用第一种治疗时观察到类似的情况。在某些实施方式中，递送使得症状或与所述障碍相关的其他参数的降低大于在不存在一种治疗的情况下递送另一种治疗时观察到的降低。所述两种治疗的效果可以部分累加、完全累加或大于累加。所述递送可以使得在递送第二种治疗时递送的第一种治疗的效果仍然可检测。

[0295] 在某些实施方式中，本文中描述的方法或组合物与一种或多种另外的疗法例如手术、放疗或另一种化学制剂的给药相组合给药。在某些实施方式中，所述另外的疗法可以包括化疗例如细胞毒性药剂。在某些实施方式中，所述另外的疗法可以包括靶向疗法，例如酪氨酸激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂或蛋白酶抑制剂。在某些实施方式中，所述另外的疗法可以包括抗炎、抗血管生成、抗纤维化或抗增殖化合物，例如甾类、生物免疫调节剂、单克隆抗体、抗体片段、适体、siRNA、反义分子、融合蛋白、细胞因子、细胞因子受体、支气管扩张剂、他汀类、抗炎剂(例如甲氨蝶呤)或NSAID。在某些实施方式中，所述另外的疗法可以包括不同类别治疗剂的组合。

[0296] 在某些实施方式中，本文中描述的方法或组合物与检查点抑制剂相组合给药。所述检查点抑制剂可以例如选自PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA-4拮抗剂、腺苷A2A受体拮抗剂、B7-H3拮抗剂、B7-H4拮抗剂、BTLA拮抗剂、KIR拮抗剂、LAG3拮抗剂、TIM-3拮抗剂、VISTA拮抗剂或TIGIT拮抗剂。

[0297] 在某些实施方式中，所述检查点抑制剂是PD-1或PD-L1抑制剂。PD-1是存在于T-细胞表面上的一种充当免疫系统检查点的受体，其在适合的时间抑制或以其他方式调节T-细胞活性以防止免疫系统过度活化。然而，癌细胞可以通过表达配体例如与T-细胞表面上的PD-1相互作用的PD-L1来利用这个检查点，以关闭或调节T-细胞活性。示例性的基于PD-1/PD-L1的免疫检查点抑制剂包括基于抗体的治疗剂。利用基于PD-1/PD-L1的免疫检查点抑制的示例性的治疗方法被描述在美国专利号8,728,474和9,073,994以及欧洲专利号1537878B1中，并且包括例如使用抗PD-1抗体。示例性的抗PD-1抗体被描述在例如美国专利号8,952,136、8,779,105、8,008,449、8,741,295、9,205,148、9,181,342、9,102,728、9,102,727、8,952,136、8,927,697、8,900,587、8,735,553和7,488,802中。示例性的抗PD-1抗

体包括例如纳武单抗(Opdivo®,Bristol-Myers Squibb Co.)、派姆单抗(Keytruda®,Merck Sharp&Dohme Corp.)、PDR001(Novartis Pharmaceuticals)和pidilizumab(CT-011,Cure Tech)。示例性的抗PD-L1抗体被描述在例如美国专利号9,273,135、7,943,743、9,175,082、8,741,295、8,552,154和8,217,149中。示例性的抗PD-L1抗体包括例如阿特珠单抗(Tecentriq®,Genentech)、德瓦鲁单抗(AstraZeneca)、MEDI4736、阿维单抗和BMS 936559(Bristol Myers Squibb Co.)。

[0298] 在某些实施方式中,本文中描述的方法或组合物与CTLA-4抑制剂相组合给药。在CTLA-4途径中,T-细胞上的CTLA-4与其在抗原呈递细胞(而不是癌细胞)表面上的配体(例如也被称为B7-1的CD80和CD86)的相互作用导致T-细胞抑制。示例性的基于CTLA-4的免疫检查点抑制方法被描述在美国专利号5,811,097、5,855,887、6,051,227中。示例性的抗CTLA-4抗体被描述在美国专利号6,984,720、6,682,736、7,311,910、7,307,064、7,109,003、7,132,281、6,207,156、7,807,797、7,824,679、8,143,379、8,263,073、8,318,916、8,017,114、8,784,815和8,883,984、国际(PCT)公开号WO98/42752、WO00/37504和WO01/14424以及欧洲专利号EP 1212422 B1中。示例性的CTLA-4抗体包括伊匹单抗或曲美单抗。

[0299] 在某些实施方式中,本文中描述的方法或组合物与(i)PD-1或PD-L1抑制剂例如本文中公开的PD-1或PD-L1抑制剂和(ii)CTLA-4抑制剂例如本文中公开的CTLA-4抑制剂相组合给药。

[0300] 在某些实施方式中,本文中描述的方法或组合物与IDO抑制剂相组合给药。示例性的IDO抑制剂包括1-甲基-D-色氨酸(被称为indoximod)、epacadostat(INCB24360)、navoximod(GDC-0919)和BMS-986205。

[0301] 可以与本文中描述的方法或组合物相组合给药的示例性细胞毒性药剂包括例如抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢物、蛋白质合成和降解抑制剂、有丝分裂抑制剂、烷基化剂、含铂药剂、核酸合成抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDAC抑制剂例如伏立诺他(SAHA、MK0683)、恩替诺特(MS-275)、帕比司他(LBH589)、曲古柳菌素A(TSA)、mocetinostat(MGCD0103)、贝利司他(PXD101)、罗米地辛(FK228、缩酚酸肽))、DNA甲基转移酶抑制剂、氮芥、亚硝基脲、亚乙基亚胺、烷基磺酸盐、三氮烯、叶酸类似物、核苷类似物、核糖核苷酸还原酶抑制剂、长春花生物碱、紫杉烷类、埃博霉素、插层剂、能够干扰信号转导途径的药剂、促进凋亡的药剂和辐射或结合表面蛋白以递送有毒药剂的抗体分子偶联物。在一个实施方式中,可以与本文中描述的方法或组合物一起给药的细胞毒性药剂是基于铂的药剂(例如顺铂)、环磷酰胺、达卡巴嗪、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、羟基脲、拓扑替康、伊立替康、氮杂胞苷、伏立诺他、伊沙匹隆、硼替佐米、紫杉烷(例如紫杉醇或多西他赛)、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、秋水仙素、蒽环类抗生素(例如多柔比星或表柔比星)、柔红霉素、二羟基蒽醌二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、阿霉素、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、蓖麻毒素或美登素类化合物。

[0302] 本发明还提供了一种在细胞、组织或受试者中提高HLA-DR、CD86、CD83、IFNγ、IL-1b、IL-6、TNFα、IL-17A、IL-2或IL-6的表达的方法。所述方法包括将所述细胞、组织或受试者与有效量的唾液酸酶或融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文中公开的唾液酸酶、融合蛋

白或抗体偶联物相接触。在某些实施方式中，所述细胞选自树突状细胞和外周血单核细胞(PBMC)。

[0303] 在某些实施方式中，相对于尚未与所述唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物相接触的相似或在其他方面相同的细胞或组织，所述细胞、组织或受试者中HLA-DR、CD86、CD83、IFNγ、IL-1b、IL-6、TNFα、IL-17A、IL-2或IL-6的表达提高至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少约800％、至少约900％或至少约1,000％。基因表达可以通过本领域中已知的任何适合的方法来测量，例如通过ELISA或通过Luminex多重测定法。

[0304] 本发明还提供了一种在需要的受试者中促进免疫细胞在肿瘤中的浸润的方法。所述方法包括向所述受试者给药有效量的唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物，例如本文中公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物。在某些实施方式中，所述免疫细胞是T-细胞例如CD4+和/或CD8+T-细胞，例如$CD69^{+}CD8^{+}$和/或$GzmB^{+}CD8^{+}$T-细胞。在某些实施方式中，所述免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0305] 在某些实施方式中，相对于尚未给药所述唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物的相似或在其他方面相同的肿瘤和/或受试者，在所述受试者中免疫细胞在所述肿瘤中的浸润被提高至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少约800％、至少约900％或至少约1,000％。免疫细胞在肿瘤中的浸润可以通过本领域中已知的任何适合的方法例如抗体染色来测量。

[0306] 本发明还提供了一种在需要的受试者中增加循环自然杀伤(NK)细胞的数目的方法。所述方法包括向所述受试者给药有效量的唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物，例如本文中公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物，以便相对于给药所述唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物之前增加循环NK细胞的数目。

[0307] 在某些实施方式中，相对于尚未给药所述唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物的相似或在其他方面相同的受试者，在所述受试者中循环NK细胞的数目增加至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少约800％、至少约900％或至少约1,000％。受试者中的循环NK细胞可以通过本领域中已知的任何适合的方法例如抗体染色来测量。

[0308] 本发明还提供了一种在需要的受试者中提高引流淋巴结中T-细胞的数目的方法。所述方法包括向所述受试者给药有效量的唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物，例如本文中公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物，以便相对于给药所述融合蛋白、抗体偶联物或药物组合物之前增加引流淋巴结中T-细胞的数目。在某些实施方式中，所述免疫细胞是T-细胞，例如CD4+和/或CD8+T-细胞。

[0309] 在某些实施方式中，相对于尚未给药所述唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物的相似或在其他方面相同的受试者，在所述受试者中所述引流淋巴结中T-细胞的数目增加至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少

约800％、至少约900％或至少约1,000％。受试者中引流淋巴结中的T-细胞可以通过本领域中已知的任何适合的方法例如抗体来测量。

[0310] 本发明还提供了一种在细胞、组织或受试者中提高Cd3、Cd4、Cd8、Cd274、Ctla4、Icos、Pdcd1、Lag3、Il6、Il1b、Il2、Ifng、Ifna1、Mx1、Gzmb、Cxcl9、Cxcl12和/或Ccl5的表达的方法。所述方法包括将所述细胞、组织或受试者与有效量的唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物相接触，以便相对于与所述唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物接触之前的细胞、组织或受试者提高所述Cd3、Cd4、Cd8、Cd274、Ctla4、Icos、Pdcd1、Lag3、Il6、Il1b、Il2、Ifng、Ifna1、Mx1、Gzmb、Cxcl9、Cxcl12和/或Ccl5的表达。

[0311] 在某些实施方式中，相对于尚未与所述唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物接触的相似或在其他方面相同的细胞、组织或受试者，在所述细胞、组织或受试者中Cd3、Cd4、Cd8、Cd274、Ctla4、Icos、Pdcd1、Lag3、Il6、Il1b、Il2、Ifng、Ifna1、Mx1、Gzmb、Cxcl9、Cxcl12和/或Ccl5的表达提高至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少约800％、至少约900％或至少约1,000％。基因表达可以通过本领域中已知的任何适合的方法来测量，例如通过ELISA、Luminex多重测定法或Nanostring技术。

[0312] 本发明还提供了一种从细胞或组织除去唾液酸的方法。所述方法包括将所述细胞或组织与有效量的唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物相接触。本发明还提供了一种从受试者中的细胞除去唾液酸的方法，所述方法包括向所述受试者给药有效量的包含唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物的药物组合物，从而从所述细胞除去唾液酸。

[0313] 在某些实施方式中，所述细胞是肿瘤细胞、树突状细胞(DC)或单核细胞。在某些实施方式中，所述细胞是单核细胞，并且所述方法导致所述单核细胞上MHC-II分子(例如HLA-DR)的表达提高。在某些实施方式中，相对于尚未与所述唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物接触的相似或在其他方面相同的细胞或组织，所述细胞或组织中MHC-II分子的表达提高至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少约800％、至少约900％或至少约1,000％。基因表达可以通过本领域中已知的任何适合的方法来测量，例如通过ELISA、Luminex多重测定法或流式细胞术。

[0314] 本发明还提供了一种增强肿瘤细胞的吞噬作用的方法。所述方法包括将所述肿瘤细胞与有效地从所述肿瘤细胞除去唾液酸的量的唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物相接触，从而增强所述肿瘤细胞的吞噬作用。在某些实施方式中，本公开涉及一种在受试者中提高肿瘤细胞的吞噬作用的方法，所述方法包括向所述受试者给药有效量的药物组合物，所述药物组合物以有效地从所述肿瘤细胞除去唾液酸的量包含唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物，从而提高所述肿瘤细胞的吞噬作用。

[0315] 在某些实施方式中，相对于尚未与所述唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物接触的相似或在其他方面相同的肿瘤细胞或肿瘤细胞群体，吞噬作用提高至少约10％、至少约

20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少约800％、至少约900％或至少约1,000％。吞噬作用可以通过本领域中已知的任何适合的方法来测量。

[0316] 本发明还提供了一种活化树突状细胞(DC)的方法。所述方法包括将所述DC与已用唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物处理的肿瘤细胞相接触。在某些实施方式中，本公开涉及一种在受试者中活化树突状细胞(DC)或DC群体的方法，所述方法包括以有效地从所述受试者中的肿瘤细胞除去唾液酸的量向所述受试者给药包含唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物的药物组合物，由此在所述受试者中活化所述DC或DC群体。

[0317] 在某些实施方式中，相对于尚未与已用所述唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物处理的肿瘤细胞接触的相似或在其他方面相同的DC或DC群体，所述DC或DC群体的活化提高至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约400％、至少约500％、至少约600％、至少约700％、至少约800％、至少约900％或至少约1,000％。活化可以通过本领域中已知的任何适合的方法来测量。

[0318] 本发明还提供了一种降低Siglec-15结合活性，从而提高肿瘤微环境中的抗肿瘤活性的方法，所述方法包括将T细胞与唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物相接触。在某些实施方式中，本公开涉及一种降低患者的Siglec-15结合活性，从而提高肿瘤微环境中的抗肿瘤活性的方法，所述方法包括向所述受试者给药有效量的包含唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物例如本文公开的唾液酸酶、融合蛋白或抗体偶联物的药物组合物，从而在所述受试者中提高抗肿瘤活性(例如T细胞活性)。

[0319] 在某些实施方式中，相对于尚未与所述唾液酸酶、融合蛋白和/或抗体偶联物接触的Siglec-15，Siglec-15结合活性降低至少约10％、至少约20％、至少约50％、至少约75％或约100％。结合可以通过本领域中已知的任何适合的方法来测量。

[0320] 在整个本说明书中，在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下，或者在过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤的情况下，设想了另外存在基本上由所叙述的组分构成或由所叙述的组分构成的本发明的组合物，并且存在基本上由所叙述的过程步骤构成或由所叙述的过程步骤构成的符合本发明的过程和方法。

[0321] 在本申请中，在要素或组分被称为是包括在所叙述的要素或组分的名单中和/或选自所述名单时，应该理解所述要素或组分可以是所述叙述的要素或组分中的任一者，或者所述要素或组分可以选自所述叙述的要素或组分中的两者或更多者。

[0322] 此外应该理解，本文中描述的组合物或方法的要素和/或特点可以在不背离本发明的精神和范围的情况下以各种不同方式组合，不论在本文中是明示还是暗示。例如，在提及特定化合物的情况下，该化合物可用于本发明的组合物的各种不同实施方式中和/或本发明的方法中，除非从上下文另有理解。换句话说，在本申请中，实施方式以能够书写和绘制清楚简明的申请的方式进行描述和描绘，但打算并且应该认识到实施方式可以进行各种不同的组合或分离，而不背离本文的教授和发明。例如应该认识到，本文中描述和描绘的所有特点均可适用于本文中描述和描绘的本发明的所有方面。

[0323] 应该理解,表述“……中的至少一者”包括在所述表述后的单独的每个叙述的受试者以及所述叙述的受试者中的两者或更多者的各种不同组合,除非从上下文和使用中另有理解。与三个或更多个叙述的受试者相关联的表述“和/或”应该被理解为具有相同的含义,除非从上下文另有理解。

[0324] 术语“包括”、“具有”、“含义”、包括其语法等同语的使用,通常应该被理解为开放性和非限制性的,例如不排除另外的未叙述的要素或步骤,除非从上下文另有具体陈述或理解。

[0325] 在将术语“约”用于定量值之前的情况下,本发明还包括所述特定定量值本身,除非另有具体陈述。当在本文中使用时,术语“约”是指从标称值偏差±10%,除非另有指示或推测。

[0326] 应该理解,步骤的顺序或用于执行某些行动的顺序并不重要,只要本发明仍然可操作即可。此外,两个或更多个步骤或行动可以同时进行。

[0327] 本文中任何和所有实例或示例性语言例如“例如”或“包括”的使用,仅打算更好地说明本发明,并且不对本发明的范围构成限制,除非另外提出权利要求。本说明书中的任何语言均不应被解释为表明任何未提出权利要求的要素对于本发明的实践来说是必不可少的。

实施例

[0328] 下面的实施例仅仅是说明性的,并且不打算以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0329] 实施例1

[0330] 本实施例描述了重组人唾液酸酶(Neu1、Neu2和Neu3)的构建。

[0331] 将人唾液酸酶Neu1、Neu2、Neu3(同工型1)和Neu4(同工型1)表达成带有10×His标签的分泌蛋白。为了将Neu1表达为分泌蛋白,将本源N端信号肽(MTGERPSTALPDRRWGPRILGFWGGCRVWVFAAIFLLLSLAASWSKA;SEQ ID NO:27)用MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC(SEQ ID NO:28)代替,并移除C端溶酶体信号基序(YGTL;SEQ ID NO:29)。为了将Neu2、Neu3和Neu4表达为分泌蛋白,向每一者添加N端信号肽MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC(SEQ ID NO:28)。

[0332] 唾液酸酶在24孔板中,在200mL使用带有N-端6xHis标签的pCEP4哺乳动物表达载体转染的HEK293F人类细胞中表达。唾液酸酶使用Ni-NTA柱纯化,用UV-Vis分光光度计(NanoDrop)定量,并如图1中所示通过SDS-PAGE检查。Neu1表达良好,具有～3μg/ml的产量,并且主要以单体形式存在。Neu2和Neu3表达各自给出～0.15μg/mL的产量,并且各自主要以二聚体形式存在。当通过NanoDrop测量时,Neu4没有可检测的表达量。用作表达的阳性对照的来自于鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)的细菌唾液酸酶(St-唾液酸酶;SEQ ID NO:30)给出与Neu1可比的产量,并主要以单体形式存在。

[0333] 通过测量唾液酸从产荧光底物4-甲基伞形酮基-N-乙酰神经氨酸(4MU-NeuAc)的释放来测定所述重组表达的唾液酸酶的活性。如图2中所示,Neu1不具有高于无酶对照的可检测的活性,这与以前的报道相一致,所述报道表明除非与β-半乳糖苷酶和保护性蛋白质/组织蛋白酶A(PPCA)复合,否则Neu1是无活性的。Neu2和Neu3有活性。使用Neu2和Neu3进行了酶动力学测定。将1nM的固定浓度的酶与浓度在4000μM至7.8μM范围内的产荧光底物4MU-

NeuAc温育。测定在酸性(pH 5.6)和中性(pH 7)两种条件下进行。如图3中所示,Neu2和Neu3两者在酸性和中性条件下均有活性,并显示出与以前报道的可比的酶动力学。

[0334] 大多数重组表达的唾液酸酶在非还原SDS-PAGE凝胶上作为聚集体或二聚体迁移。随后使用还原剂二硫苏糖醇(DTT)的处理产生所述酶的单体形式,其在还原SDS-PAGE凝胶上迁移到42kDa处(图1)。

[0335] 实施例2

[0336] 本实施例描述了带有提高唾液酸酶的表达和/或活性的突变的重组人唾液酸酶的构建。

[0337] A.合理设计

[0338] 结构和序列分析将Neu2的残基A93和P62鉴定为用于替换以提高溶解性和/或表达的候选物。具体来说,同源唾液酸酶序列的比较显示出在对应于Neu2的第93位的位置处偏好D或E氨基酸残基,并且在对应于Neu2的第62位的位置处偏好G氨基酸残基。

[0339] β-螺旋桨家族的蛋白质通常通过所述蛋白质的N-和C-端处的广泛氢键相互作用来稳定。结构分析显示,作为β-螺旋桨家族成员的Neu2似乎缺乏这些稳定化相互作用。相比之下,来自于鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)和绿色小单孢菌的唾液酸酶(Micromonospora viridifaciens)(与人类Neu2最同源的细菌唾液酸酶)在其N-和C-端处具有广泛的氢键相互作用。因此,将Neu2的残基K9、V363和L365突变以促进Neu2的N-端与C-端之间的氢键形成。

[0340] B.噬菌体展示

[0341] 将Neu2在噬菌体展示系统中表达,允许筛选Neu2变体的表达水平和对热变性的抗性两者。使用具有V6Y和I187K替换的Neu2作为用于文库制备的模板。设计的噬菌体展示文库1、2和3分别描绘在表11-13中。每个文库包括所描绘的突变的所有可能的组合。第四个文库包括通过易错PCR产生的随机突变。

[0342] 表11-噬菌体文库1

[0343]

野生型 Neu2 氨基酸	设计	替换氨基酸	密码子使用
184-188 LHPIQ	将野生型的5个残基的长度调整到2至5，并将每个残基用9个极性氨基酸之一替换	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RVM
P190, I191	用5个非极性氨基酸之一替换	F、I、L、M、V	NTK
C219	用 12 个极性或非极性氨基酸之一替换	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
L217	用 12 个极性或非极性氨基酸之一替换	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
T216 和 L217	在野生型氨基酸之间插入 12 个极性或非极性氨基酸之一	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
G271	用9个极性氨基酸之一替换	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RVM
C272	用9个极性氨基酸之一替换	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RVM

[0344] 表12-噬菌体文库2

[0345]

野生型 Neu2 氨基酸	设计	替换氨基酸	密码子使用
156-165 TFAVGPGH CL	用 12 个疏水或极性氨基酸之一替换	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
V176	用 12 个疏水或极性氨基酸之一替换	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
P177	用 12 个疏水或极性氨基酸之一替换	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
A178	用 12 个疏水或极性氨基酸	S、T、Y、L、	NHT

	之一替换	F、A、P、V、I、N、D、H	
A194	用 12 个疏水或极性氨基酸之一替换	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT

[0346]

[0347] 表13-噬菌体文库3

野生型 Neu2 氨基酸	设计	替换氨基酸	密码子使用
F13	用 9 个极性氨基酸之一替换	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RMV
L4	用 12 个疏水或极性氨基酸之一替换	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
L7、V12	用 6 个极性或芳香族氨基酸之一替换	F、Y、S、I、T、N	WHT
I22、A24	用 9 个极性氨基酸之一替换	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RMV
V325、L326 和 L327	用 6 个极性或芳香族氨基酸之一替换	F、Y、S、I、T、N	WHT
L365	用 6 个极性或芳香族氨基酸之一替换	F、Y、S、I、T、N	WHT
P89	用 5 个非极性氨基酸之一替换	F、I、L、M、V	NTK
L34、A36 和 V363	用 12 个疏水或极性氨基酸之一替换	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT

[0348]

[0349] 表11-13中的密码子使用列表示在文库的设计中使用的简并密码子编码,其中编码氨基酸的给定密码子的第一、第二和第三位示出在表14中,并如Mena等,(2005)PROTEIN ENG DES SEL.18(12):559-61中所述。

[0350] 表14

简并密码子编码	混合碱基
R	A、G
Y	C、T/U

[0351]

[0352]

M	A、C
K	G、T/U
S	G、C
W	A、T
H	A、C、T/U
B	G、C、T（或U）
V	A、C、G
D	A、G、T/U
N	A、C、G、T/U

[0353] 在加热以富集热稳定性和表达后，筛选所述噬菌体展示文库与构象特异性抗体和/或唾液酸生物素化探针的结合。所述唾液酸生物素化探针及其合成描绘在图4中。示例性的噬菌体展示筛选程序描绘在图5中。简单来说，产生表达所需Neu2变体的噬菌体文库。筛选噬菌体与固定化的抗Neu2抗体和/或唾液酸生物素化探针的结合。在清洗以除去未结合的噬菌体后，将结合的噬菌体从所述抗体或探针上洗脱并酌情进行分析。

[0354] C.酵母展示

[0355] 也将Neu2在酵母展示系统中表达，允许筛选Neu2变体的表达水平和对热变性的抗性两者。使用具有V6Y和I187K替换的Neu2作为用于文库制备的模板。设计的酵母展示文库1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、3a、3b和3c分别描绘在表15-24中。每个文库包括所描绘的突变的所有可能的组合。通过易错PCR，以每个酶1、2、3、4和5个替换的近似平均比率产生了5个另外的子文库。

[0356] 表15-酵母文库1a

[0357]

野生型 Neu2 氨基酸	**替换氨基酸**	**密码子使用**
L184	所有	NNK
H185	所有	NNK
P186	无（野生型）	
K187	无（野生型）	
Q188	无（野生型）	
P190	A、D、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V	VNT
I191	A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y	NHT
C219	无（野生型）	
G271	所有	NNK
C272	所有	NNK

[0358]

[0359] 总多样性:2.30E+07

[0360] 表16-酵母文库1b

[0361]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
L184	A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y	NHT
H185	所有	NNK
P186	A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y	NHT
K187	无（野生型）	
Q188	无（野生型）	
P190	A、D、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V	VNT
I191	A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y	NHT
C219	无（野生型）	
G271	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
C272	A、C、D、G、H、N、P、R、S、T	NVT

[0362] 总多样性:4.11E+07

[0363] 表17-酵母文库1c

[0364]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
L184	A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y	NHT
H185	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
P186	A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y	NHT
K187	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
Q188	无（野生型）	
P190	F、L、I、V	NTT
I191	A、D、F、H、I、L、N、P、S、T、V、Y	NHT

[0365]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
C219	无（野生型）	
G271	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
C272	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT

[0366] 总多样性:4.53E+07

[0367] 表18-酵母文库1d

[0368]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
L184	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
H185	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
P186	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
K187	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
Q188	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
P190	无（野生型）	
I191	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
C219	无（野生型）	
G271	A、D、E、G、K、N、R、S、T	RVM
C272	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT

[0369] 总多样性:4.30E+07

[0370] 表19-酵母文库2a

[0371]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
T156	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
F157	无（野生型）	
A158	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
V159	无（野生型）	
G160	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
P161	无（野生型）	
G162	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
H163	无（野生型）	
C164	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、	NDT

[0372]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
	Y、V	
L165	无（野生型）	
V176	L、V、P、A、H、D	SHT
P177	L、V、P、A、H、D	SHT
A178	L、V、P、A、H、D	SHT
A194	L、V、P、A、H、D	SHT

[0373] 总多样性:3.22E+08

[0374] 表20-酵母文库2b

[0375]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
T156	无（野生型）	
F157	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
A158	无（野生型）	
V159	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
G160	无（野生型）	
P161	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
G162	无（野生型）	
H163	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
C164	无（野生型）	
L165	R、N、D、C、G、H、I、L、F、S、Y、V	NDT
V176	L、V、P、A、H、D	SHT
P177	L、V、P、A、H、D	SHT
A178	L、V、P、A、H、D	SHT
A194	L、V、P、A、H、D	SHT

[0376] 总多样性:3.22E+08

[0377] 表21-酵母文库2c

[0378]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
T156	A、D、G、H、N、P、R、S、T	VVC

[0379]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
F157	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
A158	A、D、G、H、N、P、R、S、T	VVC
V159	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
G160	A、D、G、H、N、P、R、S、T	VVC
P161	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
G162	A、D、G、H、N、P、R、S、T	VVC
H163	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
C164	A、D、G、H、N、P、R、S、T	VVC
L165	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
V176	无（野生型）	
P177	无（野生型）	
A178	无（野生型）	
A194	无（野生型）	

[0380] 总多样性:3.49E+09

[0381] 表22-酵母文库3a

[0382]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
L4	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
L7	F、Y、S、I、T、N	WHT
V12	无（野生型）	
F13	无（野生型）	
I22	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RMV
A24	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RMV
L34	无（野生型）	
A36	无（野生型）	
H64	F、Y、S、I、T、N	WHT
P89	F、I、L、V	NTT
C164	无（野生型）	
V325	F、Y、S、I、T、N	WHT
L326	F、Y、S、I、T、N	WHT
L327	F、Y、S、I、T、N	WHT
C332	无（野生型）	
V363	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT

[0383] 总多样性:3.63E+08

[0384] 表23-酵母文库3b

[0385]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
L4	无（野生型）	
L7	F、Y、S、I、T、N	WHT
V12	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
F13	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RMV
I22	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RMV
A24	S、N、R、K、T、G、D、E、A	RMV
L34	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
A36	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
H64	无（野生型）	
P89	无（野生型）	
C164	A、G、S、T	RST
V325	无（野生型）	
L326	无（野生型）	
L327	无（野生型）	
C332	A、D、G、H、N、P、R、S、T	VVC
V363	无（野生型）	

[0386] 总多样性:2.72E+08

[0387] 表24-酵母文库3c

[0388]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
L4	无（野生型）	
L7	无（野生型）	
V12	无（野生型）	
F13	无（野生型）	
I22	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
A24	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
L34	无（野生型）	
A36	无（野生型）	
H64	F、Y、S、I、T、N	WHT

[0389]

野生型 Neu2 氨基酸	替换氨基酸	密码子使用
P89	S、T、Y、L、F、A、P、V、I、N、D、H	NHT
C164	A、G、S、T	RST
V325	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
L326	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
L327	A、D、F、H、L、P、S、V、Y	BHT
C332	A、D、G、H、N、P、R、S、T	VVC
V363	无（野生型）	

[0390] 总多样性:2.72E+08

[0391] 表15-24中的密码子使用列表示在所述文库的设计中使用的简并密码子编码,其中编码氨基酸的给定密码子的第一、第二和第三位示出在表14中,并如Mena等,(2005)PROTEIN ENG DES SEL.18(12):559-61中所述。

[0392] 在加热以富集热稳定性和表达后,筛选所述酵母展示文库与构象特异性抗体和/或唾液酸生物素化探针的结合。示例性的酵母展示筛选程序描绘在图6中。简单来说,产生编码所需Neu2变体的质粒文库和在表面上表达所需Neu2变体的酵母细胞。对酵母细胞进行热冲击,然后筛选与磁珠上的抗Neu2抗体和/或唾液酸生物素化探针的结合。分离所述磁珠以除去未结合的细胞,并酌情进一步分析结合的细胞的Neu2亲和性、活性和稳定性。

[0393] D.结果

[0394] 使用pCEP4哺乳动物表达载体,将包含使用本实施例中描述的合理设计、噬菌体展示和酵母展示方法鉴定到的突变的突变唾液酸酶表达成带有C-端人类Fc标签的分泌蛋白。表达使用带有抗人类Fc抗体传感器的ForteBio Octet和Western印迹来测定,并且酶活性如上所述使用产荧光底物4MU-NeuAc来测定。

[0395] 所述突变唾液酸酶的表达和活性水平示出在表25中。在表25中,酶活性被标注为:“+++”,其表示活性比野生型Neu2高>2倍;“++”,其表示活性与野生型Neu2相当;“+”,其表示活性低于野生型Neu2;或“-”,其表示没有可检测的活性;并且表达被标注为:“++++”,其表示表达比野生型Neu2高>15倍;“+++”,其表示表达比野生型Neu2高>6倍;“++”,其表示表达比野生型Neu2高2-5倍;“+”,其表示表达与野生型Neu2相当;或“-”,其表示没有可检测的表达。

[0396] 表25

[0397]

标识	突变	活性	表达
Neu2-M104	M1D，V6Y，P62G，I187K，C332A	+	++++
Neu2-M105	M1D，V6Y，K9D，I187K，C332A，V363R，L365I	+	+++
Neu2-M106	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，C332A	++	++++
Neu2-M107	M1D，V6Y，K9D，I187K，C332A，V363R，L365K	+	++++
Neu2-M108	M1D，V6Y，K9D，I187K，C332A，V363R，L365S	+	++++
Neu2-M109	M1D，V6Y，K9D，I187K，C332A，V363R，L365Q	+	++++
Neu2-M110	M1D，V6Y，K9D，I187K，C332A，V363R，L365H	+	+++
Neu2-M111	M1D，V6Y，A93K，I187K，C332A	++	++
Neu2-M112	M1D，V6Y，A93E，I187K，C332A	++	++
Neu2-M113	V6Y，I22N，C125Y，I187K，S301C，E319D	–	+++
Neu2-M114	V6Y，P62T，C125F，I187K，A222D	–	+++
Neu2-M115	V6Y，I187K，W292R	+	+++
Neu2-M116	V6Y，G107D，I187K	+	+++
Neu2-M117	C125L	+	+
Neu2-M118	V6Y，C125L	+	++
Neu2-M119	C125L，I187K	++	++
Neu2-M120	V6Y，C125L，I187K	+	+++
Neu2-M121	M1D，V6Y，K45A，I187K，C332A	++	++
Neu2-M122	M1D，V6Y，Q270A，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M123	M1D，V6Y，K44R，K45R，I187K，C332A	+	++
Neu2-M124	M1D，V6Y，Q112R，I187K，C332A	+	++
Neu2-M125	M1D，V6Y，Q270F，I187K，C332A	+	++
Neu2-M126	M1D，V6Y，I187K，S301R，W302K，C332A	++	+++
Neu2-M127	M1D，V6Y，K44E，K45E，I187K，	++	+

[0398]

标识	突变	活性	表达
	C332A		
Neu2-M128	M1D，V6Y，I187K，L217V，C332A	+	++
Neu2-M129	M1D，V6Y，I187K，L217A，C332A	+	++
Neu2-M130	M1D，V6Y，I187K，C332A，Y359A	–	+++
Neu2-M131	M1D，V6Y，I187K，C332A，Y359S	–	+++
Neu2-M132	M1D，V6Y，K44E，K45E，I187K，S301R，W302K，C332A	++	++
Neu2-M133	M1D，V6Y，Q112R，I187K，S301R，W302K，C332A	++	+++
Neu2-M134	M1D，V6Y，I187K，Q270A，S301R，W302K，C332A	++	+++
Neu2-M135	M1D，V6Y，K44E，K45E，Q112R，I187K，C332A	+	+
Neu2-M136	M1D，V6Y，K44E，K45E，I187K，Q270A，C332A	++	++
Neu2-M137	M1D，V6Y，K45A，I187K，Q270A，C332A	++	+++
Neu2-M138	M1D，V6Y，I187K，Q270H，C332A	++	+++
Neu2-M139	M1D，V6Y，I187K，Q270P，C332A	+	+++
Neu2-M140	M1D，V6Y，Q112K，I187K，C332A	++	++
Neu2-M141	M1D，V6Y，P62S，I187K，Q270A，S301R，W302K，C332A	+	+++
Neu2-M142	M1D，V6Y，P62T，I187K，Q270A，S301R，W302K，C332A	+	+++
Neu2-M143	M1D，V6Y，P62N，I187K，Q270A，S301R，W302K，C332A	+	+++
Neu2-M144	V6Y，P62H，I187K	+	+++
Neu2-M145	V6Y，Q108H，I187K	+	++
Neu2-M146	M1D，V6Y，P62H，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M147	M1D，V6Y，P62G，I187K，C332A	++	++
Neu2-M148	V6Y，P62G，I187K	+	++
Neu2-M149	M1D，V6Y，P62H，I187K	++	++
Neu2-M150	M1D，V6Y，Q108H，I187K	++	++
Neu2-M151	M1D，V6Y，P62F，I187K，C332A	+	–
Neu2-M152	M1D，V6Y，P62I，I187K，C332A	+	–
Neu2-M153	M1D，V6Y，P62N，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M154	M1D，V6Y，P62D，I187K，C332A	++	+
Neu2-M155	M1D，V6Y，P62E，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M156	V6Y，C164G，I187K，T249A	+	+
Neu2-M157	V6Y，C164G，I187K	+	+

[0399]

标识	突变	活性	表达
Neu2-M158	V6Y，Q126L，I187K D251G	+	++
Neu2-M159	V6Y，L54M，Q69H，R78K，A171G，I187K	+	+
Neu2-M160	V6Y，P62T，I187K	+	++
Neu2-M161	V6Y，A150V，I187K	+	++
Neu2-M162	P5H，V6Y，P62S，I187K	+	++
Neu2-M163	V6Y，C164G，I187K	+	+

[0400] 为了确认这些结果，将Neu2-M106(具有氨基酸序列SEQ ID NO:48，由核苷酸序列SEQ ID NO:89编码)表达并使用蛋白A柱进行纯化。图7A是SDS-PAGE凝胶图像，示出了在非还原和还原条件下的重组野生型人类Neu2和Neu2变体M106(各自带有C-端人类Fc标签)。图7B是重组野生型人类Neu2和Neu2变体M106(各自带有C-端人类Fc标签)的SEC-HPLC迹线。尽管Neu2-Fc在蛋白A纯化后具有0.3mg/升的产率并且通过SEC确定的单体含量为7％，但Neu2-M106具有20mg/升的得率和85％的单体含量。

[0401] 通过如上所述测量唾液酸从产荧光底物4-甲基伞形酮基-N-乙酰神经氨酸(4MU-NeuAc)的释放，测定了Neu2-M106的酶动力学。将2μg/孔的固定浓度的酶与浓度在4mM至0.03μM范围内的产荧光底物4MU-NeuAc温育。图8描绘了Neu2变体M106的酶活性。Neu2-M106的酶活性与野生型Neu2相当，确定的K_M为230μM。

[0402] 合在一起，这些结果显示，通过本文中描述的合理设计、噬菌体展示和/或酵母展示方法鉴定到的突变可以提高唾液酸酶的稳定性和/或表达。

[0403] 实施例3

[0404] 本实施例描述了使用突变的人唾液酸酶构建并表达抗体-唾液酸酶遗传融合蛋白和含有所述融合蛋白的抗体-唾液酸酶偶联物(ASC)。

[0405] 四种类型的示例性ASC的结构体系描绘在图11中。第一种类型的ASC被称为“Raptor”，包括抗体(具有两条重链和两条轻链)和融合在所述抗体的每条重链的C-端处的唾液酸酶。第二种类型的ASC被称为“Janus”，含有一条抗体臂(具有一条重链和一条轻链)和一个唾液酸酶-Fc融合体，后者具有融合在Fc的一条臂的N-端处的唾液酸酶。所述Janus ASC中的每个Fc结构域多肽含有用于异二聚化的“杵”(T366Y)或“臼”(Y407T)突变(残基编号按照EU编号系统，Kabat，E.A.等，(1991)，同上)(图11B)。第三种类型的ASC被称为“Lobster”，含有两个Fc结构域多肽，每个所述多肽具有融合在Fc的N-端处的唾液酸酶和融合在Fc的C-端处的scFv(图11C)。第四种类型的ASC被称为“Bunk”，含有一条抗体臂(具有一条重链和一条轻链)，其具有融合在Fc的一条臂的C-端处的scFv，和一个唾液酸酶-Fc融合体，其具有融合在Fc的另一条臂的N-端处的唾液酸酶。Bunk ASC中的每个Fc结构域多肽含有用于异二聚化的“杵”(T366Y)或“臼”(Y407T)突变(残基编号按照EU编号系统，Kabat，E.A.等，(1991)，同上)(图11D)。

[0406] 制造了包含实施例2中描述的Neu2变体和曲妥珠单抗的Janus ASC，并测试其活性和表达。表达使用带有抗人类Fc抗体传感器的ForteBio Octet和Western印迹来测定，并且酶活性如上所述使用产荧光底物4MU-NeuAc来测定。Janus ASC的表达和活性水平示出在表26中。在表26中，酶活性被标注为：“+++”，其表示活性比野生型Neu2高>2倍；“++”，其表示活

性与野生型Neu2相当;“+”,其表示活性低于野生型Neu2;或“-”,其表示没有可检测的活性;并且表达被标注为:“++++”,其表示表达比野生型Neu2高>15倍;“+++”,其表示表达比野生型Neu2高>6倍;“++”,其表示表达比野生型Neu2高2-5倍;“+”,其表示表达与野生型Neu2相当;或“-”,其表示没有可检测的表达。

[0407] 表26

[0408]

Neu2 变体	突变	活性	表达
Neu2-M146	M1D，V6Y，P62H，I187K，C332A	+++	+++
Neu2-M147	M1D，V6Y，P62G，I187K，C332A	++	++
Neu2-M148	V6Y，P62G，I187K	++	+++
Neu2-M149	M1D，V6Y，P62H，I187K	+	+++
Neu2-M150	M1D，V6Y，Q108H，I187K	++	++

[0409]

Neu2 变体	突变	活性	表达
Neu2-M151	M1D，V6Y，P62F，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M152	M1D，V6Y，P62I，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M153	M1D，V6Y，P62N，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M154	M1D，V6Y，P62D，I187K，C332A	++	++
Neu2-M155	M1D，V6Y，P62E，I187K，C332A	++	+
Neu2-M156	V6Y，C164G，I187K，T249A	+	+
Neu2-M157	V6Y，C164G，I187K	+	+
Neu2-M158	V6Y，Q126L，I187K D251G	++	++
Neu2-M159	V6Y，L54M，Q69H，R78K，A171G，I187K	+	+
Neu2-M160	V6Y，P62T，I187K	++	++
Neu2-M161	V6Y，A150V，I187K	+	++
Neu2-M162	P5H，V6Y，P62S，I187K	++	++
Neu2-M163	V6Y，C164G，I187K	+	+

[0410] 制造了包含实施例2中描述的Neu2变体和曲妥珠单抗的另外的Janus ASC,并测试了它们的活性和表达。将Janus ASC在Expi293F细胞中在500mL培养物中表达,并使用蛋白A和离子交换层析纯化。表达使用带有抗人类Fc抗体传感器的ForteBio Octet和Western印迹来测定,并且酶活性如上所述使用产荧光底物4MU-NeuAc来测定。Janus ASC的表达和活性水平示出在表27中。在表27中,酶活性被标注为:“+++”,其表示活性比野生型Neu2高>2倍;“++”,其表示活性与野生型Neu2相当;“+”,其表示活性低于野生型Neu2;或“-”,其表示没有可检测的活性;并且表达被标注为:“++++”,其表示表达比野生型Neu2高>15倍;“+++”,其表示表达比野生型Neu2高>6倍;“++”,其表示表达比野生型Neu2高2-5倍;“+”,其表示表达与野生型Neu2相当;或“-”,其表示没有可检测的表达。

[0411] 表27

[0412]

Neu2 变体	突变	活性	表达
Neu2-M106	M1D， V6Y， P62G， A93E，I187K，C332A	++	++++
Neu2-M134	M1D， V6Y， I187K， Q270A，S301R，W302K，C332A	+++	++++
Neu2-M141	M1D， V6Y， P62S， I187K，	++	++++

[0413]

Neu2 变体	突变	活性	表达
	Q270A，S301R，W302K，C332A		
Neu2-M142	M1D， V6Y， P62T， I187K，Q270A，S301R，W302K，C332A	++	++++
Neu2-M143	M1D， V6Y， P62N， I187K，Q270A，S301R，W302K，C332A	++	++++
Neu2-M153	M1D， V6Y， P62N， I187K，C332A	++	++++

[0414] 实施例4

[0415] 本实施例描述了带有提高唾液酸酶的表达和/或活性的突变的重组人唾液酸酶的构建。

[0416] 除非另有指明，否则将本实施例中的突变唾液酸酶使用pCEP4哺乳动物表达载体在Expi293F细胞中表达成带有C-端人类Fc标签的分泌蛋白。表达使用带有抗人类Fc抗体传感器的ForteBio Octet和Western印迹来测定，并且酶活性如上所述使用产荧光底物4MU-NeuAc来测定。

[0417] 构建了在Q126位置处包含合理设计的替换的突变Neu2唾液酸酶。所述Neu2晶体结构的检查揭示出Q126的突变可以增加与邻近氨基酸残基的相互作用。

[0418] 还构建了在Q270位置处包含合理设计的替换的另外的突变Neu2唾液酸酶。所述Neu2晶体结构的检查揭示出Q270向某些氨基酸的突变可以稳定与R237的相互作用并稳定在底物口袋中的结合。

[0419] 还构建了另外的突变Neu2唾液酸酶，其包括β转角中的氨基酸残基被脯氨酸的替换(例如D80P、R189P和/或H239P替换)。在这些位置处用脯氨酸替换可以例如通过影响局部蛋白质折叠而使蛋白质稳定。

[0420] 得到的突变唾液酸酶的表达和活性水平示出在表28中。在表28中，酶活性被标注为：“++”，其表示活性与野生型Neu2相当；“+”，其表示活性低于野生型Neu2；或“-”，其表示没有可检测的活性；并且表达被标注为：“+++++”，其表示表达比野生型Neu2高>40倍；“++++”，其表示表达比野生型Neu2高>15倍；“+++”，其表示表达比野生型Neu2高>6倍；“++”，其表示表达比野生型Neu2高2-5倍；“+”，其表示表达与野生型Neu2相当；或“-”，其表示没有可检测的表达。

[0421] 表28

[0422]

标识	突变	活性	表达
Neu2-M164	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126E，I187K，C332A	++	++++
Neu2-M165	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126I，I187K，C332A	++	++++
Neu2-M166	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126L，I187K，C332A	+	+++++
Neu2-M167	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126Y，I187K，C332A	+	+++++
Neu2-M168	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126F，I187K，C332A	+	+++++
Neu2-M169	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126H，I187K，C332A	++	++++
Neu2-M170	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，Q270S，C332A	++	++++
Neu2-M171	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，Q270T，C332A	++	++++
Neu2-M172	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126Y，I187K，Q270T，C332A	++	+++++
Neu2-M173	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126Y，I187K，A242F，Q270T，C332A	++	+++++
Neu2-M174	M1D，V6Y，P62G，D80P，A93E，I187K，C332A	++	++++
Neu2-M175	M1D，V6Y，P62G，A93E，R170P，I187K，C332A	++	+++
Neu2-M176	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，Q188P，C332A	++	++++
Neu2-M177	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，R189P，C332A	++	++++
Neu2-M178	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，E225P，C332A	+	++++
Neu2-M179	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，H239P，C332A	++	++++
Neu2-M180	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，E257P，C332A	++	+++

[0423] 为了确认这些结果，将Neu2-M173(具有氨基酸序列SEQ ID NO:159，由核苷酸序列SEQ ID NO:181编码)表达成带有C-端人类Fc标签，并使用蛋白A和陶瓷羟基磷灰石(CHT)柱进行纯化。图22A是SDS-PAGE凝胶的图像，示出了在非还原和还原条件下的Neu2-M173-Fc(带有C-端人类Fc标签)。图22B是Neu2-M173-Fc(带有C-端人类Fc标签)的SEC-HPLC迹线。Neu2-M173-Fc具有120mg/升的得率，并且单体含量为90％。

[0424] 通过如上所述测量唾液酸从产荧光底物4-甲基伞形酮基-N-乙酰神经氨酸(4MU-NeuAc)的释放,来测定Neu2-M173-Fc的酶动力学。将2μg/孔的固定浓度的酶与浓度在4mM至0.03μM范围内的产荧光底物4MU-NeuAc温育。图23描绘了Neu2-M173-Fc的酶活性。Neu2-M173-Fc的酶活性与野生型Neu2相当,K_M被确定为230μM。

[0425] 还构建了在S301和/或W302位置处包含合理设计的替换的另外的突变Neu2唾液酸酶。S301和/或W302的突变可能影响与邻近氨基酸残基和/或底物的相互作用。

[0426] 所述突变唾液酸酶的表达和酶活性示出在表29中。在表29中,酶活性被标注为:“++”,其表示活性与野生型Neu2相当;“+”,其表示活性低于野生型Neu2;或“-”,其表示没有可检测的活性;并且表达被标注为:“+++++”,其表示表达比野生型Neu2高>40倍;“++++”,其表示表达比野生型Neu2高>15倍;“+++”,其表示表达比野生型Neu2高>6倍;“++”,其表示表达比野生型Neu2高2-5倍;“+”,其表示表达与野生型Neu2相当;或“-”,其表示没有可检测的表达。

[0427] 表29

[0428]

标识	突变	活性	表达
Neu2-M182	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301A，C332A	++	++++
Neu2-M183	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301D，C332A	++	++++

[0429]

标识	突变	活性	表达
Neu2-M184	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301E，C332A	++	+++
Neu2-M185	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301F，C332A	+	++++
Neu2-M186	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301H，C332A	+	++++
Neu2-M187	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301K，C332A	++	+++++
Neu2-M188	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301L，C332A	++	++++
Neu2-M189	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301M，C332A	++	++++
Neu2-M190	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301N，C332A	++	++++
Neu2-M191	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301P，C332A	++	++++
Neu2-M192	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301Q，C332A	++	+++
Neu2-M193	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301R，C332A	++	+++++
Neu2-M194	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301T，C332A	++	++++
Neu2-M195	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301V，C332A	++	++++
Neu2-M196	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301W，C332A	+	++++
Neu2-M197	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301Y，C332A	++	++++
Neu2-M198	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302A，C332A	+	++++
Neu2-M199	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302D，C332A	+++	+++
Neu2-M200	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302F，C332A	+	++++
Neu2-M201	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302G，C332A	++	++++
Neu2-M202	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302H，C332A	+	++++
Neu2-M203	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，	+	++++

[0430]

标识	突变	活性	表达
	W302I，C332A		
Neu2-M204	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302L，C332A	++	++++
Neu2-M205	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302M，C332A	+	++
Neu2-M206	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302N，C332A	+	++++
Neu2-M207	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302P，C332A	-	++++
Neu2-M208	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302Q，C332A	++	++++
Neu2-M209	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302R，C332A	++	+++++
Neu2-M210	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302S，C332A	++	++++
Neu2-M211	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302T，C332A	++	++++
Neu2-M212	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302V，C332A	+	++++
Neu2-M213	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，W302Y，C332A	+	++++
Neu2-M214	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301A，W302A，C332A	++	++++
Neu2-M215	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301A，W302R，C332A	+	++++
Neu2-M216	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301A，W302S，C332A	++	++++
Neu2-M217	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301A，W302T，C332A	++	++++
Neu2-M218	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301K，W302S，C332A	+	++++
Neu2-M219	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301K，W302R，C332A	++	+++++
Neu2-M219	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301K，W302T，C332A	++	++++
Neu2-M220	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301N，W302S，C332A	+	++++
Neu2-M221	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301N，W302T，C332A	++	++++

[0431]

标识	突变	活性	表达
Neu2-M222	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，S301T，W302R，C332A	+	++++

[0432] 实施例5

[0433] 本实施例描述了带有降低蛋白水解切割的突变的重组人唾液酸酶的构建。

[0434] 使用CHO细胞表达系统，在大规模(10L)高细胞密度生产中将Neu2-M106(如实施例2中所述并具有氨基酸序列SEQ ID NO:48)表达成融合有Fc的单链蛋白，并使用蛋白A柱进行纯化。将得到的蛋白质用过SDS-PAGE进行分析。结果示出在图24中。在还原条件下，所述蛋白质包括全长(70kDa，大约50％)和切割的(40kDa和30kDa，大约50％)级分的混合物。然而，在非还原条件下没有切割，所述蛋白质保持为单链(图24)。另外，当在较小规模上表达Neu2-M106时(使用较短的细胞培养持续时间和较低的细胞密度)，没有切割，并且蛋白质保持为单链。初步的质谱分析显示，在大规模生产后在还原条件下观察到的40kDa和30kDa分子量级分是在唾液酸酶的氨基酸残基R243与V244之间切割的结果。切割的Neu2-M106的酶活性与未切割的Neu2-M106相近。

[0435] 推测所述Neu2-M106的切割可能是由作为蛋白质生产、收获和/或纯化期间细胞裂解的结果而释放出的细胞内蛋白酶的活性造成的。为了试验这种假设，将切割的Neu2-M106(使用上述引起切割的大规模生产制备的)和未切割的Neu2-M106(使用上述不引起切割的较小规模生产制备的)两者与胰蛋白酶温育，并在还原条件下通过SDS-PAGE进行分析(图25)。简单来说，胰蛋白酶消化反应通过将胰蛋白酶(5μL，在PBS中的0.005％溶液)与Neu2-M106(25μL，0.25mg/mL，在PBS pH 8.0中)在冰上温育5分钟来进行。通过添加LDS凝胶载样缓冲液(5μL)终止反应，并在还原SDS-PAGE凝胶上运行，以观察胰蛋白酶介导的切割。所述SDS-PAGE分析显示，未切割的Neu2-M106与胰蛋白酶的温育产生与切割的Neu2-M106相同的切割模式。此外，切割的Neu2-M106与胰蛋白酶的温育导致对应于切割产物的条带的强度增加。

[0436] 也在各种不同的蛋白酶抑制剂存在下将Neu2-M106与胰蛋白酶温育。简单来说，胰蛋白酶消化反应通过将胰蛋白酶(0.005％)与Neu2-M106(0.5mg/mL)和蛋白酶抑制剂在冰上温育5分钟来进行。通过添加LDS凝胶载样缓冲液终止反应，并在还原SDS-PAGE凝胶上运行，以观察胰蛋白酶介导的切割。使用的抑制剂包括柠檬酸铁(0.3和5mM)、抑肽酶(5,000和20,000U/mL)、AEBSF(0.1和1mM)、亮抑酶肽(1和10μM)或E-64(1和10μM)。正如在图26中看到的，蛋白酶抑制剂降低胰蛋白酶切割的程度。

[0437] 合在一起，这些结果证实了在大规模生产后Neu2-M106的切割是由胰蛋白酶或相似蛋白酶类别的成员造成的。

[0438] 接下来，我们试图合理设计带有提高对胰蛋白酶切割的抗性的突变的重组人唾液酸酶。

[0439] 除非另有指明，否则在本实施例的剩余部分中，使用pCEP4哺乳动物表达载体将突变唾液酸酶在Expi293F细胞中(在50mL规模上)表达成带有C-端人类Fc标签的分泌蛋白。将得到的蛋白质使用蛋白A柱进行纯化。表达使用带有抗人类Fc抗体传感器的ForteBio Octet和Western印迹来测定，并且酶活性如上所述使用产荧光底物4MU-NeuAc来测定。蛋白

酶切割通过如上所述的SDS-PAGE来测定。

[0440] 首先，将R243突变成不同的极性/带电荷氨基酸例如K、E、H、N和Q。然而，R243的这些突变导致活性的完全丧失和表达量的降低(在类似的唾液酸酶中R243也是保守氨基酸)。

[0441] 接下来，对切割位点周围的各个不同氨基酸残基进行突变，并测试表达、活性和胰蛋白酶切割抗性。测试的替换和替换组合示出在图27中。所有突变在Neu2-M106背景(即包含M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K和C332A替换)中测试。

[0442] 图27中描绘的大多数突变唾液酸酶表达良好，然而只有两种突变唾液酸酶(包含V244I或A242C突变)有活性。A242C突变导致胰蛋白酶抗性提高超过10倍和略微更低的活性(均相对于Neu2-M106)。然而，具有未配对的半胱氨酸可能是潜在不稳定的，因此将A242突变成所有19种其他氨基酸，并测定活性和胰蛋白酶抗性。如图28中所示，将A242突变成芳香族氨基酸例如F、W和Y导致与Neu2-M106相比胰蛋白酶切割抗性的急剧提高(图28A)和与Neu2-M106相近的酶活性(图28B)。SEC分析显示，含有每个这些突变的蛋白质具有与Neu2-M106相似的模式和高于95％的单体含量(图28C)。

[0443] 结构分析显示，用芳香族氨基酸代替A242可以为L260和V265(位于A242附近的非极性氨基酸)提供额外的疏水或堆积相互作用。因此，也将L260和V265突变成苯丙氨酸。与这些突变一起，也测试了可以例如通过提高堆积相互作用而提供额外稳定性的几种其他合理设计的突变体的表达、活性和蛋白酶抗性。

[0444] 选择结果示出在图29中。如图29中所示，R241Y和A242F突变的组合(Neu2-M255)产生对胰蛋白酶切割的最大抗性(胰蛋白酶抗性相对于Neu2-M106提高超过10倍)。

[0445] 所述突变唾液酸酶的表达、活性和蛋白酶抗性水平示出在表30中。在表30中，酶活性被标注为：“++”，其表示活性与野生型Neu2相当；“+”，其表示活性低于野生型Neu2；或“-”，其表示没有可检测的活性；并且表达被标注为：“+++++”，其表示表达比野生型Neu2高>40倍；“++++”，其表示表达比野生型Neu2高>15倍；“+++”，其表示表达比野生型Neu2高>6倍；“++”，其表示表达比野生型Neu2高2-5倍；“+”，其表示表达与野生型Neu2相当；或“-”，其表示没有可检测的表达。蛋白酶/胰蛋白酶抗性被标注为：“+++”，其表示抗性比Neu2-M106高>10倍；“++”，其表示抗性比Neu2-M106高≥5倍；“+”，其表示抗性与Neu2-M106相当；或“-”，其表示抗性低于Neu2-M106。NT＝未测试。

[0446] 表30

[0447]

标识	突变	活性	表达	蛋白酶抗性
Neu2-M223	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，L240Y，C332A	++	+++++	+
Neu2-M224	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242C，C332A	+	+++	+++
Neu2-M225	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242D，C332A	–	++++	–
Neu2-M226	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242E，C332A	–	+++	–
Neu2-M227	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242F，C332A	++	++++	++
Neu2-M228	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242G，C332A	+	+++	+
Neu2-M229	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242H，C332A	+	+++	+
Neu2-M230	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242I，C332A	+	+++	+
Neu2-M231	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242K，C332A	+	++++	–
Neu2-M232	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242L，C332A	+	+++	+
Neu2-M233	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242M，C332A	+	+++	+
Neu2-M234	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242N，C332A	+	++++	++
Neu2-M235	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242Q，C332A	+	+++	++
Neu2-M236	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242R，C332A	+	++++	–
Neu2-M237	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242S，C332A	+	+++	–
Neu2-M238	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242T，C332A	–	+++	+
Neu2-M239	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242V，C332A	+	+++	+
Neu2-M240	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242W，C332A	++	++++	++
Neu2-M241	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242Y，C332A	++	++++	++
Neu2-M242	M1D，V6Y，P62G，A93E，	++	++++	++

标识	突变	活性	表达	蛋白酶抗性
	I187K，A242F，L260F，C332A			
Neu2-M243	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242F，V265F，C332A	+	++++	++
Neu2-M244	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242F，A213C，C332A	+	++++	++
Neu2-M245	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242F，A213S，C332A	+	++++	++
Neu2-M246	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242F，A213T，C332A	++	++++	++
Neu2-M247	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242F，A213N，C332A	+	++	NT
Neu2-M248	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242F，A213C，S258C，C332A	++	++++	++
Neu2-M249	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，L240Y，L260F，C332A	++	+++++	+
Neu2-M250	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，L240D，L260T，C332A	+	+	NT
Neu2-M251	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，L240N，L260D，C332A	+	++	NT
Neu2-M252	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，L240N，L260T，C332A	++	++++	+
Neu2-M253	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，L240N，L260Q，C332A	++	++++	+
Neu2-M254	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，R241A，A242F，C332A	++	+++	++
Neu2-M255	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，R241Y，A242F，C332A	++	+++	+++
Neu2-M256	M1D，V6Y，P62G，A93E，Q126Y，I187K，L240Y，A242F，Q270T，C332A	++	+++++	++
Neu2-M257	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，V244I，C332A	++	++++	+
Neu2-M258	M1D，V6Y，P62G，A93E，I187K，A242C，V244K，C332A	+	+++	++

[0448]

[0449] 实施例6

[0450] 本实施例描述了使用突变的人唾液酸酶构建并表达抗体-唾液酸酶遗传融合蛋白和含有所述融合蛋白的抗体-唾液酸酶偶联物(ASC)。

[0451] 使用带有M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K和C332A替换的Neu2和曲妥珠单抗制造了在本实施例中被称为“Janus曲妥珠单抗”的Janus抗体-唾液酸酶偶联物(ASC)。如下所述将这种Janus曲妥珠单抗(包含由核苷酸序列SEQ ID NO:86编码的具有氨基酸序列SEQ ID NO:

66的第一多肽链,由核苷酸序列SEQ ID NO:87编码的具有氨基酸序列SEQ ID NO:67的第二多肽链,和由核苷酸序列SEQ ID NO:88编码的具有氨基酸序列SEQ ID NO:68的第三多肽链)表达,并使用SDS-PAGE表征纯度且使用4MU-NeuAc表征酶活性。

[0452] 使用pCEP4哺乳动物表达载体将Janus曲妥珠单抗在Expi293人类细胞的1L转染中表达。使用蛋白A,然后是阳离子交换层析(Hitrap SP-HP,GE Lifesciences)纯化Janus曲妥珠单抗。将纯化的蛋白质通过SDS-PAGE(图12)和SEC-HPLC(图13)进行分析。表达量为30mg/L,通过SEC-HPLC确定的单体纯度为90%。

[0453] 所述重组表达的Janus曲妥珠单抗的酶活性通过测量唾液酸从产荧光底物4-甲基伞形酮基-N-乙酰神经氨酸(4MU-NeuAc)的释放来测定。具体来说,使用2μg/孔的固定浓度的酶,将其与浓度在4000μM至7.8μM范围内的产荧光底物4MU-NeuAc温育,来进行酶动力学测定。如图14中所示,Janus曲妥珠单抗具有酶活性,Km为0.48mM。

[0454] 使用ForteBio Octet来测试Janus曲妥珠单抗的抗原(Her2)结合,将ASC捕获在抗Fc抗体传感器上并浸泡在带有His标签的Her2的连续稀释液中(50至0.78nM,1:2稀释)。Janus曲妥珠单抗以与曲妥珠单抗相当的结合亲和性结合到Her2(图15)。

[0455] 实施例7

[0456] 本实施例描述了含有细菌唾液酸酶的抗体-唾液酸酶偶联物(ASC)的体内给药。

[0457] 在本实施例中制造并测试了下述ASC:(i)包括鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)唾液酸酶(St-唾液酸酶)和曲妥珠单抗的Janus ASC(包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:86编码的氨基酸序列SEQ ID NO:66的第一多肽链,具有由核苷酸序列SEQ ID NO:87编码的氨基酸序列SEQ ID NO:67的第二多肽链,和具有由核苷酸序列SEQ ID NO:91编码的氨基酸序列SEQ ID NO:90的第三多肽链);(ii)包括St-唾液酸酶和曲妥珠单抗的Raptor ASC(包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:86编码的氨基酸序列SEQ ID NO:66的第一和第四多肽链,和具有由核苷酸序列SEQ ID NO:93编码的氨基酸序列SEQ ID NO:92的第二和第三多肽链);和(iii)包括St-唾液酸酶和源自于曲妥珠单抗的scFv的Lobster ASC(包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:95编码的氨基酸序列SEQ ID NO:94的第一和第二多肽链)。

[0458] 在用表达人Her2的鼠类乳腺癌细胞系(EMT6-hHer2细胞)注射的小鼠同基因肿瘤模型中,将这些ASC与曲妥珠单抗进行比较。将6-8周龄的雌性BALB/c小鼠在右下胁区域中用0.1ml PBS中的EMT6-Her2肿瘤细胞($5x10^5$)皮下接种,用于肿瘤发生。当肿瘤达到50-100mm^3,平均值为~75-100mm^3时,将小鼠随机分派到8个组。治疗组描述在表31中,并注明了随机分组后的给药时间表。正如指示的,将抗小鼠NK1.1抗体(克隆:PK136;BioXcell,621717N1)、抗小鼠CD8α抗体(克隆:53-6.7;BioXcell,BE0004-1)和氯膦酸二钠脂质体(FormuMax Scientific,Inc.)包括在治疗组中。

[0459] 表31

[0460]

组	动物数	治疗	剂量（mg/kg）	给药体积（μL/g）	途径	时间表（天）
1	8	介质（PBS）	NA	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
2	8	曲妥珠单抗	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
3	8	Raptor	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
4	8	Janus	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
5	8	Lobster	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
6	8	Janus	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
		抗小鼠 NK1.1 抗体（克隆：PK136）	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
7	8	Janus	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
		抗小鼠 CD8α 抗体（克隆：53-6.7）	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
8	8	Janus	10	10	i.p.	0,3,7,10,14,17
		氯膦酸二钠脂质体	0.5 mg/小	100 μL/小	i.p.	TIW x 2wks

[0461]

组	动物数	治疗	剂量（mg/kg）	给药体积（μL/g）	途径	时间表（天）
			鼠	鼠		

[0462] 来自于使用曲妥珠单抗以及Raptor、Janus和Lobster ASC的治疗结果分别示出在图16A、16B、16C和16D中。正如可以看到的，曲妥珠单抗在所治疗的8只个体小鼠中不引起完全响应(被定义为在研究过程中的任何时间点减退到低于触诊极限，图16A)。与此形成对比的是，Raptor表现出8只动物中的2只具有完全响应(图16B)，Janus表现出8只动物中的3只具有完全响应(图16C)，并且Lobster表现出8只动物中的2只具有完全响应(图16D)。

[0463] 与NK剥夺(抗小鼠NK1.1抗体)、巨噬细胞剥夺(氯膦酸二钠脂质体)和CD8 T细胞剥夺(抗小鼠CD8α抗体)一起给药Janus的结果示出在图17中。正如可以看到的，与在8只动物中的3只中存在完全响应的单独的Janus治疗(图16C)相比，NK剥夺将完全响应的数目减少到8只动物中的1只(图17A)。巨噬细胞剥夺也将完全响应的数目减少到8只动物中的1只(图17B)。CD8 T细胞剥夺完全逆转了Janus的效果，没有动物显示出完全响应(图17C)。图17D示出了介质、单独的Janus、单独的曲妥珠单抗和与NK、巨噬细胞和CD8 T细胞剥夺一起的Janus的平均肿瘤体积。这些结果证实先天性免疫(NK和巨噬细胞依赖性)和获得性免疫(CD8 T细胞)对体内ASC活性有贡献。

[0464] 实施例8

[0465] 本实施例描述了具有细菌唾液酸酶的抗体-唾液酸酶偶联物(ASC)的体内给药。

[0466] 在本实施例中制造并测试了下述ASC：(i)包括鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)唾液酸酶(St-唾液酸酶)和曲妥珠单抗的Janus ASC(包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:86编码的氨基酸序列SEQ ID NO:66的第一多肽链，具有由核苷酸序列SEQ ID NO:87编码的氨基酸序列SEQ ID NO:67的第二多肽链，和具有由核苷酸序列SEQ ID NO:91编码的氨基酸序列SEQ ID NO:90的第三多肽链)；和(ii)包括具有两个功能丧失突变D100V和G231V的St-唾液酸酶和曲妥珠单抗的Janus ASC(“Janus-LOF”，包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:86编码的氨基酸序列SEQ ID NO:66的第一多肽链，具有由核苷酸序列SEQ ID

NO:87编码的氨基酸序列SEQ ID NO:67的第二多肽链,和具有由核苷酸序列SEQ ID NO:97编码的氨基酸序列SEQ ID NO:96的第三多肽链)。

[0467] 正如在D'Amico等,(2016)ANNALS OF ONCOLOGY,Volume 27,Issue suppl_8,41P中所描述的,在用表达人Her2的独立的EMT6细胞系(EMT6-hHer2细胞)注射的小鼠同基因原位肿瘤模型中对这些ASC进行测试。将6-8周龄的雌性BALB/c小鼠通过用EMT6-Her2肿瘤细胞($5x10^6$)乳腺内移植进行接种。当肿瘤达到约250mm^3时,将小鼠随机分派到6个组。治疗组描述在表32中,并注明了随机分组后的给药时间表。抗小鼠PD1抗体从BioXcell获得(RMP1-14,目录号665418F1)。

[0468] 表32

[0469]

组	动物数	治疗	剂量(mg/kg)	给药体积(μL/g)	途径	时间表(天)
1	6	介质(PBS)	NA	10	i.p.	0,3,7,10
2	6	曲妥珠单抗	10	10	i.p.	0,3,7,10
3	6	Janus	10	10	i.p.	0,3,7,10
4	6	失去功能的 Janus(LOF)	10	10	i.p.	0,3,7,10
5	6	抗小鼠 PD1 抗体	10	10	i.p.	0,3,7,10
6	6	Janus	10	10	i.p.	0,3,7,10
		抗小鼠 PD1 抗体	10	10	i.p.	0,3,7,10

[0470] 第1至4组(介质、曲妥珠单抗、Janus和Janus LOF)的结果示出在图18A中。正如可以看到的,用Janus治疗的6只动物中的3只具有肿瘤生长的完全消退。值得注意的是,Janus LOF和曲妥珠单抗两者与介质治疗的动物相当。

[0471] 将所述具有完全消退的3只小鼠("治愈的小鼠")用与最初使用的相同的EMT6-Her2细胞或亲代EMT6细胞(缺少工程化改造的人Her2表达)再激惹。将0.1ml PBS中的EMT6细胞和EMT6-Her2细胞($5x10^5$)分别皮下接种在右或左下胁区域中,用于所有3只治愈的小鼠的肿瘤发生。也将EMT6-Her2细胞皮下接种到空白(Naïve)小鼠中作为对照。正如可以在图18B中看到的,EMT6-Her2细胞和亲代EMT6细胞都不能在治愈的小鼠中引起肿瘤生长,而正如预期的,EMT6-Her2细胞在空白(Naïve)小鼠中发展成肿瘤。这些结果表明本发明的抗体-唾液酸酶偶联物能够诱导针对肿瘤的长期记忆。此外,所述长期记忆针对所述肿瘤细胞,并且独立于最初靶向的癌抗原(在这种情况下是Her2)。

[0472] 第1、5和6组(介质、抗小鼠PD1抗体和与Janus组合的抗小鼠PD1抗体)的结果示出在图19A和图19B中。尽管抗小鼠PD1抗体具有良好活性,其中6只小鼠中的4只表现出完全消退(与单独的Janus相似,其中6只小鼠中的3只表现出完全消退,参见图18A),但抗小鼠PD1抗体与Janus的组合在所有6只小鼠中表现出肿瘤生长的完全消退(图19B)。在给药这种组合的动物中,没有任一只体重减轻。

[0473] 实施例9

[0474] 本实施例描述了具有细菌唾液酸酶的抗体-唾液酸酶偶联物(ASC)的体内给药。

[0475] 在本实施例中,制造并测试了一种包括鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)唾液酸酶(St-唾液酸酶)和曲妥珠单抗的Janus ASC(包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:86编码的氨基酸序列SEQ ID NO:66的第一多肽链,具有由核苷酸序列SEQ ID

NO:87编码的氨基酸序列SEQ ID NO:67的第二多肽链,和具有由核苷酸序列SEQ ID NO:91编码的氨基酸序列SEQ ID NO:90的第三多肽链)。

[0476] 将所述ASC在用表达人Her2的B16黑素瘤细胞系(B16D5-Her2,Surana等,CANCER IMMUNOL RES,2(11):1103-1112)注射的小鼠同基因肿瘤模型中进行测试。将6-8周龄的雌性C57BL/6小鼠在右下胁区域中用B16D5-Her2肿瘤细胞($5x10^5$)皮下接种。当肿瘤达到50至100mm^3时,将小鼠随机分派到3个组。治疗组描述在表33中,并注明了随机分组后的给药时间表。从BioXcell获得的抗小鼠PD1抗体(RMP1-14,目录号665418F1)和从BioXcell获得的抗小鼠CTLA4抗体(9D9,目录号BE0164)被组合使用。

[0477] 表33

[0478]

组	动物数	治疗	剂量(mg/kg)	给药体积(μL/g)	途径	时间表(天)
1	6	Janus	NA	10	i.p.	0,3,7,10
2	6	曲妥珠单抗	10	10	i.p.	0,3,7,10
3	6	抗小鼠 CTLA4 抗体	10	10	i.p.	0,3,7,10
		抗小鼠 PD1 抗体	10	10	i.p.	0,3,7,10

[0479] 所述B16黑素瘤小鼠模型被认为是一种难以使用免疫肿瘤学方法治疗的肿瘤模型。将Janus与抗小鼠PD1抗体和抗小鼠CTLA4抗体的组合进行比较。结果示出在图20中。与抗小鼠CTLA4抗体组合的抗小鼠PD1抗体对B16D5-Her2肿瘤生长具有影响,但这种组合在被治疗的动物中也表现出显著的体重减轻。作为比较,Janus表现出更鲁棒的抗肿瘤活性并且没有显著的体重减轻。单独的曲妥珠单抗在这种模型中表现出边缘活性。

[0480] 实施例10

[0481] 本实施例描述了含有人唾液酸酶的抗体-唾液酸酶偶联物(ASC)的体内给药。

[0482] 在本实施例中,制造并测试了如实施例3中所述的包含具有M1D、V6Y、P62G、A93E、I187K和C332A替换的Neu2和曲妥珠单抗的Janus曲妥珠单抗(包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:86编码的氨基酸序列SEQ ID NO:66的第一多肽链,具有由核苷酸序列SEQ ID NO:87编码的氨基酸序列SEQ ID NO:67的第二多肽链,和具有由核苷酸序列SEQ ID NO:88编码的氨基酸序列SEQ ID NO:68的第三多肽链)。

[0483] 在用稳定表达人HER2的鼠类乳腺癌细胞系(EMT6-HER2)注射的小鼠同基因肿瘤模型中,将Janus曲妥珠单抗与同种型对照抗体进行比较。将6-8周龄的雌性BALB/c小鼠在右下胁区域中用EMT6-HER2肿瘤细胞($5x10^5$)皮下接种。当肿瘤达到50-100mm^3,平均值为~75-100mm^3时,将小鼠随机分派到8只动物的组中。

[0484] 小鼠通过10mg/kg的腹膜内注射进行治疗,并记录肿瘤体积(mm^3)。图21示出了接受Janus曲妥珠单抗或对照治疗的小鼠的个体肿瘤生长。在这个实验中,在用Janus曲妥珠单抗治疗后观察到显著的肿瘤生长延迟。

[0485] 通过引用并入

[0486] 本文中提到的每个专利和科学文献的全部内容为所有目的通过引用并入本文。此外,2019年7月3日提交的美国临时专利申请号62/870,354、2020年1月3日提交的美国临时专利申请号62/956,957、2020年7月3日提交的国际(PCT)专利申请号PCT/US20/40815、2019年7月3日提交的美国临时专利申请号62/870,348、2020年1月3日提交的美国临时专利申请

号62/956,977、2020年7月3日提交的国际(PCT)专利申请号PCT/US20/40814、2019年7月3日提交的美国临时专利申请号62/870,341、2020年1月3日提交的美国临时专利申请号62/957,041和2020年7月3日提交的国际(PCT)专利申请号PCT/US20/40816中的每一者的全部公开内容,为所有目的通过参考并入本文。

[0487] 等同性

[0488] 本发明可以以其他特定方式体现,而不背离其精神或本质特征。因此,上述实施方式在所有情况下应该被当作是说明性的,而不是对本文描述的发明的限制。因此,本发明的范围由随附的权利要求书而不是由上述描述指明,并打算将在权利要求书的等同性意义和范围之内的所有变化涵盖在其中。

[0489] 序列表

[0490] SEQ ID NO:1:

[0491] MASLPVLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPIQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHSWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYLPQ

[0492] SEQ ID NO:2:

[0493] MEDLRPMATCPVLQKETLFRTGVHAYRIPALLYLKKQKTLLAFAEKRASKTDEHAELIVLRRGSYNEATNRVKWQPEEVVTQAQLEGHRSMNPCPLYDKQTKTLFLFFIAVPGRVSEHHQLHTKVNVTRLCCVSSTDHGRTWSPIQDLTETTIGSTHQEWATFAVGPGHCLQLRNPAGSLLVPAYAYRKLHPAQKPTPFAFCFISLDHGHTWKLGNFVAENSLECQVAEVGTGAQRMVYLNARSFLGARVQAQSPNDGLDFQDNRVVSKLVEPPHGCHGSVVAFHNPISKPHALDTWLLYTHPTDSRNRTNLGVYLNQMPLDPTAWSEPTLLAMGICAYSDLQNMGQGPDGSPQFGCLYESGNYEEIIFLIFTLKQAFPTVFDAQ

[0494] SEQ ID NO:3:

[0495] EDLRP

[0496] SEQ ID NO:4:

[0497] MEDLRP

[0498] SEQ ID NO:5:

[0499] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0500] SEQ ID NO:6:

[0501] ACAGTGGAAAAGTCCGTGGTGTTCAAGGCCGAGGGCGAGCACTTCACCGACCAGAAAGGCAATACCATCGTCGGCTCTGGCAGCGGCGGCACCACCAAGTACTTTAGAATCCCCGCCATGTGCACCACCAGCAAGGGCACCATTGTGGTGTTCGCCGACGCCAGACACAACACCGCCAGCGATCAGAGCTTCATCGATACCGCTGCCGCCAGATCTACCGATGGCGGCAAGACCTGGAACAAGAAGATCGCCATCTACAACGACCGCGTGAACAGCAAGCTGAGCAGAGTGATGGACCCTACCTGCATCGTGGCCAACATCCAGGGCAGAGAAACCATCCTGGTCATGGTCGGAAAGTGGAACAACAACGATAAGAC

CTGGGGCGCCTACAGAGACAAGGCCCCTGATACCGATTGGGACCTCGTGCTGTACAAGAGCACCGATGACGGCGTGA
CCTTCAGCAAGGTGGAAACAAACATCCACGACATCGTGACCAAGAACGGCACCATCTCTGCCATGCTCGGCGGCGTT
GGATCTGGCCTGCAACTGAATGATGGCAAGCTGGTGTTCCCCGTGCAGATGGTCCGAACAAAGAATATCACCACCGT
GCTGAATACCAGCTTCATCTACAGCACCGACGGCATCACATGGTCCCTGCCTAGCGGCTACTGTGAAGGCTTTGGCA
GCGAGAACAACATCATCGAGTTCAACGCCAGCCTGGTCAACAACATCCGGAACAGCGGCCTGCGGAGAAGCTTCGAG
ACAAAGGACTTCGGAAAGACGTGGACCGAGTTTCCTCCAATGGACAAGAAGGTGGACAACCGGAACCACGGCGTGCA
GGGCAGCACAATCACAATCCCTAGCGGCAACAAACTGGTGGCCGCTCACTCTAGCGCCCAGAACAAGAACAACGACT
ACACCAGAAGCGACATCAGCCTGTACGCCCACAACCTGTACAGCGGCGAAGTGAAGCTGATCGACGACTTCTACCCC
AAAGTGGGCAATGCCAGCGGAGCCGGCTACAGCTGTCTGAGCTACCGGAAAAATGTGGACAAAGAAACCCTGTACGT
GGTGTACGAGGCCAACGGCAGCATCGAGTTTCAGGACCTGAGCAGACATCTGCCCGTGATCAAGAGCTACAAC

[0502] SEQ ID NO:7:

[0503] ENDFGLVQPLVTMEQLLWVSGRQIGSVDTFRIPLITATPRGTLLAFAEARKMSSSDEGAKFIALRRSMD
QGSTWSPTAFIVNDGDVPDGLNLGAVVSDVETGVVFLFYSLCAHKAGCQVASTMLVWSKDDGVSWSTPRNLSLDIGT
EVFAPGPGSGIQKQREPRKGRLIVCGHGTLERDGVFCLLSDDHGASWRYGSGVSGIPYGQPKQENDFNPDECQPYEL
PDGSVVINARNQNNYHCHCRIVLRSYDACDTLRPRDVTFDPELVDPVVAAGAVVTSSGIVFFSNPAHPEFRVNLTLR
WSFSNGTSWRKETVQLWPGPSGYSSLATLEGSMDGEEQAPQLYVLYEKGRNHYTESISVAKISV

[0504] SEQ ID NO:8:

[0505] MEEVTTCSFNSPLFRQEDDRGITYRIPALLYIPPTHTFLAFAEKRSTRRDEDALHLVLRRGLRIGQLVQ
WGPLKPLMEATLPGHRTMNPCPVWEQKSGCVFLFFICVRGHVTERQQIVSGRNAARLCFIYSQDAGCSWSEVRDLTE
EVIGSELKHWATFAVGPGHGIQLQSGRLVIPAYTYYIPSWFFCFQLPCKTRPHSLMIYSDDLGVTWHHGRLIRPMVT
VECEVAEVTGRAGHPVLYCSARTPNRCRAEALSTDHGEGFQRLALSRQLCEPPHGCQGSVVSFRPLEIPHRCQDSSS
KDAPTIQQSSPGSSLRLEEEAGTPSESWLLYSHPTSRKQRVDLGIYLNQTPLEAACWSRPWILHCGPCGYSDLAALE
EEGLFGCLFECGTKQECEQIAFRLFTHREILSHLQGDCTSPGRNPSQFKSN

[0506] SEQ ID NO:9:

[0507] MRPADLPPRPMEESPASSSAPTETEEPGSSAEVMEEVTTCSFNSPLFRQEDDRGITYRIPALLYIPPTH
TFLAFAEKRSTRRDEDALHLVLRRGLRIGQLVQWGPLKPLMEATLPGHRTMNPCPVWEQKSGCVFLFFICVRGHVTE
RQQIVSGRNAARLCFIYSQDAGCSWSEVRDLTEEVIGSELKHWATFAVGPGHGIQLQSGRLVIPAYTYYIPSWFFCF
QLPCKTRPHSLMIYSDDLGVTWHHGRLIRPMVTVECEVAEVTGRAGHPVLYCSARTPNRCRAEALSTDHGEGFQRLA
LSRQLCEPPHGCQGSVVSFRPLEIPHRCQDSSSKDAPTIQQSSPGSSLRLEEEAGTPSESWLLYSHPTSRKQRVDLG
IYLNQTPLEAACWSRPWILHCGPCGYSDLAALEEEGLFGCLFECGTKQECEQIAFRLFTHREILSHLQGDCTSPGRN
PSQFKSN

[0508] SEQ ID NO:10:

[0509] MGVPRTPSRTVLFERERTGLTYRVPSLLPVPPGPTLLAFVEQRLSPDDSHAHRLVLRRGTLAGGSVRWG
ALHVLGTAALAEHRSMNPCPVHDAGTGTVFLFFIAVLGHTPEAVQIATGRNAARLCCVASRDAGLSWGSARDLTEEA
IGGAVQDWATFAVGPGHGVQLPSGRLLVPAYTYRVDRRECFGKICRTSPHSFAFYSDDHGRTWRCGGLVPNLRSGEC
QLAAVDGGQAGSFLYCNARSPLGSRVQALSTDEGTSFLPAERVASLPETAWGCQGSIVGFPAPAPNRPRDDSWSVGP
GSPLQPPLLGPGVHEPPEEAAVDPRGGQVPGGPFSRLQPRGDGPRQPGPRPGVSGDVGSWTLALPMPFAAPPQSPTW
LLYSHPVGRRARLHMGIRLSQSPLDPRSWTEPWVIYEGPSGYSDLASIGPAPEGGLVFACLYESGARTSYDEISFCT
FSLREVLENVPASPKPPNLGDKPRGCCWPS

[0510] SEQ ID NO:11:

[0511] MMSSAAFPRWLSMGVPRTPSRTVLFERERTGLTYRVPSLLPVPPGPTLLAFVEQRLSPDDSHAHRLVLR
RGTLAGGSVRWGALHVLGTAALAEHRSMNPCPVHDAGTGTVFLFFIAVLGHTPEAVQIATGRNAARLCCVASRDAGL
SWGSARDLTEEAIGGAVQDWATFAVGPGHGVQLPSGRLLVPAYTYRVDRRECFGKICRTSPHSFAFYSDDHGRTWRC
GGLVPNLRSGECQLAAVDGGQAGSFLYCNARSPLGSRVQALSTDEGTSFLPAERVASLPETAWGCQGSIVGFPAPAP
NRPRDDSWSVGPGSPLQPPLLGPGVHEPPEEAAVDPRGGQVPGGPFSRLQPRGDGPRQPGPRPGVSGDVGSWTLALP
MPFAAPPQSPTWLLYSHPVGRRARLHMGIRLSQSPLDPRSWTEPWVIYEGPSGYSDLASIGPAPEGGLVFACLYESG
ARTSYDEISFCTFSLREVLENVPASPKPPNLGDKPRGCCWPS

[0512] SEQ ID NO:12:

[0513] MASLP

[0514] SEQ ID NO:13:

[0515] ASLP

[0516] SEQ ID NO:14:

[0517] TVEKSVVF

[0518] SEQ ID NO:15:

[0519] GDYDAPTHQVQW

[0520] SEQ ID NO:16:

[0521] SMDQGSTW

[0522] SEQ ID NO:17:

[0523] STDGGKTW

[0524] SEQ ID NO:18:

[0525] PRPPAPEA

[0526] SEQ ID NO:19:

[0527] QTPLEAAC

[0528] SEQ ID NO:20:

[0529] NPRPPAPEA

[0530] SEQ ID NO:21:

[0531] SQNDGES

[0532] SEQ ID NO:22:

[0533] LSHSLST

[0534] SEQ ID NO:23:

[0535] GAGAACGACTTTGGACTGGTGCAGCCTCTGGTCACCATGGAACAGCTGCTGTGGGTTTCCGGCAGACAG
ATCGGCAGCGTGGACACCTTCAGAATCCCTCTGATCACCGCCACACCTAGAGGCACCCTGCTGGCCTTTGCCGAGGC
CAGAAAGATGAGCAGCTCTGACGAGGGCGCCAAGTTTATTGCCCTGAGGCGGTCTATGGACCAGGGCTCTACATGGT
CCCCTACCGCCTTCATCGTGAACGATGGCGACGTGCCCGATGGCCTGAATCTGGGAGCTGTGGTGTCCGATGTGGAA
ACCGGCGTGGTGTTCCTGTTCTACAGCCTGTGTGCCCACAAGGCCGGTTGTCAGGTGGCCAGCACAATGCTCGTGTG
GTCCAAGGACGACGGCGTGTCCTGGTCTACCCCTAGAAACCTGAGCCTGGACATCGGCACCGAAGTGTTTGCTCCAG
GACCTGGCTCTGGCATCCAGAAGCAGAGAGAGCCCAGAAAGGGCAGACTGATCGTGTGTGGCCACGGCACCCTTGAG
AGAGATGGCGTTTTCTGCCTGCTGAGCGACGATCATGGCGCCTCTTGGAGATACGGCAGCGGAGTGTCTGGAATCCC

TTACGGCCAGCCTAAGCAAGAGAACGATTTCAACCCCGACGAGTGCCAGCCTTACGAGCTGCCTGATGGCAGCGTCG
TGATCAACGCCCGGAACCAGAACAACTACCACTGCCACTGCCGGATCGTGCTGAGAAGCTACGACGCCTGCGATACC
CTGCGGCCTAGAGATGTGACCTTCGATCCTGAGCTGGTGGACCCTGTTGTTGCCGCTGGTGCCGTCGTGACATCTAG
CGGCATCGTGTTCTTCAGCAACCCTGCTCACCCCGAGTTCAGAGTGAATCTGACCCTGCGGTGGTCCTTCAGCAATG
GCACAAGCTGGCGGAAAGAAACCGTGCAGCTTTGGCCTGGACCTAGCGGCTACTCTTCTCTGGCTACACTGGAAGGC
AGCATGGACGGCGAAGAACAGGCCCCTCAGCTGTACGTGCTGTACGAGAAGGGCAGAAACCACTACACCGAGAGCAT
CAGCGTGGCCAAGATCAGCGTT

[0536] SEQ ID NO:24:

[0537] ATGGCCAGCCTGCCTGTGCTGCAGAAAGAAAGCGTGTTCCAGTCTGGCGCCCACGCCTACAGAATTCCC
GCTCTGCTGTATCTGCCAGGCCAGCAGTCTCTGCTGGCTTTCGCTGAACAGCGGGCCAGCAAGAAGGATGAGCACGC
CGAACTGATCGTGCTGCGGAGAGGCGATTACGACGCCCCTACACATCAGGTGCAGTGGCAGGCTCAAGAGGTGGTGG
CTCAGGCTAGACTGGACGGCCACAGATCTATGAACCCCTGTCCTCTGTACGATGCCCAGACCGGCACACTGTTTCTG
TTCTTTATCGCTATCCCCGGCCAAGTGACCGAGCAGCAGCAGCTGCAGACAAGAGCCAACGTGACCAGACTGTGTCA
AGTGACCTCCACCGACCACGGCAGAACCTGGTCTAGCCCTAGAGATCTGACCGACGCCGCCATCGGACCTGCCTATA
GAGAGTGGTCCACCTTCGCCGTTGGACCTGGACACTGTCTCCAGCTGCACGACAGGGCTAGATCTCTGGTGGTGCCT
GCCTACGCCTATAGAAAGCTGCACCCCATCCAGCGGCCTATTCCTAGCGCCTTCTGCTTTCTGAGCCACGATCACGG
CAGGACATGGGCCAGAGGACATTTCGTGGCCCAGGACACACTGGAATGCCAGGTGGCCGAAGTGGAAACCGGCGAGC
AGAGAGTCGTGACCCTGAACGCCAGATCTCACCTGAGAGCCAGAGTGCAGGCCCAGAGCACAAACGACGGCCTGGAT
TTCCAAGAGAGCCAGCTGGTCAAGAAACTGGTGGAACCTCCTCCACAGGGCTGTCAGGGAAGCGTGATCAGCTTTCC
ATCTCCTAGAAGCGGCCCTGGCTCTCCTGCTCAGTGGCTGCTGTATACACACCCCACACACAGCTGGCAGAGAGCCG
ATCTGGGCGCCTACCTGAATCCTAGACCTCCTGCTCCTGAGGCTTGGAGCGAACCTGTTCTGCTGGCCAAGGGCAGC
TGTGCCTACAGCGATCTGCAGTCTATGGGCACAGGCCCTGATGGCAGCCCTCTGTTTGGCTGTCTGTACGAGGCCAA
CGACTACGAAGAGATCGTGTTCCTGATGTTCACCCTGAAGCAGGCCTTTCCAGCCGAGTACCTGCCTCAA

[0538] SEQ ID NO:25:

[0539] ATGGAGGAAGTGACCACCTGTAGCTTCAACAGCCCTCTGTTCCGGCAAGAGGACGACCGGGGCATCACC
TACAGAATCCCTGCTCTGCTGTACATCCCTCCTACACACACCTTTCTGGCCTTCGCCGAGAAGCGGAGCACCAGACG
AGATGAAGATGCCCTGCACCTGGTGCTGAGAAGAGGCCTGAGAATCGGACAGCTGGTGCAGTGGGGACCTCTGAAGC
CTCTGATGGAAGCCACACTGCCCGGCCACAGAACCATGAATCCTTGTCCTGTGTGGGAGCAGAAAAGCGGCTGCGTG
TTCCTGTTCTTCATCTGCGTGCGGGGCCACGTGACCGAGAGACAGCAAATCGTGTCCGGCAGAAACGCCGCCAGACT
GTGCTTCATCTACAGCCAGGATGCCGGCTGCTCTTGGAGCGAAGTTCGGGATCTGACCGAAGAAGTGATCGGCAGCG
AGCTGAAGCACTGGGCCACATTTGCTGTTGGCCCTGGCCACGGAATCCAGCTGCAATCTGGCAGACTGGTCATCCCC
GCCTACACCTACTATATCCCCAGCTGGTTCTTCTGCTTCCAACTGCCTTGCAAGACCCGGCCTCACAGCCTGATGAT
CTACAGCGACGATCTGGGCGTGACATGGCACCACGGCAGACTGATCAGACCCATGGTCACCGTGGAATGCGAGGTGG
CCGAAGTGACAGGCAGAGCTGGACACCCTGTGCTGTACTGCTCTGCCAGAACACCCAACCGGTGTAGAGCCGAGGCT
CTGTCTACAGATCACGGCGAGGGCTTTCAGAGACTGGCCCTCTCTAGACAGCTGTGCGAACCTCCTCATGGCTGTCA
GGGCAGCGTGGTGTCCTTCAGACCTCTGGAAATCCCTCACCGGTGCCAGGACAGCAGCTCTAAGGATGCCCCTACCA
TCCAGCAGTCTAGCCCTGGCAGCAGCCTGAGACTGGAAGAGGAAGCCGGAACACCTAGCGAGAGCTGGCTGCTGTAC
TCTCACCCCACCAGCAGAAAGCAGAGAGTGGACCTGGGCATCTACCTGAATCAGACCCCTCTGGAAGCCGCCTGTTG
GAGCAGACCTTGGATTCTGCACTGTGGCCCTTGCGGCTACTCTGATCTGGCCGCTCTGGAAGAAGAGGGCCTGTTCG

GCTGCCTGTTTGAGTGCGGCACAAAGCAAGAGTGCGAGCAGATCGCCTTCCGGCTGTTCACCCACAGAGAGATCCTG
AGCCATCTGCAGGGCGACTGCACAAGCCCAGGCAGAAATCCCAGCCAGTTCAAGAGCAAC

[0540] SEQ ID NO:26:

[0541] ATGGGCGTGCCCAGAACACCCAGCAGAACCGTGCTGTTCGAGAGAGAGAGGACCGGCCTGACCTACAGA
GTGCCTTCTCTGCTGCCTGTGCCTCCTGGACCTACACTGCTGGCCTTCGTGGAACAGAGACTGAGCCCCGATGATTC
TCACGCCCACAGACTGGTGCTGAGAAGAGGAACACTGGCTGGCGGCTCTGTTAGATGGGGAGCACTGCATGTGCTGG
GCACAGCTGCTCTTGCCGAGCACAGATCCATGAATCCCTGTCCTGTGCACGACGCCGGAACCGGCACAGTGTTTCTG
TTCTTTATCGCCGTGCTGGGCCACACACCTGAGGCCGTTCAAATTGCCACCGGCAGAAATGCCGCCAGACTGTGTTG
TGTGGCCTCCAGAGATGCCGGCCTGTCTTGGGGATCTGCCAGAGATCTGACCGAGGAAGCCATTGGCGGAGCCGTTC
AGGATTGGGCCACATTTGCTGTTGGACCTGGACACGGCGTGCAGCTGCCAAGTGGTAGACTGCTGGTGCCTGCCTAC
ACATACAGAGTGGATCGGAGAGAGTGCTTCGGAAAGATCTGCCGGACAAGCCCTCACAGCTTCGCCTTCTACTCCGA
CGATCACGGCCGGACTTGGAGATGTGGTGGCCTGGTGCCTAATCTGAGAAGCGGCGAATGTCAACTGGCCGCCGTTG
ATGGTGGACAGGCTGGCAGCTTCCTGTACTGCAACGCCAGATCTCCTCTGGGCTCTAGAGTGCAGGCCCTGTCTACC
GATGAGGGCACCAGTTTTCTGCCCGCCGAAAGAGTTGCCTCTCTGCCTGAAACAGCCTGGGGCTGTCAGGGCTCTAT
CGTGGGATTTCCTGCTCCTGCTCCAAACAGACCCCGGGACGATTCTTGGAGTGTCGGCCCTGGATCTCCACTGCAGC
CTCCATTGCTTGGACCAGGCGTTCACGAGCCACCTGAAGAGGCTGCCGTTGATCCTAGAGGCGGACAAGTTCCTGGC
GGCCCTTTTAGCAGACTGCAGCCAAGAGGCGACGGCCCTAGACAACCTGGACCAAGACCTGGCGTCAGCGGAGATGT
TGGCTCTTGGACACTGGCCCTGCCTATGCCTTTTGCCGCTCCTCCTCAGTCTCCTACCTGGCTGCTGTACTCTCACC
CTGTTGGCAGACGGGCCAGACTGCACATGGGCATCAGACTGTCTCAGAGCCCTCTGGACCCCAGAAGCTGGACAGAG
CCTTGGGTCATCTATGAGGGCCCTAGCGGCTACAGCGATCTGGCCTCTATTGGCCCAGCTCCTGAAGGCGGACTGGT
GTTCGCTTGTCTGTATGAGAGCGGCGCCAGAACCAGCTACGACGAGATCAGCTTCTGCACCTTCAGCCTGCGCGAGG
TGCTGGAAAATGTGCCCGCCTCTCCTAAGCCTCCTAACCTGGGCGATAAGCCTAGAGGCTGTTGCTGGCCATCT

[0542] SEQ ID NO:27:

[0543] MTGERPSTALPDRRWGPRILGFWGGCRVWVFAAIFLLLSLAASWSKA

[0544] SEQ ID NO:28:

[0545] MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC

[0546] SEQ ID NO:29:

[0547] YGTL

[0548] SEQ ID NO:30:

[0549] MTVEKSVVFKAEGEHFTDQKGNTIVGSGSGGTTKYFRIPAMCTTSKGTIVVFADARHNTASDQSFIDTA
AARSTDGGKTWNKKIAIYNDRVNSKLSRVMDPTCIVANIQGRETILVMVGKWNNNDKTWGAYRDKAPDTDWDLVLYK
STDDGVTFSKVETNIHDIVTKNGTISAMLGGVGSGLQLNDGKLVFPVQMVRTKNITTVLNTSFIYSTDGITWSLPSG
YCEGFGSENNIIEFNASLVNNIRNSGLRRSFETKDFGKTWTEFPPMDKKVDNRNHGVQGSTITIPSGNKLVAAHSSA
QNKNNDYTRSDISLYAHNLYSGEVKLIDDFYPKVGNASGAGYSCLSYRKNVDKETLYVVYEANGSIEFQDLSRHLPV
IKSYN

[0550] SEQ ID NO:31:

[0551] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSPGK

[0552] SEQ ID NO:32:

[0553] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

[0554] SEQ ID NO:33:

[0555] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0556] SEQ ID NO:34:

[0557] ATGAGACCTGCGGACCTGCCCCCGCGCCCCATGGAAGAATCCCCGGCGTCCAGCTCTGCCCCGACAGAG ACGGAGGAGCCGGGGTCCAGTGCAGAGGTCATGGAAGAAGTGACAACATGCTCCTTCAACAGCCCTCTGTTCCGGCA GGAAGATGACAGAGGGATTACCTACCGGATCCCAGCCCTGCTCTACATACCCCCCACCCACACCTTCCTGGCCTTTG CAGAGAAGCGTTCTACGAGGAGAGATGAGGATGCTCTCCACCTGGTGCTGAGGCGAGGGTTGAGGATTGGGCAGTTG GTACAGTGGGGGCCCCTGAAGCCACTGATGGAAGCCACACTACCGGGGCATCGGACCATGAACCCCTGTCCTGTATG GGAGCAGAAGAGTGGTTGTGTGTTCCTGTTCTTCATCTGTGTGCGGGGCCATGTCACAGAGCGTCAACAGATTGTGT CAGGCAGGAATGCTGCCCGCCTTTGCTTCATCTACAGTCAGGATGCTGGATGTTCATGGAGTGAGGTGAGGGACTTG ACTGAGGAGGTCATTGGCTCAGAGCTGAAGCACTGGGCCACATTTGCTGTGGGCCCAGGTCATGGCATCCAGCTGCA GTCAGGGAGACTGGTCATCCCTGCGTATACCTACTACATCCCTTCCTGGTTCTTTTGCTTCCAGCTACCATGTAAAA CCAGGCCTCATTCTCTGATGATCTACAGTGATGACCTAGGGGTCACATGGCACCATGGTAGACTCATTAGGCCCATG GTTACAGTAGAATGTGAAGTGGCAGAGGTGACTGGGAGGGCTGGCCACCCTGTGCTATATTGCAGTGCCCGGACACC AAACAGGTGCCGGGCAGAGGCGCTCAGCACTGACCATGGTGAAGGCTTTCAGAGACTGGCCCTGAGTCGACAGCTCT GTGAGCCCCCACATGGTTGCCAAGGGAGTGTGGTAAGTTTCCGGCCCCTGGAGATCCCACATAGGTGCCAGGACTCT AGCAGCAAAGATGCACCCACCATTCAGCAGAGCTCTCCAGGCAGTTCACTGAGGCTGGAGGAGGAAGCTGGAACACC GTCAGAATCATGGCTCTTGTACTCACACCCAACCAGTAGGAAACAGAGGGTTGACCTAGGTATCTATCTCAACCAGA CCCCCTTGGAGGCTGCCTGCTGGTCCCGCCCCTGGATCTTGCACTGTGGGCCCTGTGGCTACTCTGATCTGGCTGCT CTGGAGGAGGAGGGCTTGTTTGGGTGTTTGTTTGAATGTGGGACCAAGCAAGAGTGTGAGCAGATTGCCTTCCGCCT GTTTACACACCGGGAGATCCTGAGTCACCTGCAGGGGGACTGCACCAGCCCTGGTAGGAACCCAAGCCAATTCAAAA GCAAT

[0558] SEQ ID NO:35:

[0559] ATGATGAGCTCTGCAGCCTTCCCAAGGTGGCTGAGCATGGGGGTCCCTCGTACCCCTTCACGGACAGTG CTCTTCGAGCGGGAGAGGACGGGCCTGACCTACCGCGTGCCCTCGCTGCTCCCCGTGCCCCCCGGGCCCACCCTGCT GGCCTTTGTGGAGCAGCGGCTCAGCCCTGACGACTCCCACGCCCACCGCCTGGTGCTGAGGAGGGGCACGCTGGCCG GGGGCTCCGTGCGGTGGGGTGCCCTGCACGTGCTGGGGACAGCAGCCCTGGCGGAGCACCGGTCCATGAACCCCTGC CCTGTGCACGATGCTGGCACGGGCACCGTCTTCCTCTTCTTCATCGCGGTGCTGGGCCACACGCCTGAGGCCGTGCA GATCGCCACGGGAAGGAACGCCGCGCGCCTCTGCTGTGTGGCCAGCCGTGACGCCGGCCTCTCGTGGGGCAGCGCCC GGGACCTCACCGAGGAGGCCATCGGTGGTGCCGTGCAGGACTGGGCCACATTCGCTGTGGGTCCCGGCCACGGTGTG

CAGCTGCCCTCAGGCCGCCTGCTGGTACCCGCCTACACCTACCGCGTGGACCGCCGAGAGTGTTTTGGCAAGATCTG
CCGGACCAGCCCTCACTCCTTCGCCTTCTACAGCGATGACCACGGCCGCACCTGGCGCTGTGGAGGCCTCGTGCCCA
ACCTGCGCTCAGGCGAGTGCCAGCTGGCAGCGGTGGACGGTGGGCAGGCCGGCAGCTTCCTCTACTGCAATGCCCGG
AGCCCACTGGGCAGCCGTGTGCAGGCGCTCAGCACTGACGAGGGCACCTCCTTCCTGCCCGCAGAGCGCGTGGCTTC
CCTGCCCGAGACTGCCTGGGGCTGCCAGGGCAGCATCGTGGGCTTCCCAGCCCCCGCCCCCAACAGGCCACGGGATG
ACAGTTGGTCAGTGGGCCCCGGGAGTCCCCTCCAGCCTCCACTCCTCGGTCCTGGAGTCCACGAACCCCCAGAGGAG
GCTGCTGTAGACCCCCGTGGAGGCCAGGTGCCTGGTGGGCCCTTCAGCCGTCTGCAGCCTCGGGGGGATGGCCCCAG
GCAGCCTGGCCCCAGGCCTGGGGTCAGTGGGGATGTGGGGTCCTGGACCCTGGCACTCCCCATGCCCTTTGCTGCCC
CGCCCCAGAGCCCCACGTGGCTGCTGTACTCCCACCCAGTGGGGCGCAGGGCTCGGCTACACATGGGTATCCGCCTG
AGCCAGTCCCCGCTGGACCCGCGCAGCTGGACAGAGCCCTGGGTGATCTACGAGGGCCCCAGCGGCTACTCCGACCT
GGCGTCCATCGGGCCGGCCCCTGAGGGGGGCCTGGTTTTTGCCTGCCTGTACGAGAGCGGGGCCAGGACCTCCTATG
ATGAGATTTCCTTTTGTACATTCTCCCTGCGTGAGGTCCTGGAGAACGTGCCCGCCAGCCCCAAACCGCCCAACCTT
GGGGACAAGCCTCGGGGGTGCTGCTGGCCCTCC

[0560] SEQ ID NO:36:

[0561] MRFKNVKKTALMLAMFGMATSSNAALFDYNATGDTEFDSPAKQGWMQDNTNNGSGVLTNADGMPAWLVQ
GIGGRAQWTYSLSTNQHAQASSFGWRMTTEMKVLSGGMITNYYANGTQRVLPIISLDSSGNLVVEFEGQTGRTVLAT
GTAATEYHKFELVFLPGSNPSASFYFDGKLIRDNIQPTASKQNMIVWGNGSSNTDGVAAYRDIKFEIQGDVIFRGPD
RIPSIVASSVTPGVVTAFAEKRVGGGDPGALSNTNDIITRTSRDGGITWDTELNLTEQINVSDEFDFSDPRPIYDPS
SNTVLVSYARWPTDAAQNGDRIKPWMPNGIFYSVYDVASGNWQAPIDVTDQVKERSFQIAGWGGSELYRRNTSLNSQ
QDWQSNAKIRIVDGAANQIQVADGSRKYVVTLSIDESGGLVANLNGVSAPIILQSEHAKVHSFHDYELQYSALNHTT
TLFVDGQQITTWAGEVSQENNIQFGNADAQIDGRLHVQKIVLTQQGHNLVEFDAFYLAQQTPEVEKDLEKLGWTKIK
TGNTMSLYGNASVNPGPGHGITLTRQQNISGSQNGRLIYPAIVLDRFFLNVMSIYSDDGGSNWQTGSTLPIPFRWKS
SSILETLEPSEADMVELQNGDLLLTARLDFNQIVNGVNYSPRQQFLSKDGGITWSLLEANNANVFSNISTGTVDASI
TRFEQSDGSHFLLFTNPQGNPAGTNGRQNLGLWFSFDEGVTWKGPIQLVNGASAYSDIYQLDSENAIVIVETDNSNM
RILRMPITLLKQKLTLSQN

[0562] SEQ ID NO:37:

[0563] TTGTCAATCAAGATGACTTCACAACGAAGAAGAGCATCGATTCACAAGGAAACAGATTCTAATATAAAG
GGAGTAGATATGCGTTTCAAAAACGTAAAGAAAACCGCTTTAATGCTTGCAATGTTCGGTATGGCGACAAGCTCAAA
CGCCGCACTTTTTGACTATAACGCAACGGGTGACACTGAGTTTGACAGTCCAGCCAAACAGGGATGGATGCAAGACA
ACACGAATAATGGCAGCGGCGTTTTAACCAATGCAGATGGAATGCCCGCTTGGTTGGTGCAAGGTATTGGAGGGAGA
GCTCAATGGACATATTCTCTCTCTACTAATCAACATGCCCAAGCATCAAGTTTCGGTTGGCGAATGACGACAGAAAT
GAAAGTGCTCAGTGGTGGAATGATCACAAACTACTACGCCAACGGCACTCAGCGTGTCTTACCCATCATTTCATTAG
ATAGCAGTGGTAACTTAGTTGTTGAGTTTGAAGGGCAAACTGGACGCACCGTTTTGGCAACCGGCACAGCAGCAACG
GAATATCATAAATTTGAATTGGTATTCCTTCCTGGAAGTAACCCATCCGCTAGCTTTTACTTCGATGGCAAACTCAT
TCGTGACAACATCCAGCCGACTGCATCAAAACAAAATATGATCGTATGGGGGAATGGCTCATCAAATACGGATGGTG
TCGCCGCTTATCGTGATATTAAGTTTGAAATTCAAGGCGACGTCATCTTCAGAGGCCCAGACCGTATACCGTCCATT
GTAGCAAGTAGCGTAACACCAGGGGTGGTAACCGCATTTGCAGAGAAACGTGTGGGGGGAGGAGATCCCGGTGCTCT
GAGTAATACCAATGACATAATCACTCGTACCTCACGAGATGGCGGTATAACTTGGGATACCGAGCTCAACCTCACTG
AGCAAATCAATGTCAGTGATGAGTTTGATTTCTCCGATCCTCGGCCTATCTATGATCCTTCCTCCAATACGGTTCTT

GTCTCTTATGCTCGATGGCCGACCGATGCCGCTCAAAACGGAGATCGAATAAAACCATGGATGCCAAACGGTATTTT
TTACAGCGTCTATGATGTTGCATCAGGGAACTGGCAAGCGCCTATCGATGTTACCGATCAGGTGAAAGAACGCAGTT
TCCAAATCGCTGGTTGGGGTGGTTCAGAGCTGTATCGCCGAAATACCAGCCTAAATAGCCAGCAAGACTGGCAATCA
AACGCTAAGATCCGAATTGTTGATGGTGCAGCGAACCAGATACAAGTTGCCGATGGTAGCCGAAAATATGTTGTCAC
ACTGAGTATTGATGAATCAGGTGGTCTAGTCGCTAATCTAAACGGTGTTAGTGCTCCGATTATCCTGCAATCTGAAC
ACGCAAAGGTACACTCTTTCCATGACTACGAACTTCAATATTCGGCGTTAAACCACACCACAACGTTATTCGTGGAT
GGTCAGCAAATCACAACTTGGGCTGGCGAAGTATCGCAGGAGAACAACATTCAGTTTGGTAATGCGGATGCCCAAAT
TGACGGCAGACTGCATGTGCAAAAAATTGTTCTCACACAGCAAGGCCATAACCTCGTGGAGTTTGATGCTTTCTATT
TAGCACAGCAAACCCCTGAAGTAGAGAAAGACCTTGAAAAGCTTGGTTGGACAAAAATTAAAACGGGCAACACCATG
AGTTTGTATGGAAATGCCAGTGTCAACCCAGGACCGGGTCATGGCATCACCCTTACTCGACAACAAAATATCAGTGG
CAGCCAAAACGGCCGCTTGATCTACCCAGCGATTGTGCTTGATCGTTTCTTCTTGAACGTCATGTCTATTTACAGTG
ATGATGGCGGTTCAAACTGGCAAACCGGTTCAACACTCCCTATCCCCTTTCGCTGGAAGAGTTCGAGTATCCTAGAA
ACTCTCGAACCTAGTGAAGCTGATATGGTTGAACTCCAAAACGGTGATCTACTCCTTACTGCACGCCTTGATTTTAA
CCAAATCGTTAATGGTGTGAACTATAGCCCACGCCAGCAATTTTTGAGTAAAGATGGTGGAATCACGTGGAGCCTAC
TTGAGGCTAACAACGCTAACGTCTTTAGCAATATCAGTACTGGTACCGTTGATGCTTCTATTACTCGGTTCGAGCAA
AGTGACGGTAGCCATTTCTTACTCTTTACTAACCCACAAGGAAACCCTGCGGGGACAAATGGCAGGCAAAATCTAGG
CTTATGGTTTAGCTTCGATGAAGGGGTGACATGGAAAGGACCAATTCAACTTGTTAATGGTGCATCGGCATATTCTG
ATATTTATCAATTGGATTCGGAAAATGCGATTGTCATTGTTGAAACGGATAATTCAAATATGCGAATTCTTCGTATG
CCTATCACATTGCTAAAACAGAAGCTGACCTTATCGCAAAACTAA

[0564] SEQ ID NO:38:

[0565] MVGADPTRPRGPLSYWAGRRGQGLAAIFLLLVSAAESEARAEDDFSLVQPLVTMEQLLWVSGKQIGSVD
TFRIPLITATPRGTLLAFAEARKKSASDEGAKFIAMRRSTDQGSTWSSTAFIVDDGEASDGLNLGAVVNDVDTGIVF
LIYTLCAHKVNCQVASTMLVWSKDDGISWSPPRNLSVDIGTEMFAPGPGSGIQKQREPGKGRLIVCGHGTLERDGVF
CLLSDDHGASWHYGTGVSGIPFGQPKHDHDFNPDECQPYELPDGSVIINARNQNNYHCRCRIVLRSYDACDTLRPRD
VTFDPELVDPVVAAGALATSSGIVFFSNPAHPEFRVNLTLRWSFSNGTSWLKERVQVWPGPSGYSSLTALENSTDGK
KQPPQLFVLYEKGLNRYTESISMVKISVYGTL

[0566] SEQ ID NO:39:

[0567] MTVQPSPWFSDLRPMATCPVLQKETLFRTGVHAYRIPALLYLKKQKTLLAFAEKRASKTDEHAELIVLR
RGSYNEATNRVKWQPEEVVTQAQLEGHRSMNPCPLYDKQTKTLFLFFIAVPGRVSEHHQLHTKVNVTRLCCVSSTDH
GRTWSPIQDLTETTIGSTHQEWATFAVGPGHCLQLRNPAGSLLVPAYAYRKLHPAQKPTPFAFCFISLDHGHTWKLG
NFVAENSLECQVAEVGTGAQRMVYLNARSFLGARVQAQSPNDGLDFQDNRVVSKLVEPPHGCHGSVVAFHNPISKPH
ALDTWLLYTHPTDSRNRTNLGVYLNQMPLDPTAWSEPTLLAMGICAYSDLQNMGQGPDGSPQFGCLYESGNYEEIIF
LIFTLKQAFPTVFDAQ

[0568] SEQ ID NO:40:

[0569] MEEVPPYSLSSTLFQQEEQSGVTYRIPALLYLPPTHTFLAFAEKRTSVRDEDAACLVLRRGLMKGRSVQ
WGPQRLLMEATLPGHRTMNPCPVWEKNTGRVYLFFICVRGHVTERCQIVWGKNAARLCFLCSEDAGCSWGEVKDLTE
EVIGSEVKRWATFAVGPGHGIQLHSGRLIIPAYAYYVSRWFLCFACSVKPHSLMIYSDDFGVTWHHGKFIEPQVTGE
CQVAEVAGTAGNPVLYCSARTPSRFRAEAFSTDSGGCFQKPTLNPQLHEPRTGCQGSVVSFRPLKMPNTYQDSIGKG
APATQKCPLLDSPLEVEKGAETPSATWLLYSHPTSKRKRINLGIYYNRNPLEVNCWSRPWILNRGPSGYSDLAVVEE

QDLVACLFECGEKNEYERIDFCLFSDHEVLSCEDCTSPSSD

[0570] SEQ ID NO:41:

[0571] METAGAPFCFHVDSLVPCSYWKVMGPTRVPRRTVLFQRERTGLTYRVPALLCVPPRPTLLAFAEQRLSP
DDSHAHRLVLRRGTLTRGSVRWGTLSVLETAVLEEHRSMNPCPVLDEHSGTIFLFFIAVLGHTPEAVQIATGKNAAR
LCCVTSCDAGLTWGSVRDLTEEAIGAALQDWATFAVGPGHGVQLRSGRLLVPAYTYHVDRRECFGKICWTSPHSLAF
YSDDHGISWHCGGLVPNLRSGECQLAAVDGDFLYCNARSPLGNRVQALSADEGTSFLPGELVPTLAETARGCQGSIV
GFLAPPSIEPQDDRWTGSPRNTPHSPCFNLRVQESSGEGARGLLERWMPRLPLCYPQSRSPENHGLEPGSDGDKTSW
TPECPMSSDSMLQSPTWLLYSHPAGRRARLHMGIYLSRSPLDPHSWTEPWVIYEGPSGYSDLAFLGPMPGASLVFAC
LFESGTRTSYEDISFCLFSLADVLENVPTGLEMLSLRDKAQGHCWPS

[0572] SEQ ID NO:42:

[0573] GGGTCACATGCTGATGGACTAATTGGAGTCGCGGCAGCGCGGGCTGCGGCCCCCAAGGGGAGGGGTCGG
AGTGACGTGCGCGCTTTTAAAGGGCCGAGGTCAGCTGACGGCTTGCCACCGGTGACCAGTTCCTGGACAGGGATCGC
CGGGAGCTATGGTGGGGGCAGACCCGACCAGACCCCGGGGACCGCTGAGCTATTGGGCGGGCCGTCGGGGTCAGGGG
CTCGCAGCGATCTTCCTGCTCCTGGTGTCCGCGGCGGAATCCGAGGCCAGGGCAGAGGATGACTTCAGCCTGGTGCA
GCCGCTGGTGACCATGGAGCAGCTGCTGTGGGTGAGCGGGAAGCAGATCGGCTCTGTAGACACTTTCCGCATCCCGC
TCATCACAGCCACCCCTCGGGGCACGCTCCTGGCCTTCGCTGAGGCCAGGAAAAAATCTGCATCCGATGAGGGGGCC
AAGTTCATCGCCATGAGGAGGTCCACGGACCAGGGTAGCACGTGGTCCTCTACAGCCTTCATCGTAGACGATGGGGA
GGCCTCCGATGGCCTGAACCTGGGCGCTGTGGTGAACGATGTAGACACAGGGATAGTGTTCCTTATCTATACCCTCT
GTGCTCACAAGGTCAACTGCCAGGTGGCCTCTACCATGTTGGTTTGGAGTAAGGACGACGGCATTTCCTGGAGCCCA
CCCCGGAATCTCTCTGTGGATATTGGCACAGAGATGTTTGCCCCTGGACCTGGCTCAGGCATTCAGAAACAGCGGGA
GCCTGGGAAGGGCCGGCTCATTGTGTGTGGACACGGGACGCTGGAGCGAGATGGGGTCTTCTGTCTCCTCAGTGATG
ACCACGGTGCCTCCTGGCACTACGGCACTGGAGTGAGCGGCATTCCCTTTGGCCAGCCCAAACACGATCACGATTTC
AACCCCGACGAGTGCCAGCCCTACGAGCTTCCAGATGGCTCGGTCATCATCAACGCCCGGAACCAGAATAACTACCA
TTGCCGCTGCAGGATCGTCCTCCGCAGCTATGACGCCTGTGACACCCTCAGGCCCCGGGATGTGACCTTCGACCCTG
AGCTCGTGGACCCTGTGGTAGCTGCAGGAGCACTAGCCACCAGCTCCGGCATTGTCTTCTTCTCCAATCCAGCCCAC
CCTGAGTTCCGAGTGAACCTGACCCTGCGCTGGAGTTTCAGCAATGGTACATCCTGGCAGAAGGAGAGGGTCCAGGT
GTGGCCGGGACCCAGCGGCTACTCGTCCCTGACAGCCCTGGAAAACAGCACGGATGGAAAGAAGCAGCCCCCGCAGC
TGTTCGTTCTGTACGAGAAAGGCCTGAACCGGTACACCGAGAGCATCTCCATGGTCAAAATCAGCGTCTACGGCACG
CTCTGAGCCCCGTGCCCAAAGGACACCAAGTCCTGGTCGCTGACTTCACAGCTCTCTGGACCATCTGCAGAGGGTGC
CTGAAACACAGCTCTTCCTCTGAACTCTGACCTTTTGCAACTTCTCATCAACAGGGAAGTCTCTTCGTTATGACTTA
ACACCCAGCTTCCTCTCGGGGCAGGAAGTCCCTCCGTCACCAAGAGCACTTTTTTCCAGTATGCTGGGGATGGCCCC
TGTCCATTCTCTTCCAGGACAACGGAGCTGTGCCTTTCTGGGACAGGATGGGGGAGGGGCTCCCCCTGGAGAGATGA
ACAGATACGAACTCAGGGAACTGAGAAGGCCCGGTGTCCTAGGGTACAAAGGCAGGTACTAGATGTGATTGCTGAAA
GTCCCCAGGGCAGAGTGTCCTTTCAGAGCAAGGATAAGCACACCTACGTGTGCACCTTTGATTATTTATGAATCGAA
ATATTTGTAACTTAAAATTTTTGATGCAGAAAAAGCGTTTGTGGAGTCTGTGGTTCTGTCTGCTCACGCCTTCCCAA
TTGCCTCCTGGAGAGACAGGAAGGCAGCTGGAAGAGGAGCCGATGTACTTACTGGGAAGCAGAAACCCCTAGATTCC
ATCCTGGCTGCTGCTGTTTGCAAGTGTCAAAGATGGGGGGGCGTGTTTATATTTTATATTTCTAAGATGGGGTGGCA
TAGGAAATAGGGAACAGATGTGTAAAACCAGATGGGAAGGACAGTCTGTGAGAAAGGAGCAAGCAGTTGCTGCAGGT
GTGGGAGAGCAAAGCCCTTCTCCACGTGGAAAGAGCCCAGATGGACGCTAAGCATGTTGGGCACCTGTAACCCCGCA

CTCGCTGGACTGACGGTGTAGCTCAGTGGTGGAGCTAGTACTTGGAACGCCTAAGACTCTGGGTTCAGTCCTTGGGG
GGGGGGGTATGTGTTTATTGAGAGGAAGGTGTACGTACTGTAGGTCAGAGGACAGCTTACTGGAGTTGTCTCTCTCC
TTCACGCTGTGAGTCCTGTGGAATGACCTCAGGTGTCAGAGTTGGGGGCAGGTGCCTTTGCCAGCTGAGCCATCTTG
CTGTCTCTGCTTTAATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAATATTAAGGTCTGAGGGATTCGGGCTGCGTTCATTTCAA
TTAGAGGGTCATATTTCTTTTGACATTTCTTCTCTAAGAAATGTTAAGATCATTTGTTCTGTGTGATAGAGGTATAG
CTCCATTGTATGTCAGCAGTGAGGGATCCTGTGCATTTTATCCAGAGTTTGTACGGTGTTCTAGGGGCTGCTAGTGC
AGCCCAGTGCTAAACACTTCAGCATGCACAAGGCCTCAATCAGTGCATGCATGTGCACACACACACAGACACACACG
TACACACTGACACAGGTACACAAATACACACTGGCCCACATGTACACATCGACTCACAGGTACACAGACCCACTTTG
ACACACATATACACAGACACAAACGCACTGGCACACACATATACACAGGCACACATGGATAGATGGACACACGTGTA
CACATACACACACACACAGAAATACAAATGTTCAGGTTTTCTAAAAAAAAAAAAAATTAGAGACGTGTTGACTTCATT
TTTAGCAAAAATCCTGTCATGTATCTTAAAGTGGATTGAACCCACTATGTAGCCCAGGCTGGCCTCCAAATGGGCAT
CCTTCTGCCTCAGTCTCCCGAGGGCTAGGATAACAGGAGTATGCCATCACACCTGGCTAATAGAAATTTTCAAAATT
GTTTGTTTGAAGGTGACTCTTACTATATTGCCTAACTGATCTCCAGTTCGTGAAATCCTCCTGCCTCAGAACCAGGA
CTGTCAATATAACCCACCAAGACAGGCCAACATTCACAATTGATTGTTAGTTTGTGGTCTGAATCAAGGTCTTATAC
TGTAGCCCAGGCTAGCCCGGAATACACGATATCTCCAGTGCTTCAGATCCTCAGTTCTAACTAAGCATGGCCACATC
CATGTTTAACTGCAAATTTGATGTTACCATGGTTTGGTTTGGTTTGGTTTGGTTTGGTTTGGTTTGGTTTTTT
TGGCCATTTTTTTTTTCTCATGCTGAGGCCTTGTGCTCTCAAGTTGGGGAGACAGCATGGAGGGTAGCTGCAACTGT
AACCCCAGTTCCAGGGGACCTGACACCCTCTGGCCTCCACAAGTATTAGGCACATCTGTGGTGCACAGACATACAAT
CAGGCAAAATATTCATACACATAAAATAAAATAATTTAAAACAAAAGCAAAAATCAGGACCTAAGAAAAAAATCTAT
TCCTGATTCTTTTATGTTTTGTTTGTATTTTATCAAGACAGGGTTGTTTCTCTGTATAGCCCTGGCTGTCTTGGAAT
TCACTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACTCAGAAATCCTCCTGCCTTTGCCTTCCAAGTGCTGGAATTAAAGGCAT
GCGCCACC

[0574] SEQ ID NO:43:

[0575] GACATGACCCAAACGGCCCCTGGCTGCAAGGTAATATCGGAAGTTGACTAAGAATGGACGCCCCACCAC
TGACTGACCCGCCCCCTGAGTCTGAGATTGGACTTGTCTCTGGATACAGTCATACTTTGAGGTACTACAAGTTAGAA
ACTGTTAGGTTACTCAGTTCAGTCCATGACAGTCCAACCTTCTCCATGGTTTTCCGATCTCAGGCCCATGGCGACCT
GCCCTGTCCTGCAGAAGGAGACACTGTTCCGCACAGGCGTCCATGCTTACAGAATCCCTGCTCTGCTCTACCTGAAG
AAGCAGAAGACCCTGCTGGCCTTTGCGGAAAAGCGAGCCAGCAAGACGGATGAGCACGCAGAGTTGATTGTCCTGAG
AAGAGGAAGCTACAACGAAGCCACCAACCGTGTCAAGTGGCAGCCTGAGGAAGTGGTGACCCAAGCCCAGCTGGAAG
GCCACCGCTCCATGAATCCATGTCCCTTGTATGACAAGCAAACAAAGACCCTCTTCCTTTTCTTCATCGCTGTCCCT
GGGCGTGTATCAGAACATCATCAGCTCCACACTAAGGTTAATGTCACACGGCTGTGCTGTGTCAGCAGCACTGACCA
TGGGAGGACCTGGAGCCCCATCCAGGACCTCACAGAGACCACCATTGGCAGCACTCATCAGGAATGGGCCACATTTG
CTGTGGGTCCTGGGCATTGTCTGCAGCTGCGGAACCCAGCTGGGAGCCTGCTGGTACCTGCTTATGCCTACCGGAAA
CTGCACCCTGCTCAGAAGCCTACCCCCTTTGCCTTCTGCTTCATCAGCCTTGACCATGGGCACACATGGAAACTAGG
CAACTTTGTGGCTGAAAACTCACTGGAGTGCCAGGTGGCTGAGGTTGGCACTGGAGCTCAGAGGATGGTATATCTCA
ATGCTAGGAGCTTCCTGGGAGCCAGGGTCCAGGCACAAAGTCCTAATGATGGTCTGGATTTCCAGGACAACCGGGTA
GTGAGTAAGCTTGTAGAGCCCCCCCACGGGTGTCATGGAAGTGTGGTTGCCTTCCACAACCCCATCTCTAAGCCACA
TGCCTTAGACACATGGCTTCTTTATACACACCCTACAGACTCCAGGAATAGAACCAACCTGGGTGTGTACCTAAACC
AGATGCCACTAGATCCCACAGCCTGGTCAGAGCCCACCCTGCTGGCCATGGGCATCTGTGCCTACTCAGACTTACAG

AACATGGGGCAAGGCCCTGATGGCTCCCCACAGTTTGGGTGTCTGTATGAATCAGGTAACTATGAAGAGATCATTTT
CCTCATATTCACCCTGAAGCAAGCTTTCCCCACTGTATTTGATGCCCAGTGATCTCAGTGCACGTGGCCCAAAGGGC
TTCCTTGTGCTTCAAAACACCCATCTCTCTTTGCTTCCAGCATCCTCTGGACTCTTGAGTCCAGCTCTTGGGTAACT
TCCTCAGGAGGATGCAGAGAATTTGGTCTCTTGACTCTCTGCAGGCCTTATTGTTTCAGCCTCTGGTTCTCTTTTCA
GCCCAGAAATCAAAGGAGCCTGGCTTTCCTCAGCCTGTTGGCAGGGCAGGTGGGGACAGTATATATAGAGGCTGCCA
TTCTGCATGTCGGTTGTCACTATGCTAGTTTAACCTGCCTGTTTCCCCATGCCTAGTGTTTGAATGAGTATTAATAA
AATATCCAACCCAGCCCATTTCTTCCTGGAAAAAAA

[0576] SEQ ID NO:44:

[0577] ACTGCGCGGTGAAGGGGCGTGGCCTGGCCGGGGAGGTTGACACCCAGACGCTGCTCTCAGTCCTCTGGC
GCCTGCTCCCCAGCGCATTCCTTCTGCTCCTGGGATATTTGTCTCATTACTGCCAGTTCTTGCGCAGCGGTCACTGG
GTTCGTTTCAGCGTCTGTGGTTTCTGTCGCTGTTATCCAGTCTCCATCGCCCCAGCTCAGCTTCAGGCCTTCTTCCG
AGACTCCACGGGAGAGCCCAGAGAGCCTCCGGAGCCGAAGCCATGGAGGAAGTCCCACCCTACTCCCTCAGCAGCAC
CCTGTTCCAGCAGGAAGAACAGAGTGGGGTGACCTACCGGATCCCAGCCCTGCTGTACCTTCCTCCCACCCACACCT
TCCTGGCCTTTGCAGAGAAGCGGACCTCAGTCAGAGATGAGGATGCTGCCTGCCTGGTGCTCAGACGAGGGCTGATG
AAGGGGCGCTCTGTACAGTGGGGCCCCCAACGGCTACTGATGGAGGCCACATTACCTGGGCATCGCACCATGAACCC
CTGCCCTGTGTGGGAGAAAAATACTGGCCGTGTGTACCTGTTTTTCATCTGTGTGCGGGGCCATGTTACTGAGAGGT
GCCAGATTGTGTGGGGCAAAAATGCCGCCCGTCTCTGCTTCCTTTGCAGTGAAGATGCCGGCTGCTCTTGGGGTGAA
GTGAAAGACTTGACCGAGGAGGTCATTGGCTCAGAGGTGAAGCGCTGGGCCACATTTGCTGTGGGCCCAGGTCATGG
CATCCAGCTACACTCGGGAAGGCTGATCATCCCCGCCTATGCCTACTATGTCTCACGTTGGTTTCTCTGCTTTGCGT
GTTCAGTCAAGCCCCATTCCCTGATGATCTACAGTGATGACTTTGGAGTCACATGGCACCATGGCAAGTTCATTGAG
CCCCAGGTGACAGGGGAGTGCCAAGTGGCCGAAGTGGCTGGGACGGCTGGTAACCCTGTGCTCACTGCAGTGCCCGA
ACACCAAGCCGATTTCGAGCAGAGGCTTTTAGTACTGATAGTGGTGGCTGCTTTCAGAAGCCAACCCTGAACCCACA
ACTCCATGAGCCTCGAACCGGCTGCCAAGGTAGTGTAGTGAGCTTCCGGCCTTTGAAGATGCCAAATACCTATCAAG
ACTCAATTGGCAAAGGTGCTCCCGCTACTCAGAAGTGCCCTCTGCTGGACAGTCCTCTGGAGGTGGAGAAAGGAGCT
GAAACACCATCAGCAACATGGCTCTTGTACTCACATCCAACTAGCAAGAGGAAGAGGATTAACCTAGGCATCTACTA
CAACCGGAACCCCTTGGAGGTGAACTGCTGGTCCCGCCCGTGGATCTTGAACCGTGGGCCCAGTGGCTACTCTGATC
TGGCTGTTGTGGAAGAACAGGACTTGGTGGCGTGTTTGTTTGAGTGTGGGGAGAAGAATGAGTATGAGCGGATTGAC
TTCTGTCTGTTTTCAGACCATGAGGTCCTGAGCTGTGAAGACTGTACCAGCCCTAGTAGCGACTAAAGCCAAATCAA
GACGGATGAGTGAGGCCCAGCTTCCCACAGAAAGGAATGGCAGCTACAGCCAGGGTAACAGAGGTCTCTGATGTCTA
GAGAAAACTCTAAAAACTAATAATCTGCTCCTTGAATTTTTTCACTTTTCCCTTCAATGAGCATGGTGAAAATTGTG
CCATATCTTACATAACGAGGCTCTTGAACTGGGAGTTTGAATCTCTTCTCTTCCCATTAAAAGGAGAGGCCATGTGC
TCGCTTCGCGTTCGACAAAGCCTGGATTCTGATCTTGAGTGGAAGCCACAGGCTTGTCTTTTCCAATGGTTCACTGC
TCACCTGAGTATTAGGTGATGTGTAGGTGCCTTGGCCAGAAGAAAGATCTGTGTTGTTGTATTTTTTTAAATTTATT
TATTTACTATATGTAAGTACACTGCAGCTGTCTTCAGACACACCAGAAGAGGGCGTCAGATCTCATTAGAGATGGTT
GTGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGATTTGAACTCAGGACCTTCAGAAGAGCAGTCAGTGCTCTTAACTACTGAGCCA
TCTCTCAAGCCCCGCATTGCTGTATTTTTAATAAGAAAAATGCCCTTATCCTTCCAATAATGCCTGGAGCTGTACAA
ATTCTCTGTCTTAGAAGACTTGAGAAAGCAGAACTGTAAGGTCAGATGCTTTCTCCAGCCTTGATGCTGTGTTCCAC
CTTCCCTTCCTCATCCAGAAAACAGTTACTAGGGAGAAAATGAGAAACCCATGCCAGCTGCCCTTGATGATGGTTGA
TAACGGTGCTTATTGCTTTTGATGTCATTACCTCTGTTAGAGATGAATCAGAGTCAGAGGTCCTTAGCTGCATCCAC

CCATTTCCAGGGGGACATTCTAACACTGCTGAACAGTCAGCTAAAATGAGAGCTGTGTGTCCTAGCCTGATTCCAGG
TTAGTCATGATGCTTCCTGGAGCTGGGCTTTTATCTAATCCCAGGAGCCATCTAGGGGAGGCTCAGAGCTAGCAGGT
GATCTTCCTGAGATGGTTTCACCGTGACAGGTGAACCATGAGCCCTTCCAAGCAAGGCCAAAGGACAACATTATAGG
AAAGATTTCTAGTATTAATATGCCTTTTCTCTGTGTGTGTACTGTCTTGTAGTGATGCTATATAGACAAATAGATGA
TTTCTTATTTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTTTTTGTTTTTCTGTAGCCCTAGCTGTCCTGGAACTCACTTTGTAAACC
AGGCTGGCCTCGATCTCAGAAATCCGCCTGCCTCTGCCTCCCGAGTGCTGGGATTAAAGGTGTGCACCACCACACCT
TAATGATGATCCTATAAGTATTCCTAAAATTATACTAGTAATTATTAACTCCTTTATAATAGGACTGCTATTAAAGC
CCTCGCTGATATGAAAACTACAGTGAGAACTCTGCCAGTCTTCACATGTCATAATTACTTCTGAGATAGAAAGCAGG
CATTTACAACTTAGAACACATTTCTTAGAGCTGTAAAACAATTAACTAGAGGTCATAAAAGGGAATGAAAGATTTAT
TGTAGGTGCTAGGACAGAACATAAAATATTGACTGGGCTTATCTATATGAAACTTCATTGTTAACTTTTACACAAGA
ATTATGGTTTTTAACTTTCAGTGAACCTGCGGAGCTAGTGACAGAAGAGAAATGTCTAGTTAGATAACTACTCTTAA
TGGAAATTCACATAAACATCTGTTGCCATCTTCTTTTTGAATTTATGTTTAAACTTGTGAATGTTTGAATTAGACAC
TACGCGAGCACATAGAAAATAAAGAACTAAGCGTGAA

[0578] SEQ ID NO:45:

[0579] GGACAGTGTGCATCACGGAGCTTGTGGCCCAGACTGTGCCTGGCAGACCCAGAGGACCTAAGGCTTGGC
TCTAGTGGTGGTCAGCACAGCCCTCGGTGGTCTGCGGAGCCTGATATTGCTTTACGTAAGGGCTGTTCTGCTGTGCA
TCTCCTGTGTCTGAAGCTATTCGCCATGGAGACTGCTGGAGCTCCCTTCTGCTTCCATGTGGACTCCCTGGTACCTT
GCTCCTACTGGAAGGTTATGGGGCCCACGCGTGTTCCCAGGAGAACGGTGCTCTTCCAGAGGGAAAGGACGGGCCTG
ACCTACCGTGTGCCTGCGTTACTCTGTGTGCCTCCCAGGCCTACTCTGCTGGCCTTCGCGGAACAGCGACTTAGCCC
TGATGACTCCCATGCCCACCGCCTGGTGCTACGGAGGGGCACGCTGACCAGGGGCTCAGTGCGGTGGGGCACTCTGA
GTGTACTGGAGACTGCAGTACTGGAGGAGCACAGGTCTATGAACCCTTGCCCGGTGCTGGATGAGCACTCTGGTACC
ATCTTCCTCTTCTTCATTGCCGTGCTGGGCCACACACCGGAGGCCGTGCAAATCGCCACTGGCAAGAACGCTGCTCG
CCTCTGCTGTGTGACCAGCTGTGACGCTGGCCTCACCTGGGGCAGTGTTCGAGATCTCACTGAGGAAGCCATTGGTG
CTGCATTGCAGGACTGGGCCACCTTTGCTGTGGGTCCGGGCCATGGAGTTCAGCTGCGCTCGGGTCGCCTGCTTGTT
CCTGCTTACACCTATCATGTGGACCGACGGGAATGTTTTGGCAAGATCTGCTGGACCAGTCCCCACTCCTTGGCATT
CTACAGTGATGATCATGGGATCTCCTGGCATTGTGGAGGCCTTGTGCCCAACCTACGCTCTGGAGAGTGCCAACTGG
CTGCGGTAGATGGAGACTTTCTCTACTGTAATGCTCGAAGCCCTCTGGGTAACCGTGTGCAGGCACTGAGTGCTGAT
GAAGGCACGTCCTTCCTACCAGGGGAGCTGGTGCCTACATTGGCAGAGACGGCTCGTGGTTGCCAGGGTAGCATTGT
GGGCTTCCTAGCTCCACCCTCAATCGAGCCTCAGGATGACCGGTGGACAGGGAGTCCTAGGAACACCCCACATTCCC
CATGCTTCAATCTCAGAGTACAGGAGTCTTCGGGGGAAGGTGCCAGAGGTCTTCTTGAACGTTGGATGCCCAGGTTG
CCTCTCTGCTACCCACAGTCCCGGAGCCCAGAGAATCATGGCCTAGAGCCTGGGTCAGATGGAGATAAGACATCCTG
GACTCCGGAATGTCCTATGTCCTCTGATTCCATGCTTCAGAGCCCCACATGGCTACTATATTCCCACCCAGCAGGGC
GTAGAGCTCGGCTCCACATGGGAATCTACCTGAGCCGATCCCCCTTGGATCCCCACAGCTGGACAGAGCCCTGGGTG
ATCTATGAGGGCCCCAGTGGCTACTCTGACCTTGCCTTTCTTGGGCCTATGCCTGGGGCATCCCTGGTTTTTGCCTG
TCTGTTTGAGAGCGGGACCAGGACTTCCTATGAAGACATTTCTTTTTGCTTGTTCTCACTGGCGGATGTCCTGGAGA
ATGTGCCCACTGGCTTAGAGATGCTAAGTCTCAGGGATAAGGCTCAGGGGCATTGCTGGCCCTCTTGATGGCCTCAC
CCTCTCGTAGCCGCCTGGAGAGGAAGGGTAGACTATATAGAGGAGGTTAGGGGTAGGTCAGCATGATGCTAGGATGG
AGAGAGCTCTGTCCCCTCGTGGATGGTGGTGGTGACTCACCCGGGGGGCCAGCTGCTTTCTGAGTGCAAATGAGAAA
AATAAAGAGCTGCGCTGTGACTTTTCTTTCCACATCAAAGCTTGGGTGTCAGTGCTTTAGCTTGATGCTCTGATCAC

CATGCAAATCTTCCACCGGCGCCTTGCTCAGCTTTCATATCCCAAGGGTGCCTGGGAGGAAGGCAACAGGGACAGTG
GACATCACTGCACCACTTTCCACGACCCTGTGTGCCAACCTCAGCCACTTTGAAACATGCTGATGACTGAGGTCTGT
TCACTTTCTTAATTTCAAGCAGGAGAAGCAGGTTGGGGAGCCAGCCTCCCCAGCTAGAGGGGACAGAACTTGACTTG
AGCAGGGGGGTACCTCCTAGGACCTGCTCCATGTGCCTACTTCTTTACCCTTCTCTAGAGAGGGCTCTTGTCCTGTC
AGAGCTGTTTTCTCCCTTCTCTTGTTTTTTCTTTTTCAAGACTGTTTCTCTGTGTTAGCCCTGGCTGTCCTGGATCT
CACTCTGTAGATCAGGCTGACCTTGAGTTCAAAGCTCCATCTGCCTCTACTTCTCACATTACTGTGATTAAAGGCAT
ATACTACCACTGCCTGGTGCCCTTTTGTATTTCTTATTAAAGTCCTAATGTCTGATTATAAAAACAGTCTGTGTGGG
CTGGAGTGATGGCTTACTCAGTAAAGCACTTGCCATGGAATCTGGGCAATCTGAGTTTCATTTTTAGCATCCTGTAA
AAATCCCAATTTGATGGTGTACTTGTAATGTCAGCATGGAGAGGCAGAGATAGGTAAGTTCCCCAAGACTCTTTGAA
CCGACAGCTTGGCCTCACTGGCACATTCCAGGTCTCAGTGAGAGACCCTGCCTCAAAATACAAAGAAAGAGCTGCTG
AAGAGTGGGTCAGAGTTGACCTCTGATCTCCGGAAGTATATGATACACACCCGTGCATGCACTCTTCCTTACAAAAT
AAAAAGCAAAACAAAACCCCAACAGGTATATGGCCATTTTAGAAAAATTAGAAGATTTAGAAAGCTATACATAAAAA
AAAATGACCTAAAGAAAAATCTTTACTGTTCTGGGCACTATCCCTATCAAACCACTGTGTTCTTTGGCCAAGCCTTG
GGGTGGACACTGTTTTGAGGTGGGTCCTGTTATCTCCACTAGGTAGTGGAGTTTTGTGTCAGACTAACTGGGTCTTA
AAGCTGTCTTTAAGGCCATCAGGAGCTACTGACTTGCCTGCCTCAGCAGAGCATATCCTGAAGGTCGGGGTTAAGTC
TCCTTCCCGAGCGAGTTGCCTTCCAGTGGGCCCCTGGACTCCTAGGTCCTCAGCGCTCATCAGCTGCCAAGGACTCT
GAGGGAATGTCCTCTGACTGTGGCCCCGAAAGGTAGGGGAGGGGGATGTGCTTAGGCTTAGGACAGGGTCCTGTTTC
AGTCTGCCTTCACTGTTAGTAGCACTGTGCCACATGGCACAGACTGGGCGAGCTTTAAAGGAAGGAGGTTGATATTG
GTTCCCACTTCTGGGGATCATGGTTGAGCAGCCTTGTCTGATGATGGTTGTCTTGATGGTAGATCGTGAGGTAGTTG
ATGAAGGTATGACATGGTGAGAAACTCTGTGTGTGTGTGTTATTTTCTCTGTGTTCTACCTATACATCTATCTATGT
ATATATGTATCTATCTATCTACCTGGAGGCTGGAGAGATAGCTTAGTGGTTAAGAACATTTGTTGTTCTTGCATAGT
CCTGGATTTAAATTTTCAGCACCCACATGGCAGCTCACAACAACCCATAAATCCAGTTTCAGAGGATCCAACCTCTG
ATATACCATGTCAGCCAGAGCAGACACGGCTGAAGGTGGTTTGATCCCCGTATGGAGAGGTGACAATTGGGAAGAGA
GAAAGATCAACTTAACCATGCAAGGAACAGGAAGTTAAATACTGAACAGGGAAGGTAAAGGCAGGAAGTAGATGTAG
AGGGCAAATCAATGAAACCCAAACATACCCAAATTACGCTAAACACACACTGACATGCCAATTAAAAGGACAAATTG
GCTCCACTGGCAAAACCAAAACAGACACTGAAGATCCAAACAGTCACATGCCAACTACCGCGGAGGGAGACAGACAC
AGAGAAGACCGTGACAGACACTTGGACACTCTTGAGAGTGGATGTGCAGGAAGAGAGCTCTGCCAGTGGAGAAGAAA
GCACTCAGAAGAAAGTGACAGCAGCTGTAAATTTGTATTCTGCTAATGTTATGTTCCAAAGTTGAAAGCAAAATTGT
ACCAATTCATAAGAACAAACAGGCTGACTCTCAGTTGTGACTGAACGTCTCTCAGTAACTGACGGGGCGAGCAGGCC
AAAGGAGAGTCGGCTCAGAAGGGTGCATAGCCACGCCAAATCAAATAAGCAAGTACAACCGGCAGGCTCTATTTCTA
GCACAAAGGGGTCTGTGCCTCATTCTGTGCTTGGGTCAGAGCTTGGGTCTCTCATTTGGATGTAAGTGGTGTAGTGG
AGAAGCAGGAAATAATCCGGAGCGCATATTTTGATTTTAACATAAGTGCTGATTTGGGAGGGAGTTTTGTCAAATTG
TGTTTTTACAATGTTTTTTTTTTTTTAAATGATGCTTTTTTGTAAAGTGTACAAATGTGATATAAGATTGGTTCTGC
TACATTCAGTTTCTATAAAAGTGGTTCTAAAATATTGTACTGTCAATCATCTCATGATTATTCTACTGTACACATTA
CTGACTTTGTATGTAATAATTAATATTAGAAGAAAATATAATTTATTTGAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0580] SEQ ID NO:46:

[0581] X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX_4THQ
VQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX_5QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPR
DLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX_6QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQD

TLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_7$GCQGSVISFPSPRSGPGSPA QWLLYTHPTHX$_8$X$_9$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{10}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_1$ $_1$FX$_{12}$MFTLKQAFPAEYLPQ

[0582] SEQ ID NO:47:

[0583] X$_1$X$_2$SX$_3$X$_4$X$_5$LQX$_6$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7$X$_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_1$ $_0$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LDGHRSMNPCPLYDX$_{13}$QTGTLFLFFIAIPX$_{14}$X$_{15}$VTEX$_{16}$QQLQTRANVTRLX$_{17}$X$_{18}$V TSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{19}$YREWSTFAVGPGHX$_{20}$LQLHDRX$_{21}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{22}$QRPIPSAFX$_{23}$ FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX$_{24}$ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX$_{25}$NX$_{26}$GLDFQX$_{27}$SQLVKKLVEP PPX$_{28}$GX$_{29}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{30}$LLYTHPTHX$_{31}$X$_{32}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{33}$LLAKGSX$_{34}$AY SDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{35}$LYEANDYEEIX$_{36}$FX$_{37}$MFTLKQAFPAEYLPQ

[0584] SEQ ID NO:48:

[0585] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0586] SEQ ID NO:49:

[0587] DASLPYLQDESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIRFIMFTLKQAFPAEY LPQ

[0588] SEQ ID NO:50:

[0589] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0590] SEQ ID NO:51:

[0591] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0592] SEQ ID NO:52:

[0593] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDASTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0594] SEQ ID NO:53:

[0595] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDATTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0596] SEQ ID NO:54:

[0597] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0598] SEQ ID NO:55:

[0599] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL PQ

[0600] SEQ ID NO:56:

[0601] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0602] SEQ ID NO:57:

[0603] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS

WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL
PQ

[0604] SEQ ID NO:58:

[0605] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0606] SEQ ID NO:59:

[0607] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0608] SEQ ID NO:60:

[0609] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0610] SEQ ID NO:61:

[0611] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0612] SEQ ID NO:62:

[0613] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0614] SEQ ID NO:63:

[0615] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT

ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0616] SEQ ID NO:64:

[0617] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSEQ ID
NO:65:

[0618] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL
SASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0619] SEQ ID NO:66:

[0620] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0621] SEQ ID NO:67:

[0622] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0623] SEQ ID NO:68:

[0624] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0625] SEQ ID NO:69:

[0626] DASLPYLQDESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE

VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIRFIMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0627] SEQ ID NO:70:

[0628] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0629] SEQ ID NO:71:

[0630] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0631] SEQ ID NO:72:

[0632] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDASTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0633] SEQ ID NO:73:

[0634] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDATTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA

IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0635] SEQ ID NO:74:

[0636] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0637] SEQ ID NO:75:

[0638] X_1ASLPX$_2$LQX$_3$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX$_4$THQ
VQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX$_5$QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPR
DLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX$_6$QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQD
TLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_7$GCQGSVISFPSPRSGPGSPA
QWLLYTHPTHX$_8$X$_9$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{10}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_1$
$_1$FX$_{12}$MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0639] SEQ ID NO:76:

[0640] $X_1X_2SX_3X_4X_5$LQX$_6$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7$X$_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_1$
$_0$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LDGHRSMNPCPLYDX$_{13}$QTGTLFLFFIAIPX$_{14}$X$_{15}$VTEX$_{16}$QQLQTRANVTRLX$_{17}$X$_{18}$V
TSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{19}$YREWSTFAVGPGHX$_{20}$LQLHDRX$_{21}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{22}$QRPIPSAFX$_{23}$
FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX$_{24}$ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX$_{25}$NX$_{26}$GLDFQX$_{27}$SQLVKKLVEP
PPX$_{28}$GX$_{29}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{30}$LLYTHPTHX$_{31}$X$_{32}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{33}$LLAKGSX$_{34}$AY
SDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{35}$LYEANDYEEIX$_{36}$FX$_{37}$MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0641] SEQ ID NO:77:

[0642] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ

AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0643] SEQ ID NO:78:

[0644] DASLPYLQDESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIRFIMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0645] SEQ ID NO:79:

[0646] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0647] SEQ ID NO:80:

[0648] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ

AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0649] SEQ ID NO:81:

[0650] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDASTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0651] SEQ ID NO:82:

[0652] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDATTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0653] SEQ ID NO:83:

[0654] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ

AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0655] SEQ ID NO:84:

[0656] X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX_4THQ
VQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX_5QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPR
DLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX_6QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQD
TLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_7$GCQGSVISFPSPRSGPGSPA
QWLLYTHPTHX_8X$_9$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX_{10}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_1$
$_1$FX_{12}MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW
VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0657] SEQ ID NO:85:

[0658] $X_1X_2SX_3X_4X_5$LQX_6ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7$X$_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_1$
$_0$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LDGHRSMNPCPLYDX$_{13}$QTGTLFLFFIAIPX$_{14}$X$_{15}$VTEX$_{16}$QQLQTRANVTRLX$_{17}$X$_{18}$V
TSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{19}$YREWSTFAVGPGHX$_{20}$LQLHDRX$_{21}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{22}$QRPIPSAFX$_{23}$
FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX$_{24}$ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX$_{25}$NX$_{26}$GLDFQX$_{27}$SQLVKKLVEP
PPX$_{28}$GX$_{29}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{30}$LLYTHPTHX$_{31}$X$_{32}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{33}$LLAKGSX$_{34}$AY
SDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{35}$LYEANDYEEIX$_{36}$FX$_{37}$MFTLKQAFPAEYLPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG
TKVEIK

[0659] SEQ ID NO:86:

[0660] GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGT
AGAGCCAGCCAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTA
CAGCGCCAGCTTTCTGTACTCCGGCGTGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA
TAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACCTCCAACCTTTGGCCAG
GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0661] SEQ ID NO:87:

[0662] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGC
CGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTC
GCCAGAATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACA
CCAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTTCTAGATG
GGGAGGCGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTTTCTTCTGCtagcACCAAG
GGCCCATCcGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCcTGGAACTCAGGCGCtCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA
GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGtacTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0663] SEQ ID NO:88:

[0664] GATGCATCTCTGCCTTACCTGCAGAAAGAAAGCGTGTTCCAGTCTGGCGCCCACGCCTACAGAATTCCC
GCTCTGCTGTATCTGCCAGGCCAGCAGTCTCTGCTGGCTTTCGCTGAACAGCGGGCCAGCAAGAAGGATGAGCACGC
CGAACTGATCGTGCTGCGGAGAGGCGATTACGACGCCGGCACACATCAGGTGCAGTGGCAGGCTCAAGAGGTGGTGG
CTCAGGCTAGACTGGACGGCCACAGATCTATGAACCCCTGTCCTCTGTACGATGAACAGACCGGCACACTGTTTCTG
TTCTTTATCGCTATCCCCGGCCAAGTGACCGAGCAGCAGCAGCTGCAGACAAGAGCCAACGTGACCAGACTGTGTCA
AGTGACCTCCACCGACCACGGCAGAACCTGGTCTAGCCCTAGAGATCTGACCGACGCCGCCATCGGACCTGCCTATA
GAGAGTGGTCCACCTTCGCCGTTGGACCTGGACACTGTCTCCAGCTGCACGACAGGGCTAGATCTCTGGTGGTGCCT
GCCTACGCCTATAGAAAGCTGCACCCCAAACAGCGGCCTATTCCTAGCGCCTTCTGCTTTCTGAGCCACGATCACGG
CAGGACATGGGCCAGAGGACATTTCGTGGCCCAGGACACACTGGAATGCCAGGTGGCCGAAGTGGAAACCGGCGAGC
AGAGAGTCGTGACCCTGAACGCCAGATCTCACCTGAGAGCCAGAGTGCAGGCCCAGAGCACAAACGACGGCCTGGAT

TTCCAAGAGAGCCAGCTGGTCAAGAAACTGGTGGAACCTCCTCCACAGGGCTGTCAGGGAAGCGTGATCAGCTTTCC
ATCTCCTAGAAGCGGCCCTGGCTCTCCTGCTCAGTGGCTGCTGTATACACACCCCACACACAGCTGGCAGAGAGCCG
ATCTGGGCGCCTACCTGAATCCTAGACCTCCTGCTCCTGAGGCTTGGAGCGAACCTGTTCTGCTGGCCAAGGGCAGC
GCTGCCTACAGCGATCTGCAGTCTATGGGCACAGGCCCTGATGGCAGCCCTCTGTTTGGCTGTCTGTACGAGGCCAA
CGACTACGAAGAGATCGTGTTCCTGATGTTCACCCTGAAGCAGGCCTTTCCAGCCGAGTACCTGCCTCAAGGCGGAG
GTGGAAGTGGCGGAGGCGGATCCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCACTAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

[0665] SEQ ID NO:89:

[0666] GATGCATCTCTGCCTTACCTGCAGAAAGAAAGCGTGTTCCAGTCTGGCGCCCACGCCTACAGAATTCCC
GCTCTGCTGTATCTGCCAGGCCAGCAGTCTCTGCTGGCTTTCGCTGAACAGCGGGCCAGCAAGAAGGATGAGCACGC
CGAACTGATCGTGCTGCGGAGAGGCGATTACGACGCCGGCACACATCAGGTGCAGTGGCAGGCTCAAGAGGTGGTGG
CTCAGGCTAGACTGGACGGCCACAGATCTATGAACCCCTGTCCTCTGTACGATGAACAGACCGGCACACTGTTTCTG
TTCTTTATCGCTATCCCCGGCCAAGTGACCGAGCAGCAGCAGCTGCAGACAAGAGCCAACGTGACCAGACTGTGTCA
AGTGACCTCCACCGACCACGGCAGAACCTGGTCTAGCCCTAGAGATCTGACCGACGCCGCCATCGGACCTGCCTATA
GAGAGTGGTCCACCTTCGCCGTTGGACCTGGACACTGTCTCCAGCTGCACGACAGGGCTAGATCTCTGGTGGTGCCT
GCCTACGCCTATAGAAAGCTGCACCCCAAACAGCGGCCTATTCCTAGCGCCTTCTGCTTTCTGAGCCACGATCACGG
CAGGACATGGGCCAGAGGACATTTCGTGGCCCAGGACACACTGGAATGCCAGGTGGCCGAAGTGGAAACCGGCGAGC
AGAGAGTCGTGACCCTGAACGCCAGATCTCACCTGAGAGCCAGAGTGCAGGCCCAGAGCACAAACGACGGCCTGGAT
TTCCAAGAGAGCCAGCTGGTCAAGAAACTGGTGGAACCTCCTCCACAGGGCTGTCAGGGAAGCGTGATCAGCTTTCC
ATCTCCTAGAAGCGGCCCTGGCTCTCCTGCTCAGTGGCTGCTGTATACACACCCCACACACAGCTGGCAGAGAGCCG
ATCTGGGCGCCTACCTGAATCCTAGACCTCCTGCTCCTGAGGCTTGGAGCGAACCTGTTCTGCTGGCCAAGGGCAGC
GCTGCCTACAGCGATCTGCAGTCTATGGGCACAGGCCCTGATGGCAGCCCTCTGTTTGGCTGTCTGTACGAGGCCAA
CGACTACGAAGAGATCGTGTTCCTGATGTTCACCCTGAAGCAGGCCTTTCCAGCCGAGTACCTGCCTCAA

[0667] SEQ ID NO:90:

[0668] TVEKSVVFKAEGEHFTDQKGNTIVGSGSGGTTKYFRIPAMCTTSKGTIVVFADARHNTASDQSFIDTAA
ARSTDGGKTWNKKIAIYNDRVNSKLSRVMDPTCIVANIQGRETILVMVGKWNNNDKTWGAYRDKAPDTDWDLVLYKS
TDDGVTFSKVETNIHDIVTKNGTISAMLGGVGSGLQLNDGKLVFPVQMVRTKNITTVLNTSFIYSTDGITWSLPSGY
CEGFGSENNIIEFNASLVNNIRNSGLRRSFETKDFGKTWTEFPPMDKKVDNRNHGVQGSTITIPSGNKLVAAHSSAQ
NKNNDYTRSDISLYAHNLYSGEVKLIDDFYPKVGNASGAGYSCLSYRKNVDKETLYVVYEANGSIEFQDLSRHLPVI
KSYNGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

[0669] SEQ ID NO:91:

[0670] ACAGTGGAAAAGTCCGTGGTGTTCAAGGCCGAGGGCGAGCACTTCACCGACCAGAAAGGCAATACCAT
CGTCGGCTCTGGCAGCGGCGGCACCACCAAGTACTTTAGAATCCCCGCCATGTGCACCACCAGCAAGGGCACCATT
GTGGTGTTCGCCGACGCCAGACACAACACCGCCAGCGATCAGAGCTTCATCGATACCGCTGCCGCCAGATCTACCG
ATGGCGGCAAGACCTGGAACAAGAAGATCGCCATCTACAACGACCGCGTGAACAGCAAGCTGAGCAGAGTGATGGA
CCCTACCTGCATCGTGGCCAACATCCAGGGCAGAGAAACCATCCTGGTCATGGTCGGAAAGTGGAACAACAACGAT
AAGACCTGGGGCGCCTACAGAGACAAGGCCCCTGATACCGATTGGGACCTCGTGCTGTACAAGAGCACCGATGACG
GCGTGACCTTCAGCAAGGTGGAAACAAACATCCACGACATCGTGACCAAGAACGGCACCATCTCTGCCATGCTCGG
CGGCGTTGGATCTGGCCTGCAACTGAATGATGGCAAGCTGGTGTTCCCCGTGCAGATGGTCCGAACAAAGAATATC
ACCACCGTGCTGAATACCAGCTTCATCTACAGCACCGACGGCATCACATGGTCCCTGCCTAGCGGCTACTGTGAAG
GCTTTGGCAGCGAGAACAACATCATCGAGTTCAACGCCAGCCTGGTCAACAACATCCGGAACAGCGGCCTGCGGAG
AAGCTTCGAGACAAAGGACTTCGGAAAGACGTGGACCGAGTTTCCTCCAATGGACAAGAAGGTGGACAACCGGAAC
CACGGCGTGCAGGGCAGCACAATCACAATCCCTAGCGGCAACAAACTGGTGGCCGCTCACTCTAGCGCCCAGAACA
AGAACAACGACTACACCAGAAGCGACATCAGCCTGTACGCCCACAACCTGTACAGCGGCGAAGTGAAGCTGATCGA
CGACTTCTACCCCAAAGTGGGCAATGCCAGCGGAGCCGGCTACAGCTGTCTGAGCTACCGGAAAAATGTGGACAAA
GAAACCCTGTACGTGGTGTACGAGGCCAACGGCAGCATCGAGTTTCAGGACCTGAGCAGACATCTGCCCGTGATCA
AGAGCTACAACggcggaggtggaagtggcggaggcggatccgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc
tgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccct
gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgg
aggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgag
aaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtctacaccctgcccccatcccgggaggagatga
ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa
tgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctcactagcaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacc
actacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

[0671] SEQ ID NO:92:

[0672] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
SGGGGSGGGGSTVEKSVVFKAEGEHFTDQKGNTIVGSGSGGTTKYFRIPAMCTTSKGTIVVFADARHNTASDQSFID
TAAARSTDGGKTWNKKIAIYNDRVNSKLSRVMDPTCIVANIQGRETILVMVGKWNNNDKTWGAYRDKAPDTDWDLVL
YKSTDDGVTFSKVETNIHDIVTKNGTISAMLGGVGSGLQLNDGKLVFPVQMVRTKNITTVLNTSFIYSTDGITWSLP
SGYCEGFGSENNIIEFNASLVNNIRNSGLRRSFETKDFGKTWTEFPPMDKKVDNRNHGVQGSTITIPSGNKLVAAHS

SAQNKNNDYTRSDISLYAHNLYSGEVKLIDDFYPKVGNASGAGYSCLSYRKNVDKETLYVVYEANGSIEFQDLSRHL
PVIKSYN

[0673] SEQ ID NO:93:

[0674] gaggtgcagctggttgaatctggcggaggactggttcagcctggcggatctctgagactgtcttgtgc
cgccagcggcttcaacatcaaggacacctacatccactgggtccgacaggcccctggcaaaggacttgaatgggtc
gccagaatctaccccaccaacggctacaccagatacgccgactctgtgaagggcagattcaccatcagcgccgaca
ccagcaagaacaccgcctacctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgccgtgtactactgttctagatg
gggaggcgacggcttctacgccatggattattggggccagggcaccctggtcaccgtttcttctgctagcaccaag
ggcccatccgtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtca
aggactacttccccgaaccggtgacggtgtcctggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccggc
tgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaa
ctcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaa
ggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagca
cgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctc
caacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtctac
accctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccca
gcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactc
cgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggtggcggag
gatctggcggaggtggaagcggcggaggcggatctacagtggaaaagtccgtggtgttcaaggccgagggcgagca
cttcaccgaccagaaaggcaataccatcgtcggctctggcagcggcggcaccaccaagtactttagaatccccgcc
atgtgcaccaccagcaagggcaccattgtggtgttcgccgacgccagacacaacaccgccagcgatcagagcttca
tcgataccgctgccgccagaagtacagacggcggcaagacctggaacaagaagatcgccatctacaacgaccgcgt
gaacagcaagctgagcagagtgatggaccctacctgcatcgtggccaacatccagggcagagaaaccatcctggtc
atggtcggaaagtggaacaacaacgataagacctggggcgcctacagagacaaggcccctgataccgattgggacc
tcgtgctgtataagagcaccgacgacggcgtgaccttcagcaaggtggaaacaaacatccacgacatcgtgaccaa
gaacggcaccatctctgccatgctcggcggcgttggatctggcctgcaactgaatgatggcaagctggtgttcccc
gtgcagatggtccgaacaaagaacatcaccaccgtgctgaataccagcttcatctactccaccgacggcatcacat
ggtccctgcctagcggctactgtgaaggctttggcagcgagaacaacatcatcgagttcaacgccagcctggtcaa
caacatccggaacagcggcctgcggagaagcttcgagacaaaggacttcggaaagacgtggaccgagtttcctcca
atggacaagaaggtggacaaccggaaccacggcgtgcagggcagcacaatcacaatccctagcggcaacaaactgg
tggccgctcactctagcgcccagaacaagaacaacgattacaccagaagcgacatcagcctgtacgcccacaacct
gtactccggcgaagtgaagctgatcgacgacttctaccccaaagtgggcaatgccagcggagccggctacagctgt
ctgagctaccggaaaaatgtggacaaagaaaccctgtacgtggtgtacgaggccaacggcagcatcgagtttcagg
acctgagcagacatctgcccgtgatcaagagctacaat

[0675] SEQ ID NO:94:

[0676] TVEKSVVFKAEGEHFTDQKGNTIVGSGSGGTTKYFRIPAMCTTSKGTIVVFADARHNTASDQSFIDTAA

ARSTDGGKTWNKKIAIYNDRVNSKLSRVMDPTCIVANIQGRETILVMVGKWNNNDKTWGAYRDKAPDTDWDLVLYKS
TDDGVTFSKVETNIHDIVTKNGTISAMLGGVGSGLQLNDGKLVFPVQMVRTKNITTVLNTSFIYSTDGITWSLPSGY
CEGFGSENNIIEFNASLVNNIRNSGLRRSFETKDFGKTWTEFPPMDKKVDNRNHGVQGSTITIPSGNKLVAAHSSAQ
NKNNDYTRSDISLYAHNLYSGEVKLIDDFYPKVGNASGAGYSCLSYRKNVDKETLYVVYEANGSIEFQDLSRHLPVI
KSYNGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY
PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0677] SEQ ID NO:95:

[0678] ACAGTGGAAAAGTCCGTGGTGTTCAAGGCCGAGGGCGAGCACTTCACCGACCAGAAAGGCAATACCAT
CGTCGGCTCTGGCAGCGGCGGCACCACCAAGTACTTTAGAATCCCCGCCATGTGCACCACCAGCAAGGGCACCATT
GTGGTGTTCGCCGACGCCAGACACAACACCGCCAGCGATCAGAGCTTCATCGATACCGCTGCCGCCAGATCTACCG
ATGGCGGCAAGACCTGGAACAAGAAGATCGCCATCTACAACGACCGCGTGAACAGCAAGCTGAGCAGAGTGATGGA
CCCTACCTGCATCGTGGCCAACATCCAGGGCAGAGAAACCATCCTGGTCATGGTCGGAAAGTGGAACAACAACGAT
AAGACCTGGGGCGCCTACAGAGACAAGGCCCCTGATACCGATTGGGACCTCGTGCTGTACAAGAGCACCGATGACG
GCGTGACCTTCAGCAAGGTGGAAACAAACATCCACGACATCGTGACCAAGAACGGCACCATCTCTGCCATGCTCGG
CGGCGTTGGATCTGGCCTGCAACTGAATGATGGCAAGCTGGTGTTCCCCGTGCAGATGGTCCGAACAAAGAATATC
ACCACCGTGCTGAATACCAGCTTCATCTACAGCACCGACGGCATCACATGGTCCCTGCCTAGCGGCTACTGTGAAG
GCTTTGGCAGCGAGAACAACATCATCGAGTTCAACGCCAGCCTGGTCAACAACATCCGGAACAGCGGCCTGCGGAG
AAGCTTCGAGACAAAGGACTTCGGAAAGACGTGGACCGAGTTTCCTCCAATGGACAAGAAGGTGGACAACCGGAAC
CACGGCGTGCAGGGCAGCACAATCACAATCCCTAGCGGCAACAAACTGGTGGCCGCTCACTCTAGCGCCCAGAACA
AGAACAACGACTACACCAGAAGCGACATCAGCCTGTACGCCCACAACCTGTACAGCGGCGAAGTGAAGCTGATCGA
CGACTTCTACCCCAAAGTGGGCAATGCCAGCGGAGCCGGCTACAGCTGTCTGAGCTACCGGAAAAATGTGGACAAA
GAAACCCTGTACGTGGTGTACGAGGCCAACGGCAGCATCGAGTTTCAGGACCTGAGCAGACATCTGCCCGTGATCA
AGAGCTACAACGGCGGAGGTGGAAGTGGCGGAGGCGGATCcGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACC
TGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGTGGCGGAGGCGGA
TCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAG
CGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTCGCCAGAA

TCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACACCAGCAAG
AACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTTCTAGATGGGGAGGCGA
CGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTTTCTTCTGGCGGAGGAGGATCTGGCGGAG
GCGGAAGTGGCGGAGGCGGATCTGACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGA
GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCC
TAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACTCCGGCGTGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGGCACCG
ACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACCT
CCAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

[0679] SEQ ID NO:96:

[0680] TVEKSVVFKAEGEHFTDQKGNTIVGSGSGGTTKYFRIPAMCTTSKGTIVVFADARHNTASDQSFIDTAA
ARSTDGGKTWNKKIAIYNDRVNSKLSRVMVPTCIVANIQGRETILVMVGKWNNNDKTWGAYRDKAPDTDWDLVLYKS
TDDGVTFSKVETNIHDIVTKNGTISAMLGGVGSGLQLNDGKLVFPVQMVRTKNITTVLNTSFIYSTDGITWSLPSGY
CEGFGSVNNIIEFNASLVNNIRNSGLRRSFETKDFGKTWTEFPPMDKKVDNRNHGVQGSTITIPSGNKLVAAHSSAQ
NKNNDYTRSDISLYAHNLYSGEVKLIDDFYPKVGNASGAGYSCLSYRKNVDKETLYVVYEANGSIEFQDLSRHLPVI
KSYNGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

[0681] SEQ ID NO:97:

[0682] acagtggaaaagtccgtggtgttcaaggccgagggcgagcacttcaccgaccagaaaggcaataccat
cgtcggctctggcagcggcggcaccaccaagtactttagaatccccgccatgtgcaccaccagcaagggcaccatt
gtggtgttcgccgacgccagacacaacaccgccagcgatcagagcttcatcgataccgctgccgccagaagtacag
acggcggcaagacctggaacaagaagatcgccatctacaacgaccgcgtgaacagcaagctgagcagagtgatggt
ccctacctgcatcgtggccaacatccagggcagagaaaccatcctggtcatggtcggaaagtggaacaacaacgat
aagacctggggcgcctacagagacaaggcccctgataccgattgggacctcgtgctgtataagagcaccgacgacg
gcgtgaccttcagcaaggtggaaacaaacatccacgacatcgtgaccaagaacggcaccatctctgccatgctcgg
cggcgttggatctggcctgcaactgaatgatggcaagctggtgttccccgtgcagatggtccgaacaaagaacatc
accaccgtgctgaataccagcttcatctactccaccgacggcatcacatggtccctgcctagcggctactgtgaag
gctttggcagcgtgaacaacatcatcgagttcaacgccagcctggtcaacaacatccggaacagcggcctgcggag
aagcttcgagacaaaggacttcggaaagacgtggaccgagtttcctccaatggacaagaaggtggacaaccggaac
cacggcgtgcagggcagcacaatcacaatccctagcggcaacaaactggtggccgctcactctagcgcccagaaca
agaacaacgattacaccagaagcgacatcagcctgtacgcccacaacctgtactccggcgaagtgaagctgatcga
cgacttctaccccaaagtgggcaatgccagcggagccggctacagctgtctgagctaccggaaaaatgtggacaaa
gaaaccctgtacgtggtgtacgaggccaacggcagcatcgagtttcaggacctgagcagacatctgcccgtgatca
agagctacaatggcggaggtggaagtggcggaggcggatccgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc
tgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccct
gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgg
aggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgag

aaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtctacaccctgcccccatcccgggaggagatga
ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa
tgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctcactagcaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacc
actacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

[0683] SEQ ID NO:98:

[0684] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA
QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI
GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV
ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS
WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL
PQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

[0685] SEQ ID NO:99:

[0686] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA
QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI
GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV
ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS
WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL
PQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

[0687] SEQ ID NO:100:

[0688] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0689] SEQ ID NO:101:

[0690] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE

VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0691] SEQ ID NO:102:

[0692] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0693] SEQ ID NO:103:

[0694] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0695] SEQ ID NO:104:

[0696] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0697] SEQ ID NO:105:

[0698] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA

IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0699] SEQ ID NO:106:

[0700] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0701] SEQ ID NO:107:

[0702] DASLPYLQDESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIRFIMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0703] SEQ ID NO:108:

[0704] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0705] SEQ ID NO:109:

[0706] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ

AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0707] SEQ ID NO:110:

[0708] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDASTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0709] SEQ ID NO:111:

[0710] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDATTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0711] SEQ ID NO:112:

[0712] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0713] SEQ ID NO:113:

[0714] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL PQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

[0715] SEQ ID NO:114:

[0716] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL PQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

[0717] SEQ ID NO:115:

[0718] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0719] SEQ ID NO:116:

[0720] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0721] SEQ ID NO:117:

[0722] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0723] SEQ ID NO:118:

[0724] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0725] SEQ ID NO:119:

[0726] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0727] SEQ ID NO:120:

[0728] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSPGK

[0729] SEQ ID NO:121:

[0730] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0731] SEQ ID NO:122:

[0732] DASLPYLQDESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIRFIMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0733] SEQ ID NO:123:

[0734] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0735] SEQ ID NO:124:

[0736] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN

QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0737] SEQ ID NO:125:

[0738] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDASTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0739] SEQ ID NO:126:

[0740] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDATTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0741] SEQ ID NO:127:

[0742] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0743] SEQ ID NO:128:

[0744] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA
QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI
GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV
ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS
WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL
PQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

[0745] SEQ ID NO:129:

[0746] ASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQA
QEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAI
GPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEV
ETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHS
WQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYL
PQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

[0747] SEQ ID NO:130:

[0748] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0749] SEQ ID NO:131:

[0750] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0751] SEQ ID NO:132:

[0752] AASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY

LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0753] SEQ ID NO:133:

[0754] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0755] SEQ ID NO:134:

[0756] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSCAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0757] SEQ ID NO:135:

[0758] MASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0759] SEQ ID NO:136:

[0760] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH

SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0761] SEQ ID NO:137:

[0762] DASLPYLQDESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIRFIMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0763] SEQ ID NO:138:

[0764] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0765] SEQ ID NO:139:

[0766] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0767] SEQ ID NO:140:

[0768] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDASTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE

VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0769] SEQ ID NO:141:

[0770] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDATTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0771] SEQ ID NO:142:

[0772] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0773] SEQ ID NO:143:

[0774] $X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX_7X_8DEHAELIVX_9RRGDYDAX_1$
$_0THQVQWX_{11}AQEVVAQAX_{12}LDGHRSMNPCPLYDX_{13}QTGTLFLFFIAIPX_{14}X_{15}VTEX_{16}QQLQTRANVTRLX_{17}X_{18}V$
TSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{19}$YREWSTFAVGPGHX$_{20}$LQLHDRX$_{21}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{22}$QRPIPSAFX$_{23}$
FLSHDHGRTWARGHFVAQDTX$_{24}$ECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSX$_{25}$NX$_{26}$GLDFQX$_{27}$SQLVKKLVEP
PPX$_{28}$GX$_{29}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{30}$LLYTHPTHX$_{31}$X$_{32}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{33}$LLAKGSX$_{34}$AY
SDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{35}$LYEANDYEEIX$_{36}$FX$_{37}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{38}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0775] SEQ ID NO:144:

[0776] X_1ASLPX$_2$LQX$_3$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX$_4$THQ
VQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX$_5$QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPR

DLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX$_6$QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQD TLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_7$GCQGSVISFPSPRSGPGSPA QWLLYTHPTHX$_8$X$_9$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{10}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_1$ $_1$FX$_{12}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{13}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0777] SEQ ID NO:145:

[0778] GGGGSGGGGS

[0779] SEQ ID NO:146:

[0780] EPKSS

[0781] SEQ ID NO:147:

[0782] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0783] SEQ ID NO:148:

[0784] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLY CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

[0785] SEQ ID NO:149:

[0786] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH ARQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQ

[0787] SEQ ID NO:150:

[0788] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH ARQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0789] SEQ ID NO:151:

[0790] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
ARQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0791] SEQ ID NO:152:

[0792] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
ARQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0793] SEQ ID NO:153:

[0794] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
ARQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0795] SEQ ID NO:154:

[0796] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0797] SEQ ID NO:155:

[0798] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA

IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0799] SEQ ID NO:156:

[0800] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0801] SEQ ID NO:157:

[0802] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0803] SEQ ID NO:158:

[0804] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0805] SEQ ID NO:159:

[0806] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ

AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0807] SEQ ID NO:160:

[0808] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0809] SEQ ID NO:161:

[0810] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0811] SEQ ID NO:162:

[0812] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0813] SEQ ID NO:163:

[0814] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE

VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0815] SEQ ID NO:164:

[0816] X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX_4THQ
VQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX_5QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCX_6VTSTDHGRTWSSPR
DLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX_7QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQD
TLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRX_8RVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX_9GCQGSVISFPSPRSGPGSPA
QWLLYTHPTH$X_{10}X_{11}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX_{12}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEE
IX_{13}FX_{14}MFTLKQAFPAEYLPQX_{15}DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0817] SEQ ID NO:165:

[0818] $X_1X_2SX_3X_4X_5$LQX_6ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7X_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_1$
$_0$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LX$_{13}$GHRSMNPCPLYDX$_{14}$QTGTLFLFFIAIPX$_{15}X_{16}$VTEX$_{17}$QQLQTRANVTRLX$_{18}X_1$
$_9$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{20}$YREWSTFAVGPGHX$_{21}$LQLHDX$_{22}X_{23}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{24}X_{25}X_{26}$PIP
SAFX$_{27}$FLSHDHGRTWARGHFVX$_{28}$QDTX$_{29}$ECQVAEVX$_{30}$TGEQRVVTLNARSX$_{31}X_{32}X_{33}X_{34}$RX$_{35}$QAQSX$_{36}$NX$_{37}$GL
DFQX$_{38}X_{39}$QX$_{40}$VKKLX$_{41}$EPPPX$_{42}$GX$_{43}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{44}$LLYTHPTHX$_{45}X_{46}$QRADLGAYLNPRPPA
PEAWSEPX$_{47}$LLAKGSX$_{48}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{49}$LYEANDYEEIX$_{50}$FX$_{51}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{52}$DKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0819] SEQ ID NO:166:

[0820] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
ARQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0821] SEQ ID NO:167:

[0822] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0823] SEQ ID NO:168:

[0824] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0825] SEQ ID NO:169:

[0826] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0827] SEQ ID NO:170:

[0828] DASLPYLQDESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIRFIMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0829] SEQ ID NO:171:

[0830] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0831] SEQ ID NO:172:

[0832] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAPTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0833] SEQ ID NO:173:

[0834] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDASTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0835] SEQ ID NO:174:

[0836] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDATTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0837] SEQ ID NO:175:

[0838] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDANTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPAGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
RKQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0839] SEQ ID NO:176:

[0840] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
ARQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0841] SEQ ID NO:177:

[0842] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0843] SEQ ID NO:178:

[0844] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0845] SEQ ID NO:179:

[0846] X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX_4THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX_5QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCX_6VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX_7QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRX_8RVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX$_9$GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX$_{10}$X$_{11}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX$_{12}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX$_{13}$FX$_{14}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{15}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0847] SEQ ID NO:180:

[0848] $X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6$ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX$_7$X$_8$DEHAELIVX$_9$RRGDYDAX$_{10}$THQVQWX$_{11}$AQEVVAQAX$_{12}$LX$_{13}$GHRSMNPCPLYDX$_{14}$QTGTLFLFFIAIPX$_{15}$X$_{16}$VTEX$_{17}$QQLQTRANVTRLX$_{18}$X$_{19}$VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX$_{20}$YREWSTFAVGPGHX$_{21}$LQLHDX$_{22}$X$_{23}$RSLVVPAYAYRKLHPX$_{24}$X$_{25}$X$_{26}$PIPSAFX$_{27}$FLSHDHGRTWARGHFVX$_{28}$QDTX$_{29}$ECQVAEVX$_{30}$TGEQRVVTLNARSX$_{31}$X$_{32}$X$_{33}$X$_{34}$RX$_{35}$QAQSX$_{36}$NX$_{37}$GLDFQX$_{38}$X$_{39}$QX$_{40}$VKKLX$_{41}$EPPPX$_{42}$GX$_{43}$QGSVISFPSPRSGPGSPAQX$_{44}$LLYTHPTHX$_{45}$X$_{46}$QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX$_{47}$LLAKGSX$_{48}$AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX$_{49}$LYEANDYEEIX$_{50}$FX$_{51}$MFTLKQAFPAEYLPQX$_{52}$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0849] SEQ ID NO:181:

[0850] gatGCATCTCTGCCTTACCTGCAGAAAGAAAGCGTGTTCCAGTCTGGCGCCCACGCCTACAGAATTCCCGCTCTGCTGTATCTGCCAGGCCAGCAGTCTCTGCTGGCTTTCGCTGAACAGCGGGCCAGCAAGAAGGATGAGCACGCCGAACTGATCGTGCTGCGGAGAGGCGATTACGACGCCggcACACATCAGGTGCAGTGGCAGGCTCAAGAGGTGGTGGCTCAGGCTAGACTGGACGGCCACAGATCTATGAACCCCTGTCCTCTGTACGATgaaCAGACCGGCACACTGTTTCTGTTCTTTATCGCTATCCCCGGCCAAGTGACCGAGCAGCAGCAGCTGCAGACAAGAGCCAACGTGACCAGACTGTGTtacGTGACCTCCACCGACCACGGCAGAACCTGGTCTAGCCCTAGAGATCTGACCGACGCCGCCATCGGACCTGCCTATAGAGAGTGGTCCACCTTCGCCGTTGGACCTGGACACTGTCTCCAGCTGCACGACAGGGCTAGATCTCTGGTGGTGCCTGCCTACGCCTATAGAAAGCTGCACCCCAAACAGCGGCCTATTCCTAGCGCCTTCTGCTTTCTGAGCCACGATCACGGCAGGACATGGGCCAGAGGACATTTCGTGGCCCAGGACACACTGGAATGCCAGGTGGCCGAAGTGGAAACCGGCGAGCAGAGAGTCGTGACCCTGAACGCCAGATCTCACCTGAGATTCAGAGTGCAGGCCCAGAGCACAAACGACGGCCTGGATTTCCAAGAGAGCCAGCTGGTCAAGAAACTGGTGGAACCTCCTCCAaccGGCTGTCAGGGAAGCGTG

ATCAGCTTTCCATCTCCTAGAAGCGGCCCTGGCTCTCCTGCTCAGTGGCTGCTGTATACACACCCCACACACAGCT
GGCAGAGAGCCGATCTGGGCGCCTACCTGAATCCTAGACCTCCTGCTCCTGAGGCTTGGAGCGAACCTGTTCTGCT
GGCCAAGGGCAGCgctGCCTACAGCGATCTGCAGTCTATGGGCACAGGCCCTGATGGCAGCCCTCTGTTTGGCTGT
CTGTACGAGGCCAACGACTACGAAGAGATCGTGTTCCTGATGTTCACCCTGAAGCAGGCCTTTCCAGCCGAGTACCT
GCCTCAA

[0851] SEQ ID NO:182:

[0852] $X_1X_2SX_3X_4X_5LQX_6ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASX_7X_8DEHAELIVX_9RRGDYDAX_{10}THQVQWX_{11}AQEVVAQAX_{12}LX_{13}GHRSMNPCPLYDX_{14}QTGTLFLFFIAIPX_{15}X_{16}VTEX_{17}QQLQTRANVTRLX_{18}X_{19}VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPX_{20}YREWSTFAVGPGHX_{21}LQLHDX_{22}X_{23}RSLVVPAYAYRKLHPX_{24}X_{25}X_{26}PIPSAFX_{27}FLSHDHGRTWARGHFVX_{28}QDTX_{29}ECQVAEVX_{30}TGEQRVVTLNARSX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}RX_{35}QAQSX_{36}NX_{37}GLDFQX_{38}X_{39}QX_{40}VKKLX_{41}EPPPX_{42}GX_{43}QGSVISFPSPRSGPGSPAQX_{44}LLYTHPTHX_{45}X_{46}QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPX_{47}LLAKGSX_{48}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGX_{49}LYEANDYEEIX_{50}FX_{51}MFTLKQAFPAEYLPQ$

[0853] SEQ ID NO:183:

[0854] $X_1ASLPX_2LQX_3ESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAX_4THQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDX_5QTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCX_6VTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPX_7QRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRX_8RVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPX_9GCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHX_{10}X_{11}QRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSX_{12}AYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIX_{13}FX_{14}MFTLKQAFPAEYLPQ$

[0855] SEQ ID NO:184:

[0856] GGGGS

[0857] SEQ ID NO:185:

[0858] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQAQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAEVETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTHSWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEYLPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0859] SEQ ID NO:186:

[0860] gatGCATCTCTGCCTTACCTGCAGAAAGAAAGCGTGTTCCAGTCTGGCGCCCACGCCTACAGAATTCC
CGCTCTGCTGTATCTGCCAGGCCAGCAGTCTCTGCTGGCTTTCGCTGAACAGCGGGCCAGCAAGAAGGATGAGCAC
GCCGAACTGATCGTGCTGCGGAGAGGCGATTACGACGCCggcACACATCAGGTGCAGTGGCAGGCTCAAGAGGTGG
TGGCTCAGGCTAGACTGGACGGCCACAGATCTATGAACCCCTGTCCTCTGTACGATgaaCAGACCGGCACACTGTT
TCTGTTCTTTATCGCTATCCCCGGCCAAGTGACCGAGCAGCAGCAGCTGCAGACAAGAGCCAACGTGACCAGACTG
TGTtacGTGACCTCCACCGACCACGGCAGAACCTGGTCTAGCCCTAGAGATCTGACCGACGCCGCCATCGGACCTG
CCTATAGAGAGTGGTCCACCTTCGCCGTTGGACCTGGACACTGTCTCCAGCTGCACGACAGGGCTAGATCTCTGGT

GGTGCCTGCCTACGCCTATAGAAAGCTGCACCCCAAACAGCGGCCTATTCCTAGCGCCTTCTGCTTTCTGAGCCAC
GATCACGGCAGGACATGGGCCAGAGGACATTTCGTGGCCCAGGACACACTGGAATGCCAGGTGGCCGAAGTGGAAA
CCGGCGAGCAGAGAGTCGTGACCCTGAACGCCAGATCTCACCTGAGAGCCAGAGTGCAGGCCCAGAGCACAAACGA
CGGCCTGGATTTCCAAGAGAGCCAGCTGGTCAAGAAACTGGTGGAACCTCCTCCAaccGGCTGTCAGGGAAGCGTG
ATCAGCTTTCCATCTCCTAGAAGCGGCCCTGGCTCTCCTGCTCAGTGGCTGCTGTATACACACCCCACACACAGCT
GGCAGAGAGCCGATCTGGGCGCCTACCTGAATCCTAGACCTCCTGCTCCTGAGGCTTGGAGCGAACCTGTTCTGCT
GGCCAAGGGCAGCgctGCCTACAGCGATCTGCAGTCTATGGGCACAGGCCCTGATGGCAGCCCTCTGTTTGGCTGT
CTGTACGAGGCCAACGACTACGAAGAGATCGTGTTCCTGATGTTCACCCTGAAGCAGGCCTTTCCAGCCGAGTACC
TGCCTCAAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT
GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGtaCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCtatAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0861] SEQ ID NO:187:

[0862] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRFRVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPTGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLY
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0863] SEQ ID NO:188:

[0864] gatGCATCTCTGCCTTACCTGCAGAAAGAAAGCGTGTTCCAGTCTGGCGCCCACGCCTACAGAATTCC
CGCTCTGCTGTATCTGCCAGGCCAGCAGTCTCTGCTGGCTTTCGCTGAACAGCGGGCCAGCAAGAAGGATGAGCAC
GCCGAACTGATCGTGCTGCGGAGAGGCGATTACGACGCCggcACACATCAGGTGCAGTGGCAGGCTCAAGAGGTGG
TGGCTCAGGCTAGACTGGACGGCCACAGATCTATGAACCCCTGTCCTCTGTACGATgaaCAGACCGGCACACTGTT
TCTGTTCTTTATCGCTATCCCCGGCCAAGTGACCGAGCAGCAGCAGCTGCAGACAAGAGCCAACGTGACCAGACTG
TGTtacGTGACCTCCACCGACCACGGCAGAACCTGGTCTAGCCCTAGAGATCTGACCGACGCCGCCATCGGACCTG
CCTATAGAGAGTGGTCCACCTTCGCCGTTGGACCTGGACACTGTCTCCAGCTGCACGACAGGGCTAGATCTCTGGT
GGTGCCTGCCTACGCCTATAGAAAGCTGCACCCCAAACAGCGGCCTATTCCTAGCGCCTTCTGCTTTCTGAGCCAC
GATCACGGCAGGACATGGGCCAGAGGACATTTCGTGGCCCAGGACACACTGGAATGCCAGGTGGCCGAAGTGGAAA
CCGGCGAGCAGAGAGTCGTGACCCTGAACGCCAGATCTCACCTGAGAttCAGAGTGCAGGCCCAGAGCACAAACGA

CGGCCTGGATTTCCAAGAGAGCCAGCTGGTCAAGAAACTGGTGGAACCTCCTCCAaccGGCTGTCAGGGAAGCGTG
ATCAGCTTTCCATCTCCTAGAAGCGGCCCTGGCTCTCCTGCTCAGTGGCTGCTGTATACACACCCCACACACAGCT
GGCAGAGAGCCGATCTGGGCGCCTACCTGAATCCTAGACCTCCTGCTCCTGAGGCTTGGAGCGAACCTGTTCTGCT
GGCCAAGGGCAGCgctGCCTACAGCGATCTGCAGTCTATGGGCACAGGCCCTGATGGCAGCCCTCTGTTTGGCTGT
CTGTACGAGGCCAACGACTACGAAGAGATCGTGTTCCTGATGTTCACCCTGAAGCAGGCCTTTCCAGCCGAGTACC
TGCCTCAAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT
GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGtaCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCtatAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0865] SEQ ID NO:189:

[0866] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0867] SEQ ID NO:190:

[0868] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGC
CGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTC
GCCAGAATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACA
CCAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTTCTAGATG
GGGAGGCGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTTTCTTCTGCtagcACCAAG
GGCCCATCcGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCcTGGAACTCAGGCGCtCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA
GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC

CGACGGCTCCTTCTTCCTCacTAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0869] SEQ ID NO:191:

[0870] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQ

[0871] SEQ ID NO:192:

[0872] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0873] SEQ ID NO:193:

[0874] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0875] SEQ ID NO:194:

[0876] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT

RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

[0877] SEQ ID NO:195:

[0878] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0879] SEQ ID NO:196:

[0880] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0881] SEQ ID NO:197:

[0882] DASLPYLQKESVFQSGAHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRASKKDEHAELIVLRRGDYDAGTHQVQWQ
AQEVVAQARLDGHRSMNPCPLYDEQTGTLFLFFIAIPGQVTEQQQLQTRANVTRLCYVTSTDHGRTWSSPRDLTDAA
IGPAYREWSTFAVGPGHCLQLHDRARSLVVPAYAYRKLHPKQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQDTLECQVAE
VETGEQRVVTLNARSHLRARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQGSVISFPSPRSGPGSPAQWLLYTHPTH
SWQRADLGAYLNPRPPAPEAWSEPVLLAKGSAAYSDLQSMGTGPDGSPLFGCLYEANDYEEIVFLMFTLKQAFPAEY
LPQGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

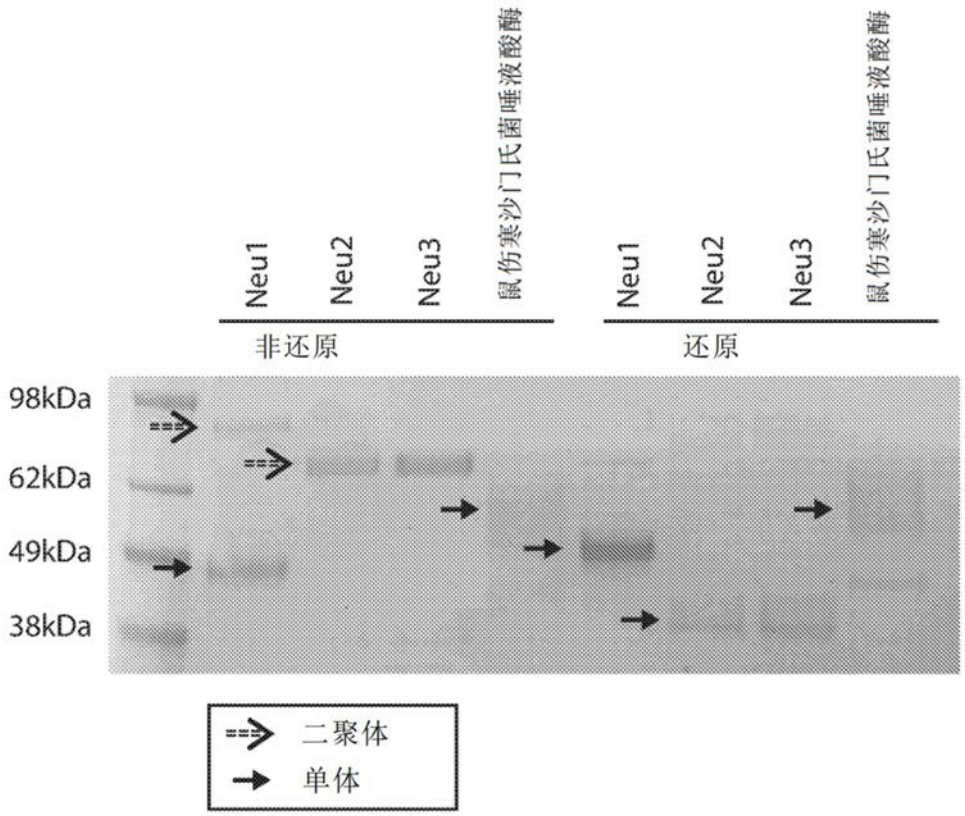
Neu1
Neu2
Neu3
鼠伤寒沙门氏菌唾液酸酶
非还原
还原
98kDa
62kDa
49kDa
38kDa
二聚体
单体

图1

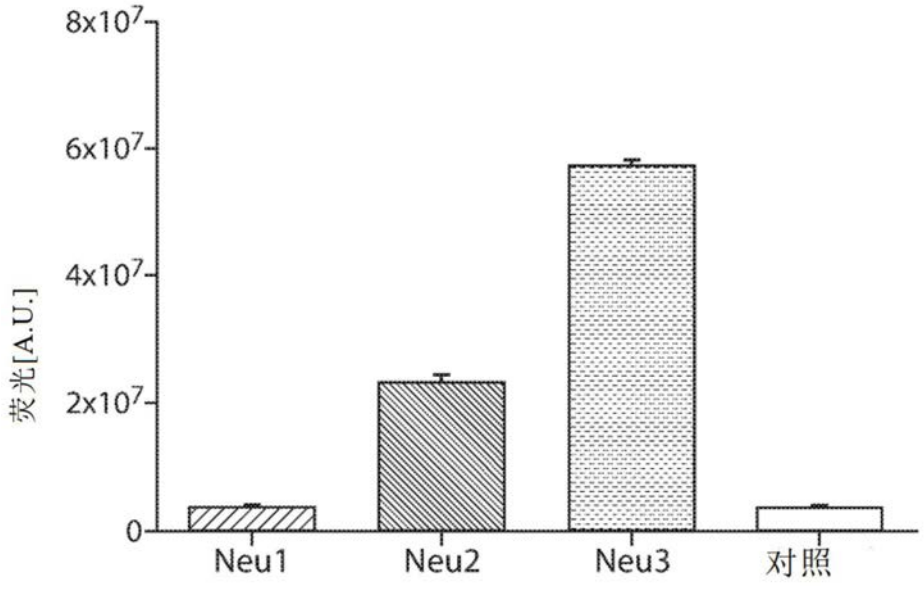
8x10^7
6x10^7
4x10^7
2x10^7
0
荧光[A.U.]
Neu1
Neu2
Neu3
对照

图2

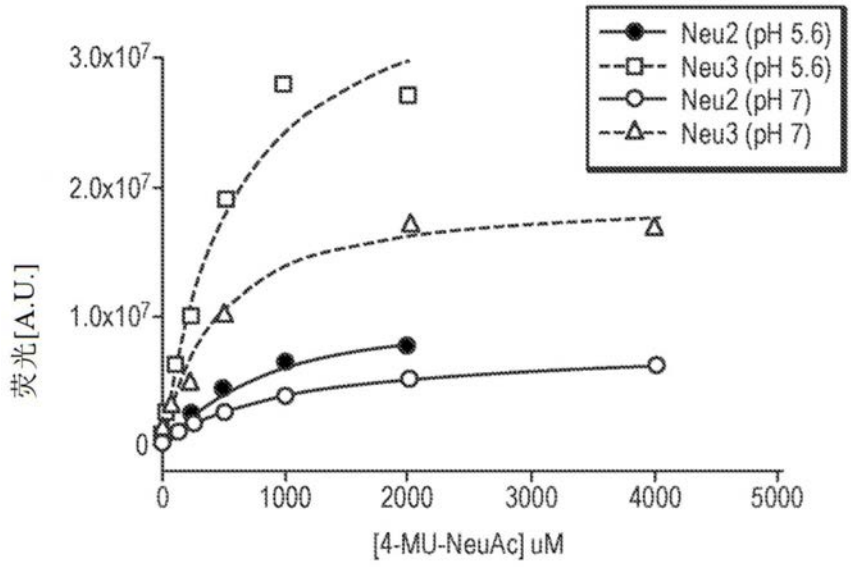
Neu2 (pH 5.6)
Neu3 (pH 5.6)
Neu2 (pH 7)
Neu3 (pH 7)
3.0x10^7
2.0x10^7
1.0x10^7
0
荧光[A.U.]
0
1000
2000
3000
4000
5000
[4-MU-NeuAc] uM

图3

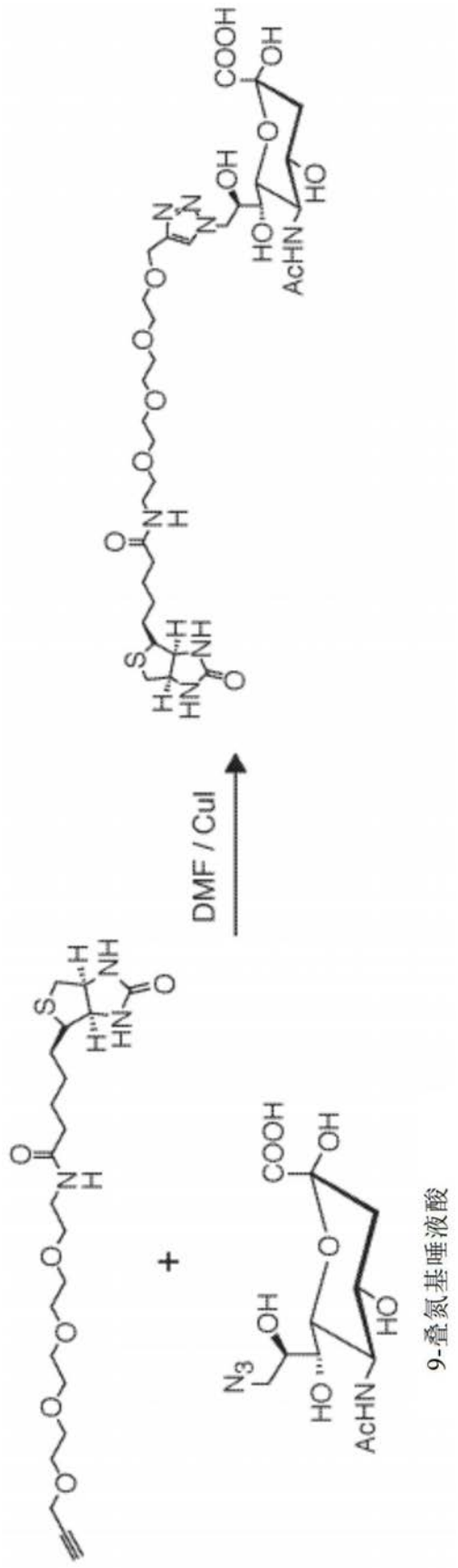

图4

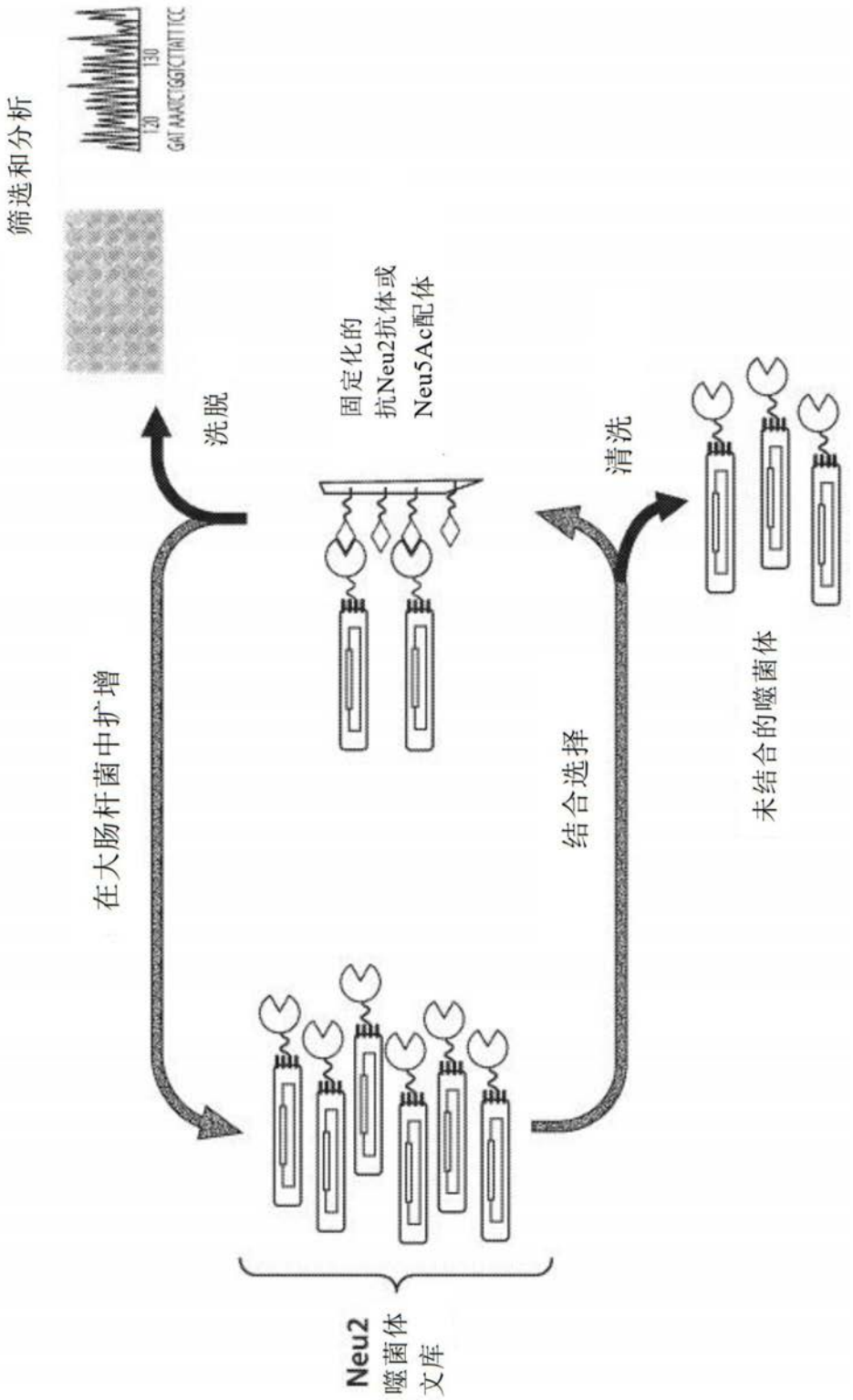
筛选和分析
洗脱
固定化的
抗Neu2抗体或
Neu5Ac配体
清洗
在大肠杆菌中扩增
结合选择
未结合的噬菌体
Neu2
噬菌体
文库

图5

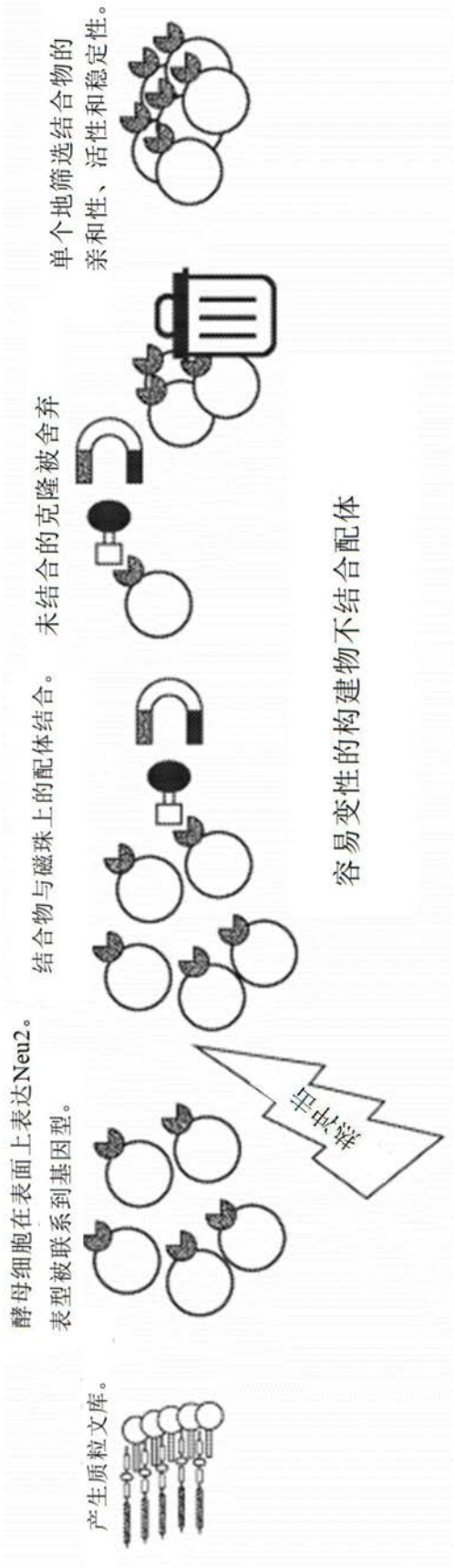
产生质粒文库。
酵母细胞在表面上表达Neu2。
表型被联系到基因型。
结合物与磁珠上的配体结合。
未结合的克隆被舍弃
单个地筛选结合物的
亲和性、活性和稳定性。
半衰率
容易变性的构建物不结合配体

图6

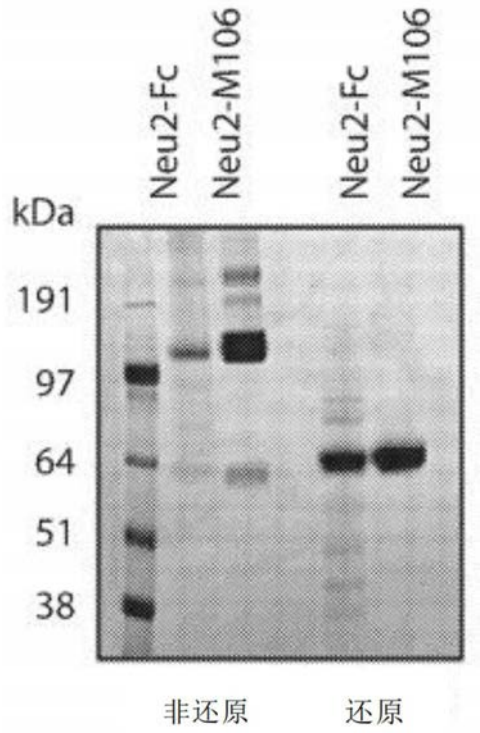
Neu2-Fc
Neu2-M106
Neu2-Fc
Neu2-M106
kDa
191
97
64
51
38
非还原
还原

图7A

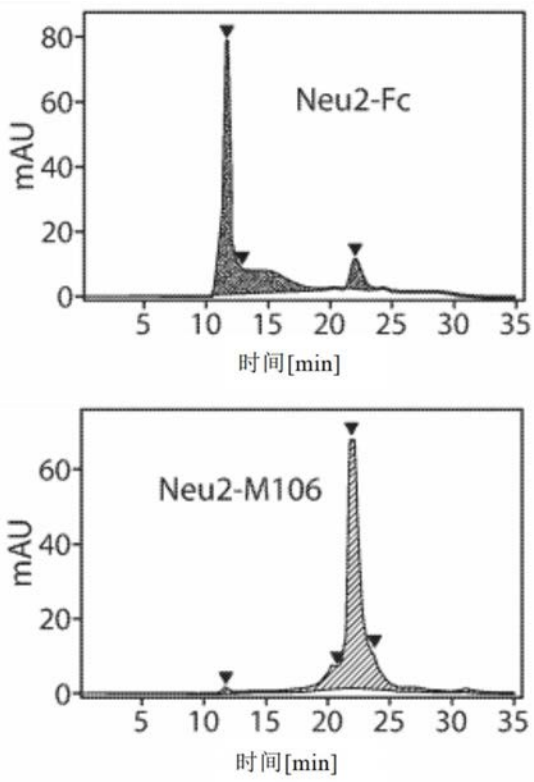
80
60
40
20
0
mAU
Neu2-Fc
5 10 15 20 25 30 35
时间[min]
60
40
20
0
mAU
Neu2-M106
5 10 15 20 25 30 35
时间[min]

图7B

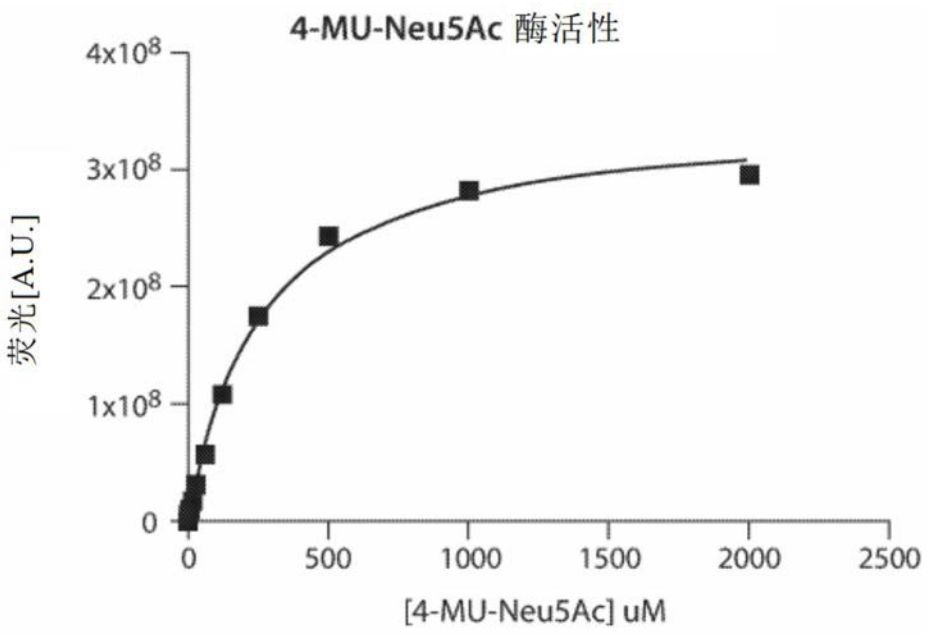
4-MU-Neu5Ac 酶活性
4x10^8
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
荧光[A.U.]
0
500
1000
1500
2000
2500
[4-MU-Neu5Ac] uM

图8

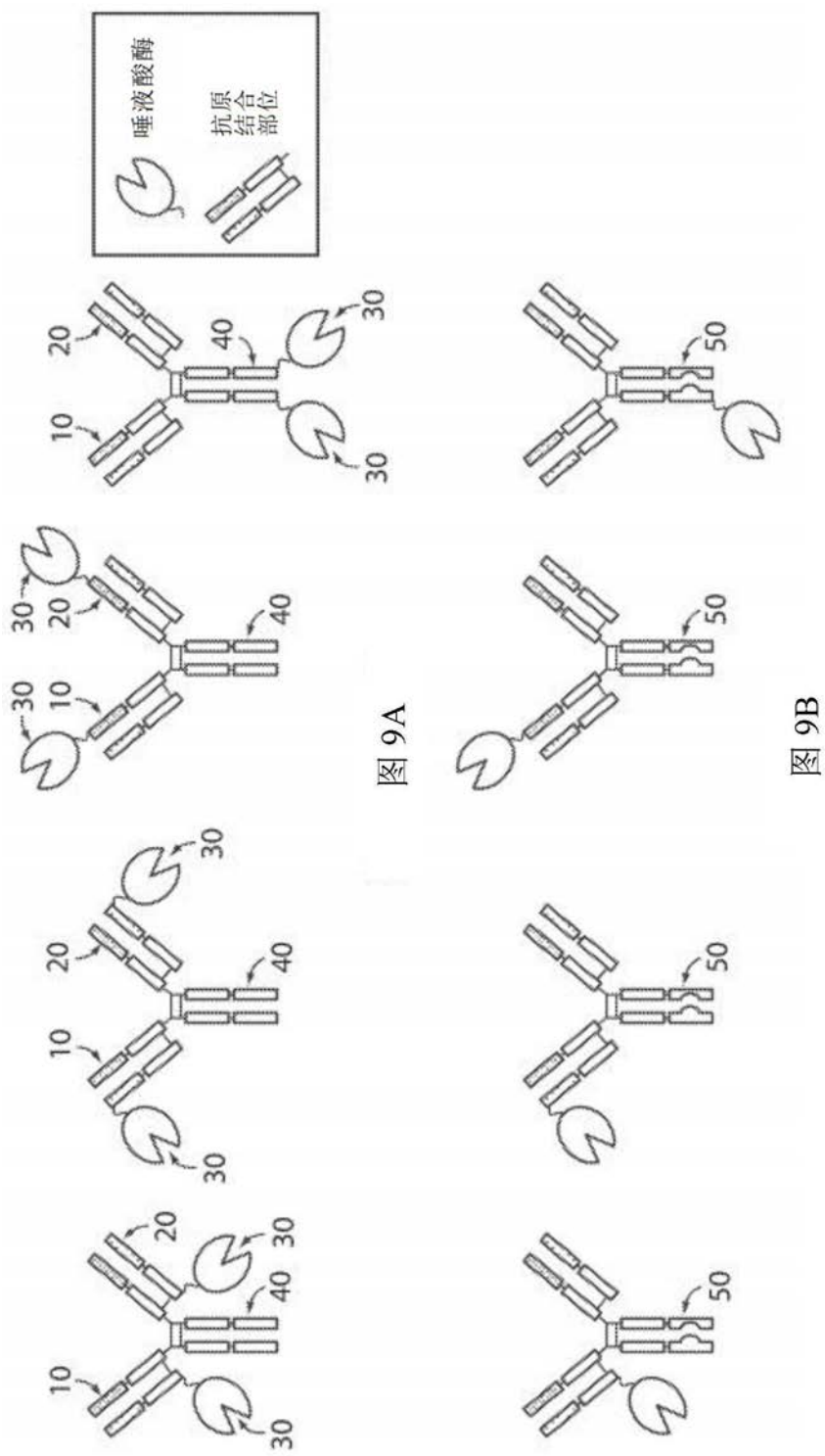

图 9A 图 9B

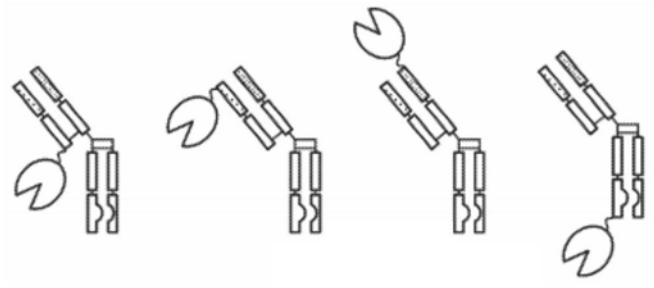

图9C

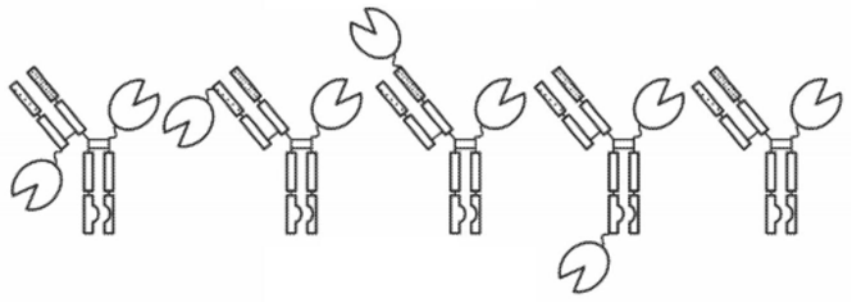

图9D

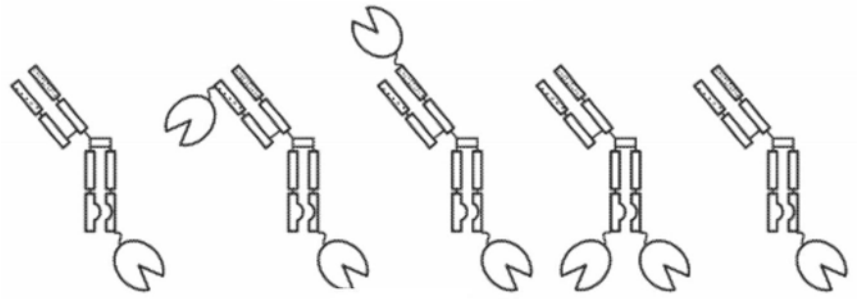

图9E

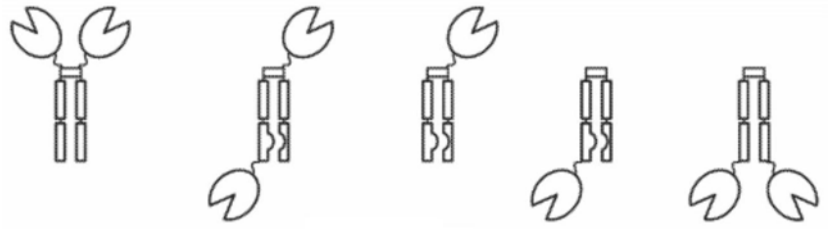

图9F

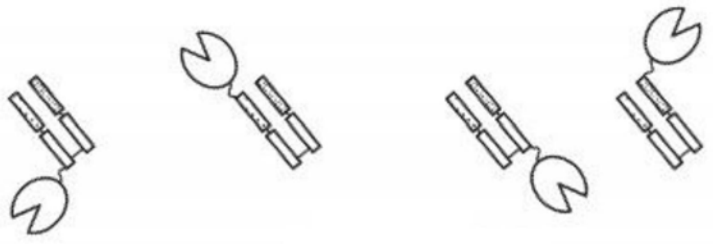

图9G

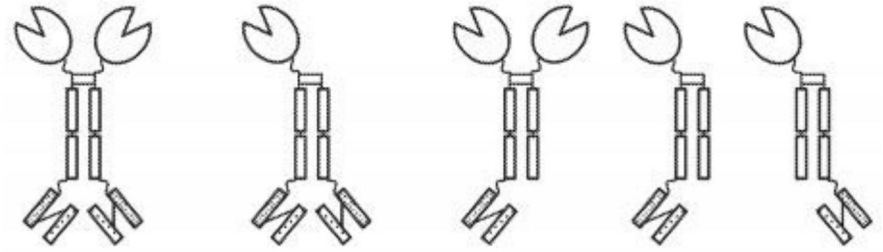

图9H

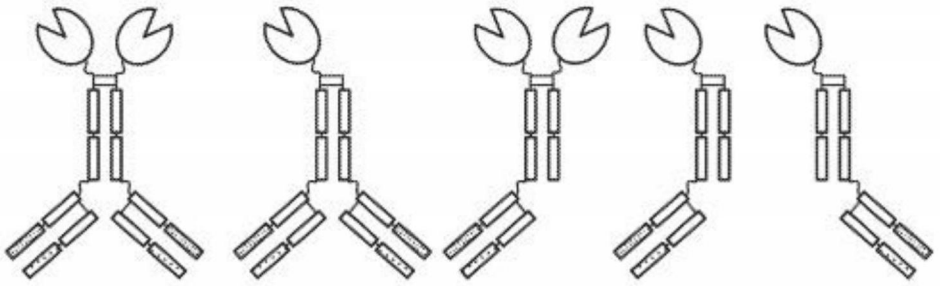

图9I

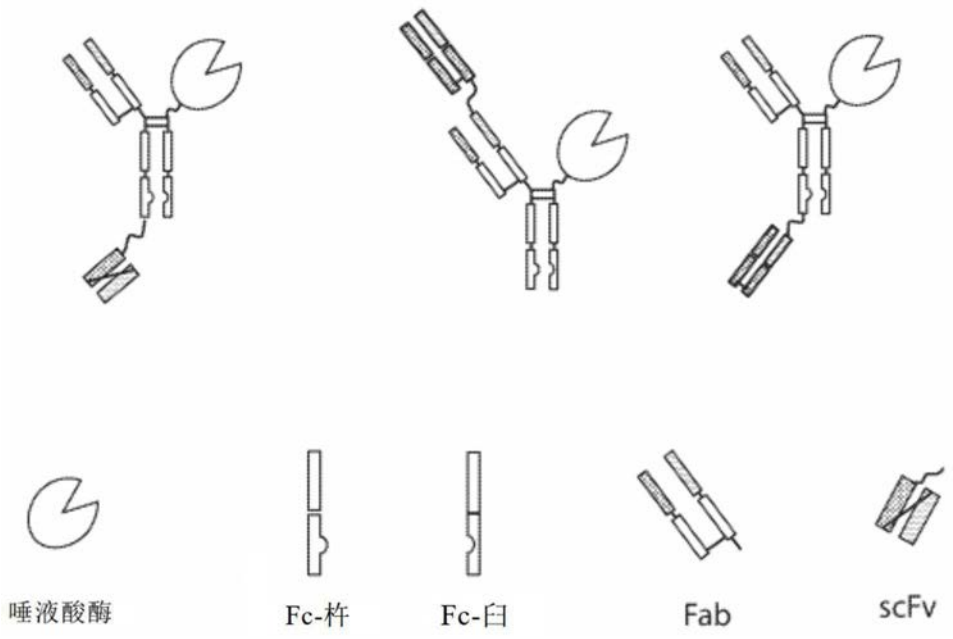

图10

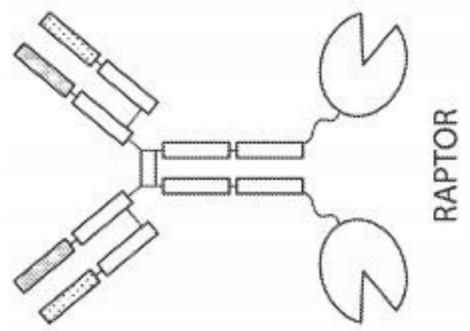

图11A

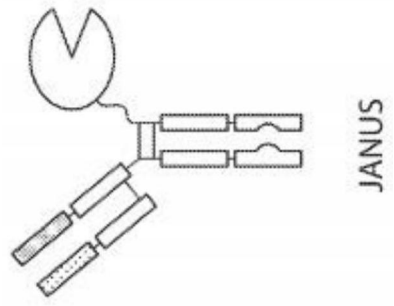

图11B

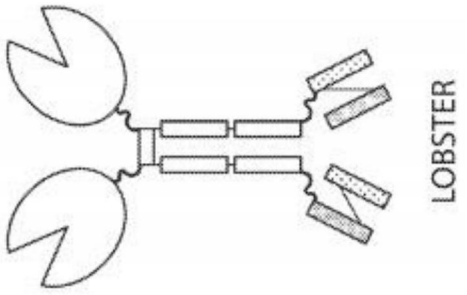

图11C

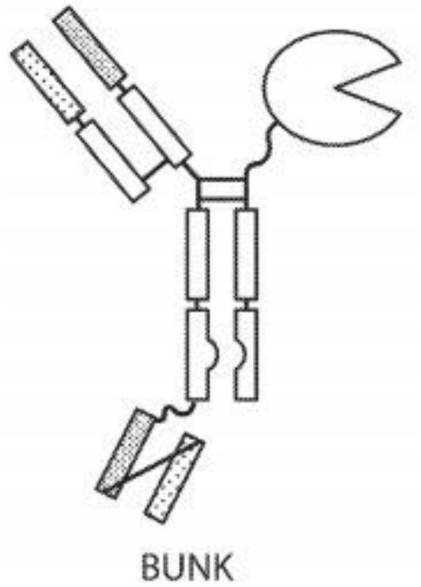

图11D

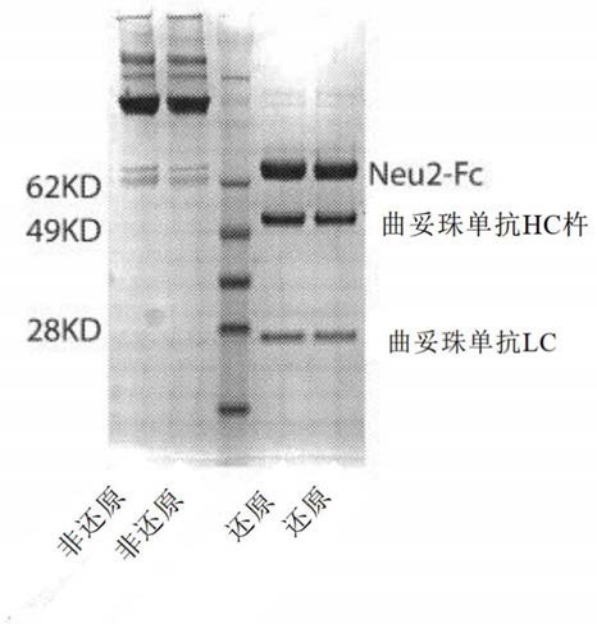

图12

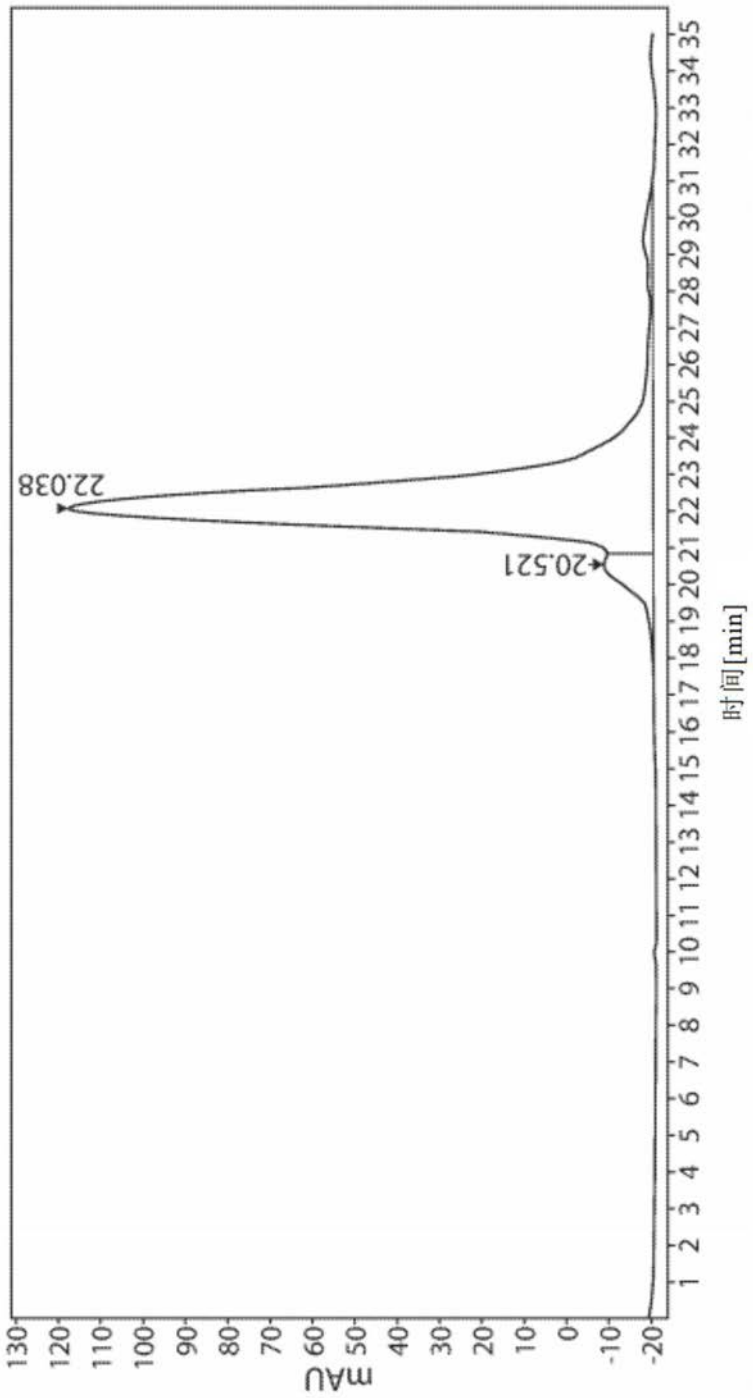
mAU
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
时间[min]
22.038
20.521

图13

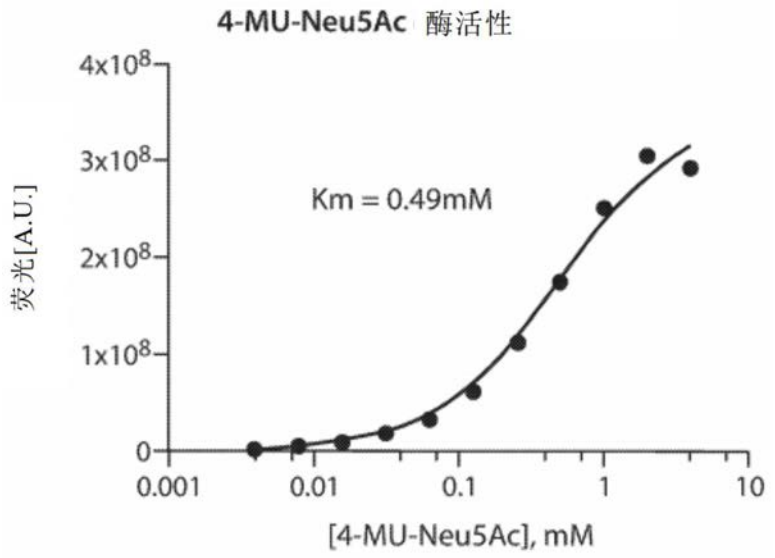
4-MU-Neu5Ac 酶活性
4x10^8
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
荧光[A.U.]
Km = 0.49mM
0.001
0.01
0.1
1
10
[4-MU-Neu5Ac], mM

图14

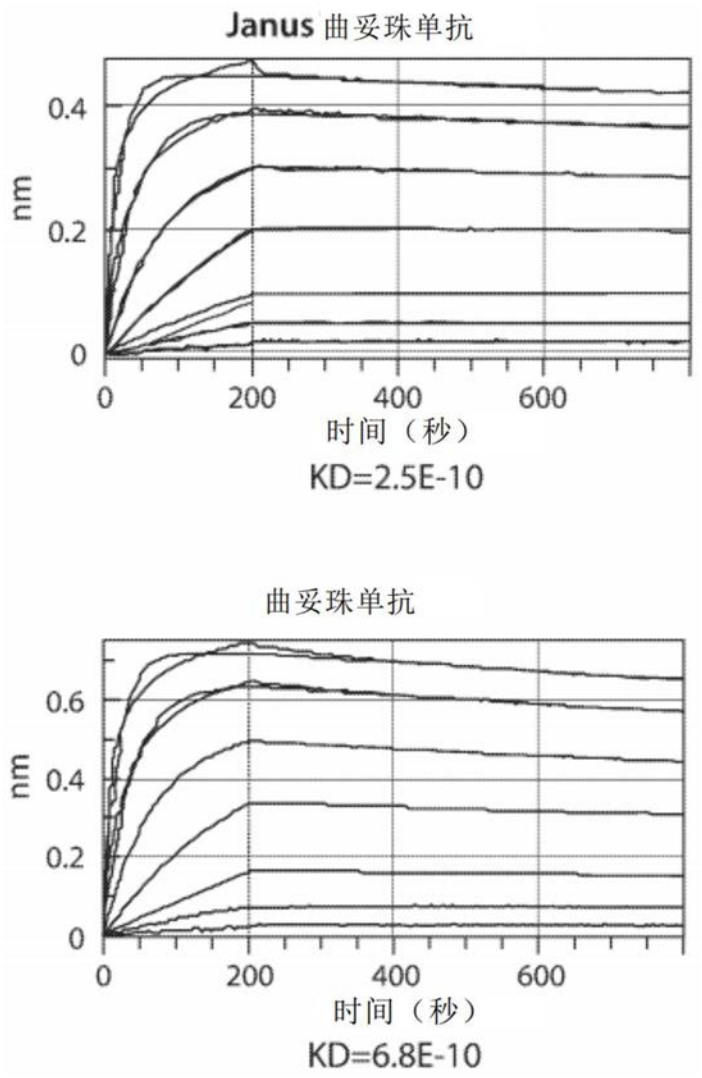
Janus 曲妥珠单抗
nm
0.4
0.2
0
0
200
400
600
时间（秒）
KD=2.5E-10
曲妥珠单抗
nm
0.6
0.4
0.2
0
0
200
400
600
时间（秒）
KD=6.8E-10

图15

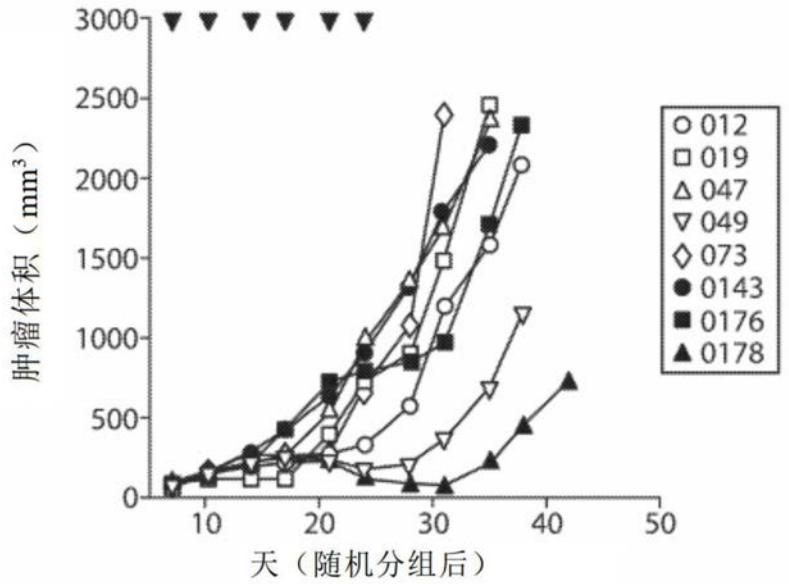
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积（mm³）
10
20
30
40
50
天（随机分组后）
012
019
047
049
073
0143
0176
0178

图16A

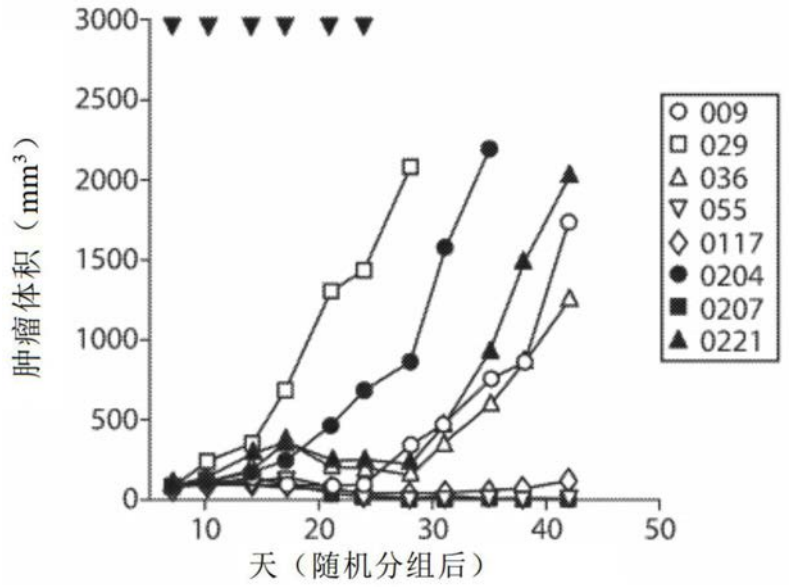
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积（mm³）
10
20
30
40
50
天（随机分组后）
009
029
036
055
0117
0204
0207
0221

图16B

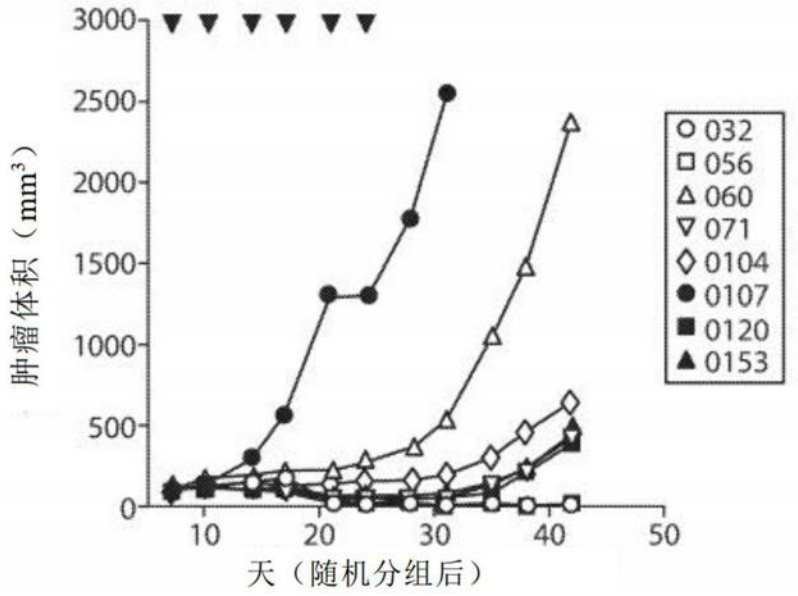
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
肿瘤体积（mm³）
天（随机分组后）
032
056
060
071
0104
0107
0120
0153

图16C

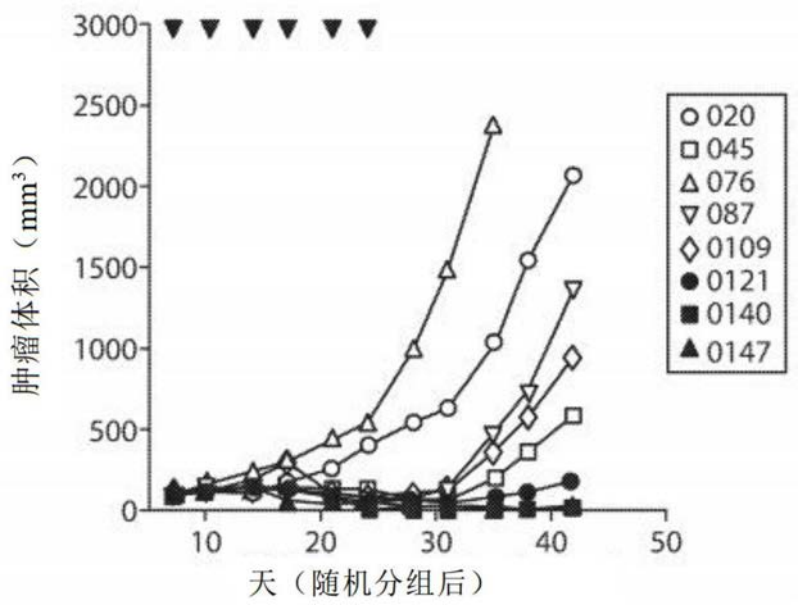
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
肿瘤体积（mm³）
天（随机分组后）
020
045
076
087
0109
0121
0140
0147

图16D

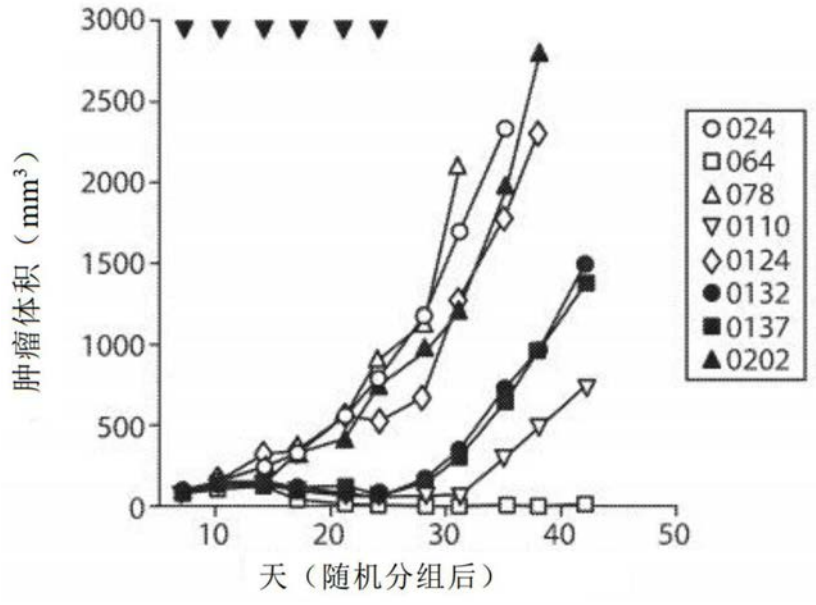
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
肿瘤体积（mm³）
天（随机分组后）
024
064
078
0110
0124
0132
0137
0202

图17A

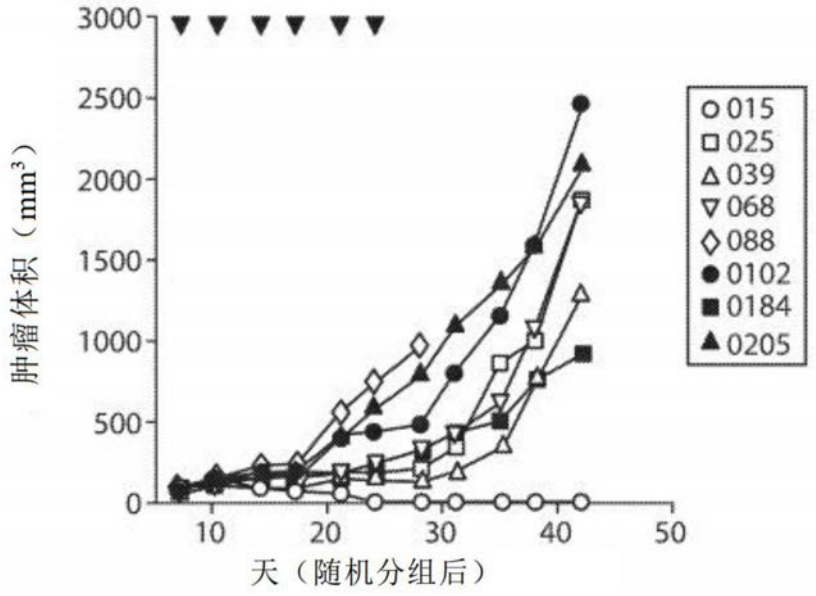
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
肿瘤体积（mm³）
天（随机分组后）
015
025
039
068
088
0102
0184
0205

图17B

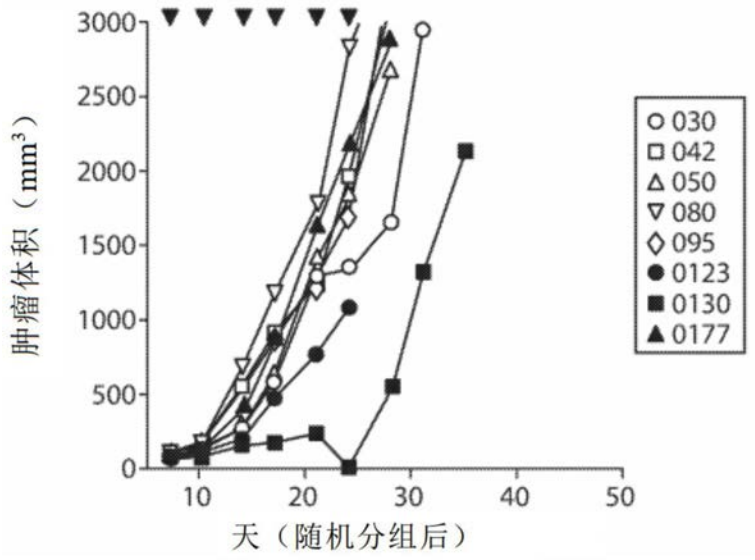
肿瘤体积（mm³）
天（随机分组后）
030
042
050
080
095
0123
0130
0177

图17C

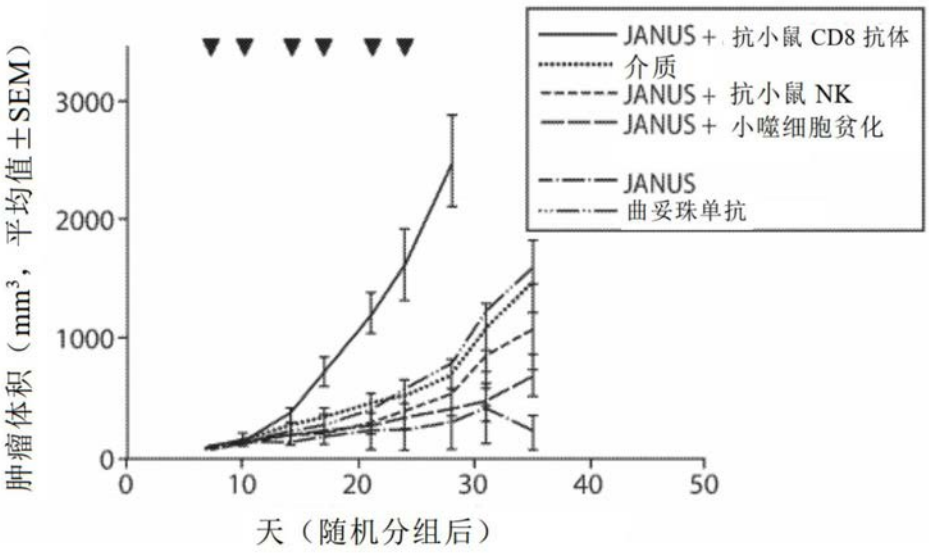
肿瘤体积（mm³，平均值±SEM）
天（随机分组后）
JANUS + 抗小鼠 CD8 抗体
介质
JANUS + 抗小鼠 NK
JANUS + 小噬细胞贫化
JANUS
曲妥珠单抗

图17D

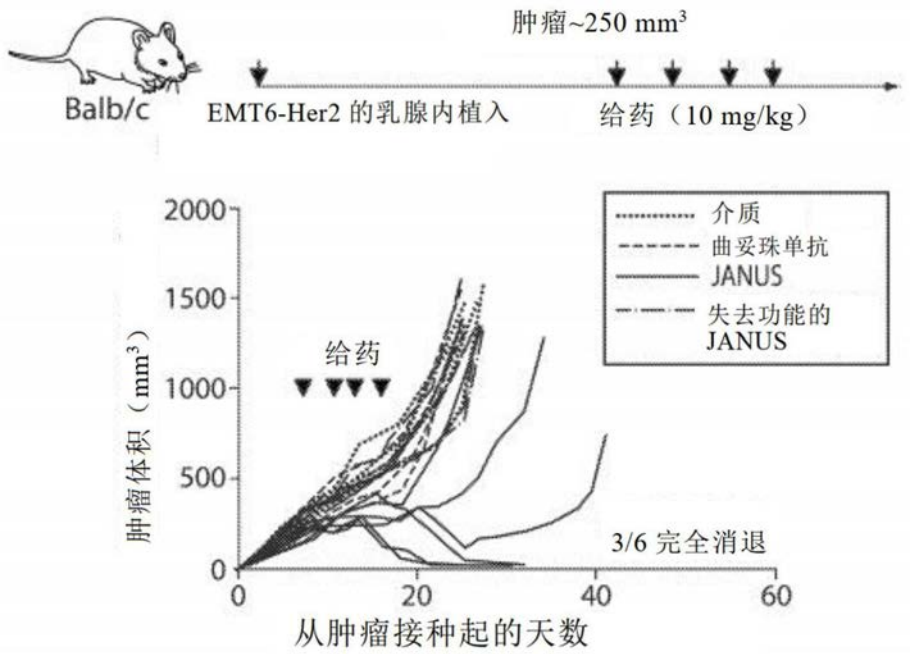
肿瘤~250 mm³
Balb/c
EMT6-Her2 的乳腺内植入
给药（10 mg/kg）
介质
曲妥珠单抗
JANUS
失去功能的 JANUS
给药
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
3/6 完全消退
0
20
40
60
从肿瘤接种起的天数

图18A

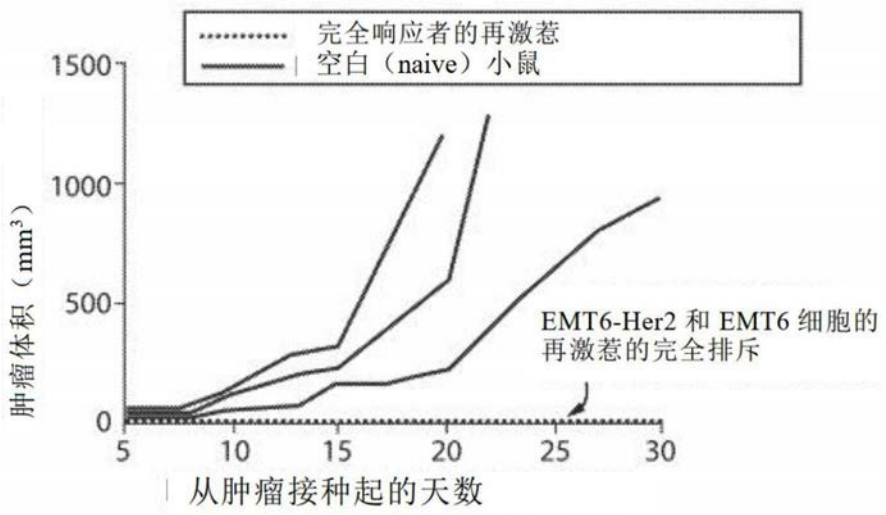
完全响应者的再激惹
空白（naive）小鼠
肿瘤体积（mm³）
1500
1000
500
0
EMT6-Her2 和 EMT6 细胞的再激惹的完全排斥
5
10
15
20
25
30
从肿瘤接种起的天数

图18B

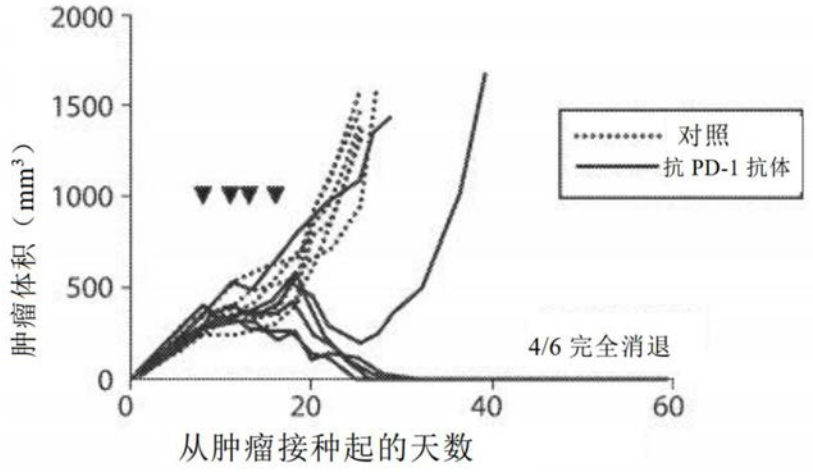
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积（mm³）
0
20
40
60
从肿瘤接种起的天数
对照
抗 PD-1 抗体
4/6 完全消退

图19A

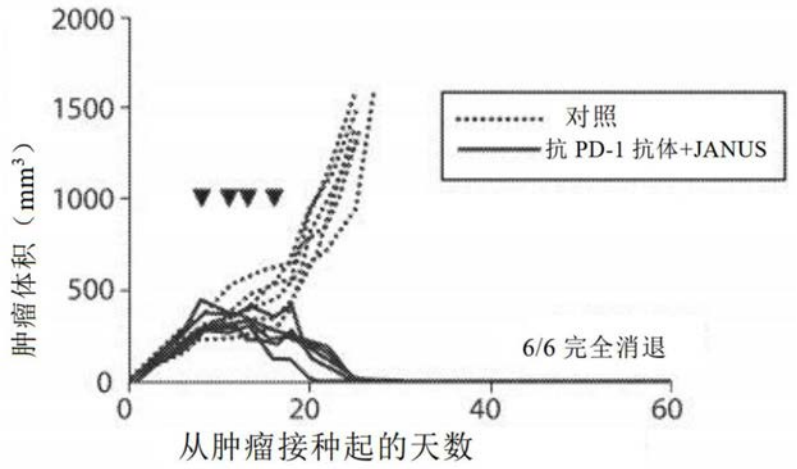
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积（mm³）
0
20
40
60
从肿瘤接种起的天数
对照
抗 PD-1 抗体+JANUS
6/6 完全消退

图19B

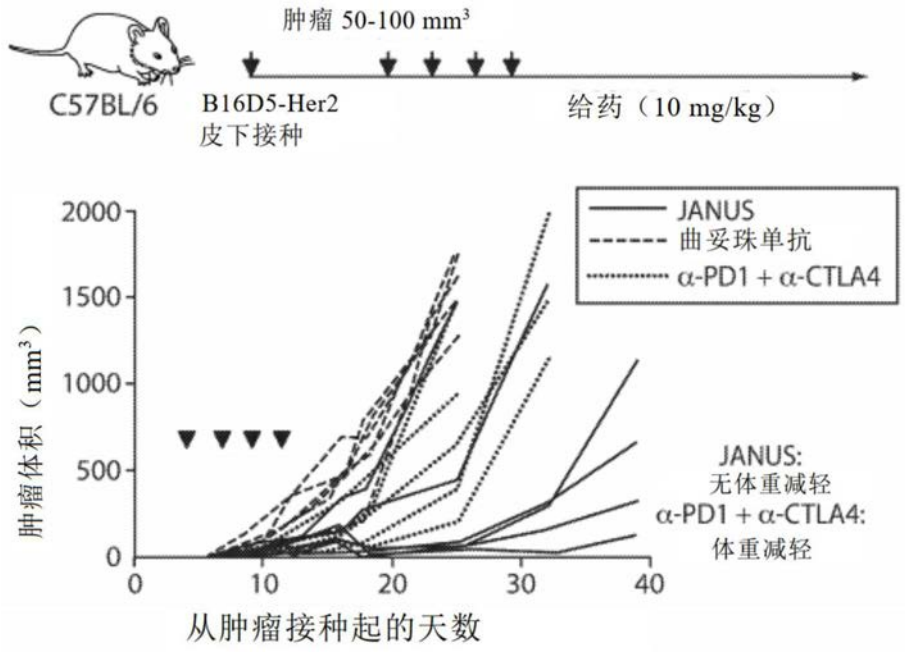
肿瘤 50-100 mm³
C57BL/6
B16D5-Her2
皮下接种
给药（10 mg/kg）
JANUS
曲妥珠单抗
α-PD1 + α-CTLA4
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
从肿瘤接种起的天数
JANUS:
无体重减轻
α-PD1 + α-CTLA4:
体重减轻

图20

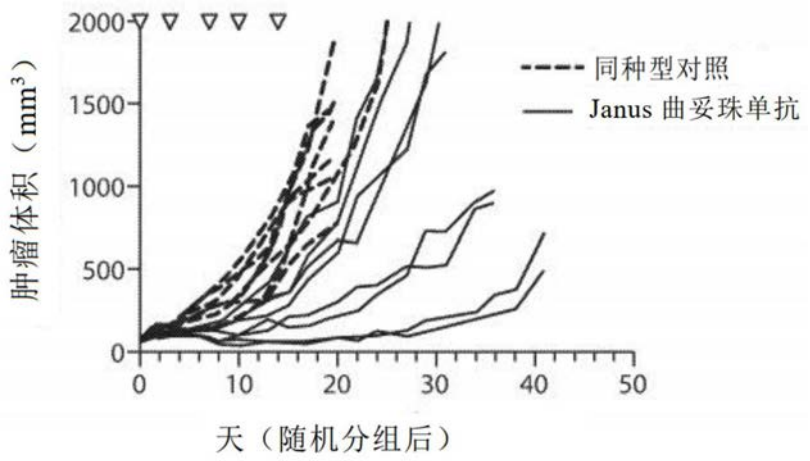
同种型对照
Janus 曲妥珠单抗
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
天（随机分组后）

图21

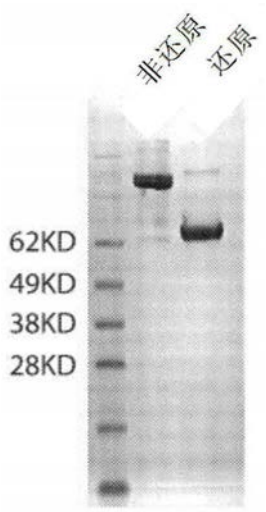
非还原
还原
62KD
49KD
38KD
28KD

图22A

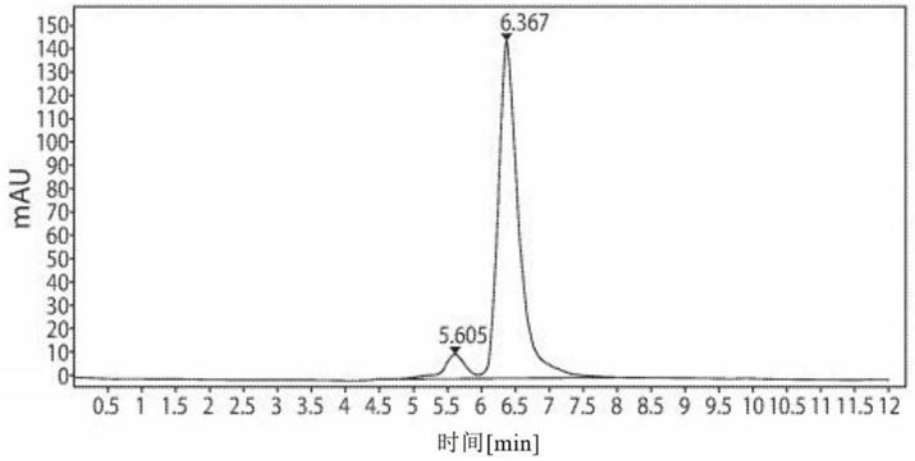
6.367
5.605
mAU
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 9 9.5 10 10.5 11 11.5 12
时间[min]

图22B

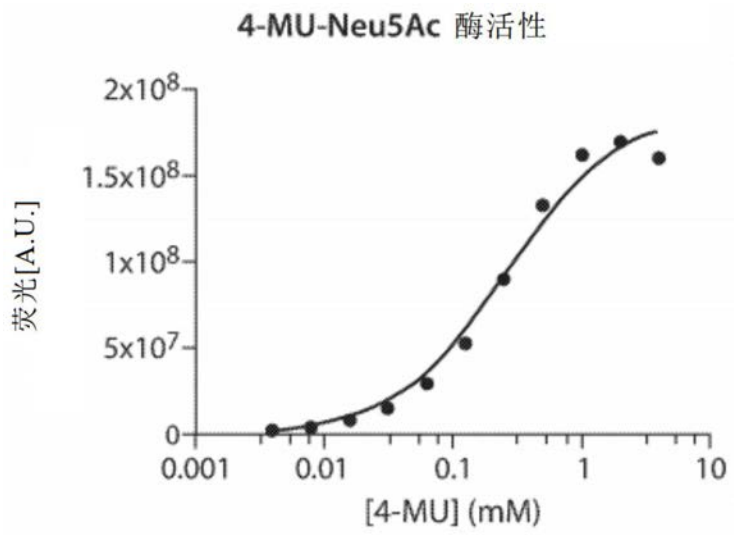
4-MU-Neu5Ac 酶活性
2x10^8
1.5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
荧光[A.U.]
0.001
0.01
0.1
1
10
[4-MU] (mM)

图23

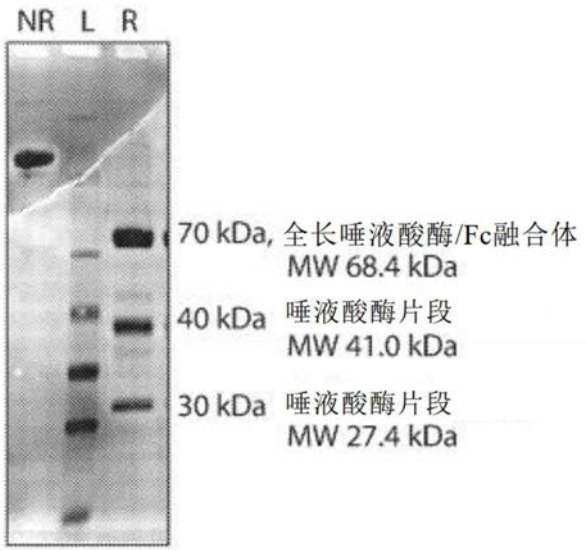
NR L R
70 kDa, 全长唾液酸酶/Fc融合体
MW 68.4 kDa
40 kDa 唾液酸酶片段
MW 41.0 kDa
30 kDa 唾液酸酶片段
MW 27.4 kDa

图24A

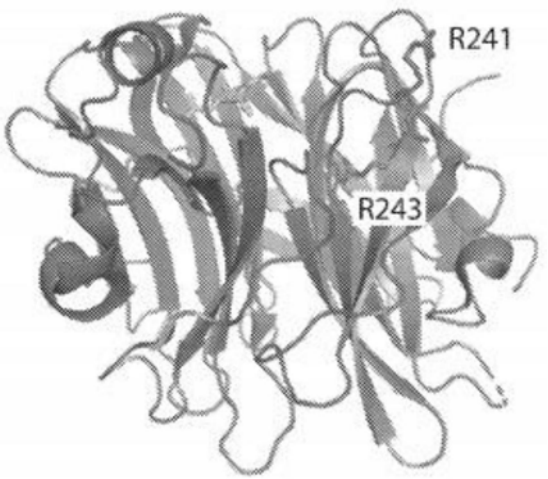

图24B

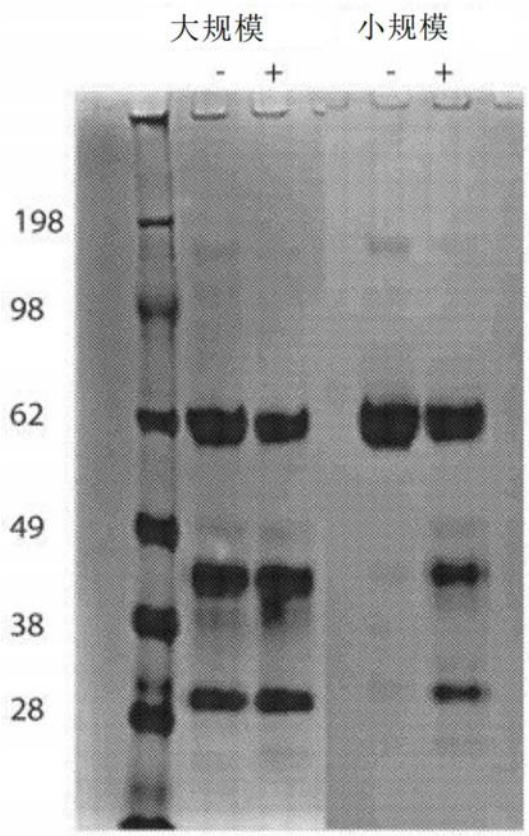

图25

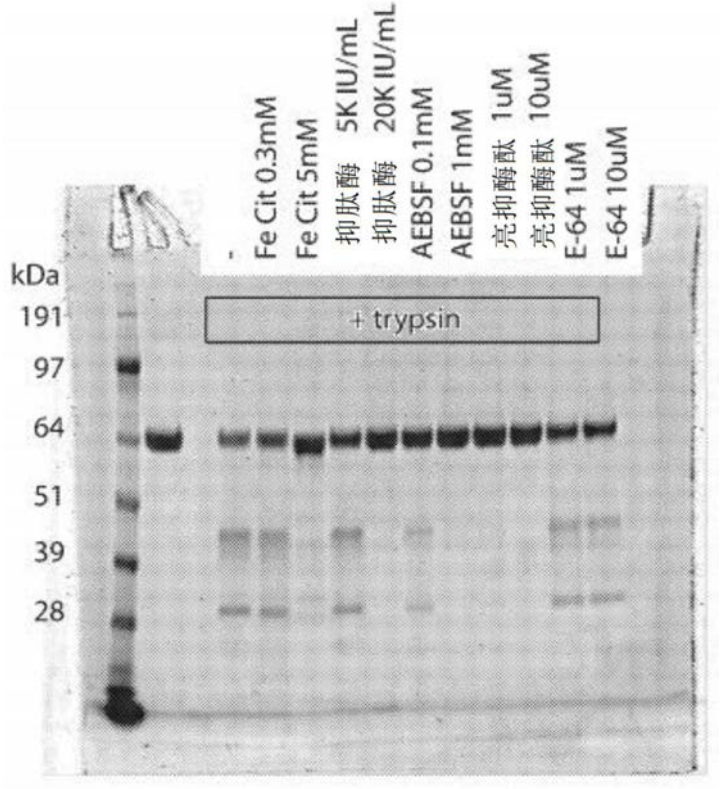
kDa
191
97
64
51
39
28
-
Fe Cit 0.3mM
Fe Cit 5mM
抑肽酶 5K IU/mL
抑肽酶 20K IU/mL
AEBSF 0.1mM
AEBSF 1mM
亮抑酶酞 1uM
亮抑酶酞 10uM
E-64 1uM
E-64 10uM
+ trypsin

图26

		P2	P1	P1′	
240	241	242	243	244	245
L	R	A	R	V	Q
		C			
			K		
				I	
				P	
		C		K	
		R		R	
		R		H	
		T		P	
		Y		P	
		N		P	

图27

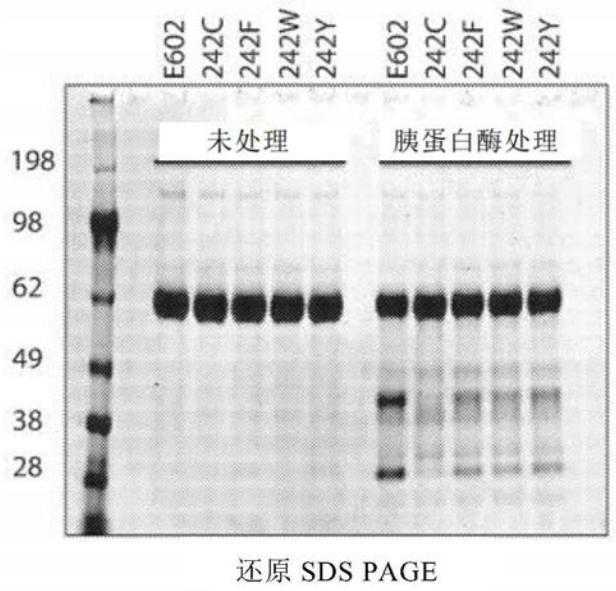

图28A

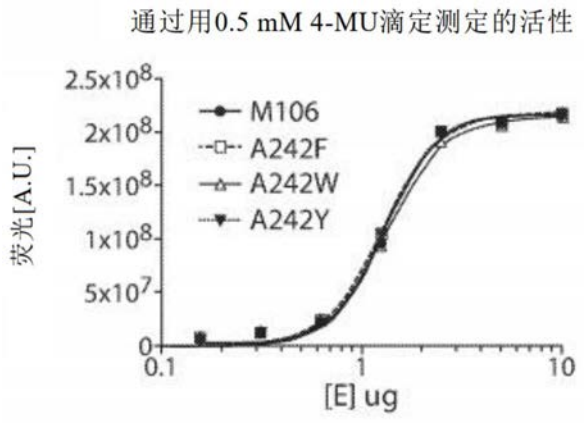
通过用0.5 mM 4-MU滴定测定的活性
2.5x10^8
2x10^8
1.5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
荧光[A.U.]
M106
A242F
A242W
A242Y
0.1
1
10
[E] ug

图28B

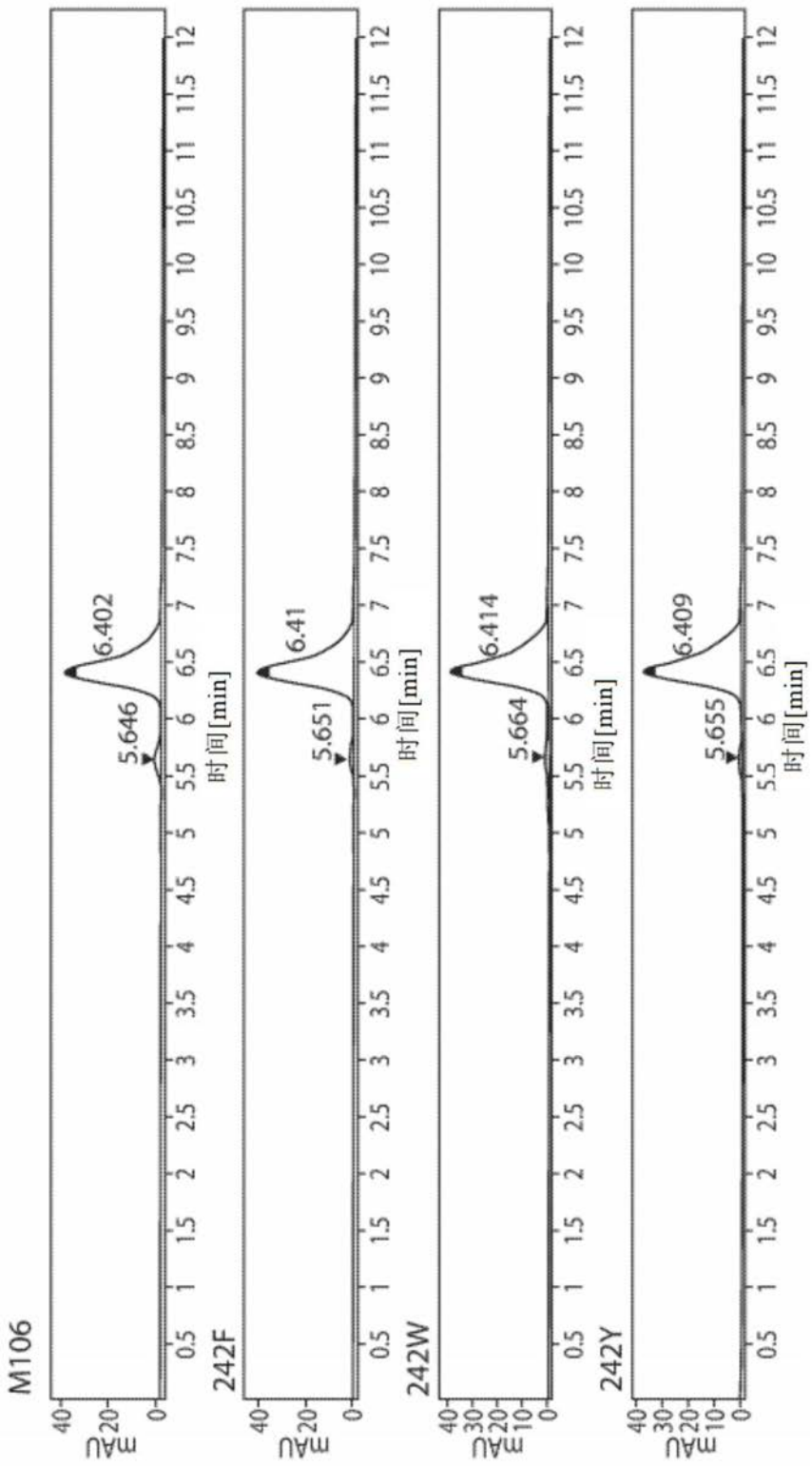
M106
6.402
5.646
242F
6.41
5.651
242W
6.414
5.664
242Y
6.409
5.655
mAU
时间[min]

图28C

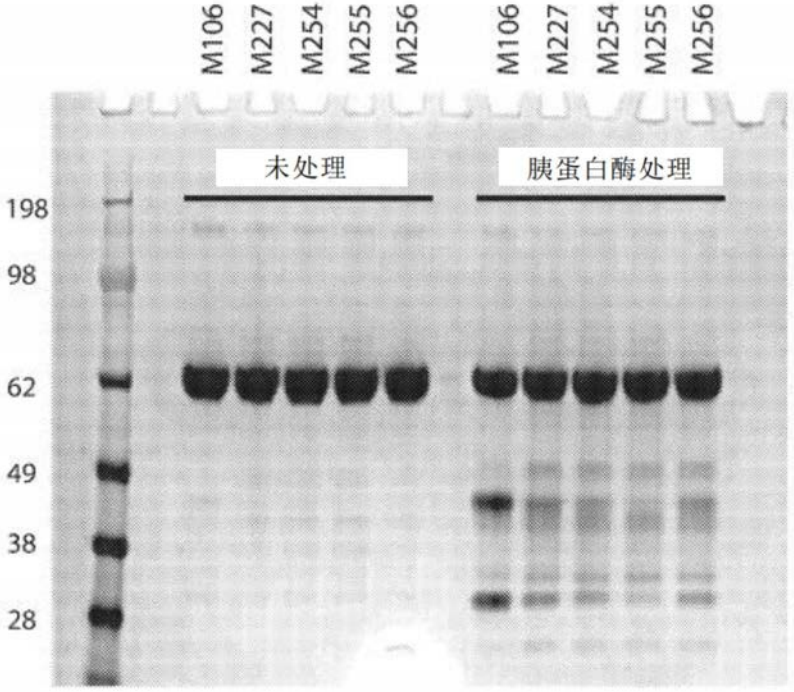
M106
M227
M254
M255
M256
M106
M227
M254
M255
M256
未处理
胰蛋白酶处理
198
98
62
49
38
28

图29