



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118510536 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202280086174.7

(22) 申请日 2022.11.11

(30) 优先权数据

63/263,917 2021.11.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/079681 2022.11.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/086913 EN 2023.05.19

(71) 申请人 泰克托尼治疗股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·迪纳 A·克鲁斯

F·格鲁斯维茨

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 秦剑

(51) Int.Cl.

A61K 38/22 (2006.01)

C07K 14/64 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书6页 说明书90页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

松弛素-2融合蛋白类似物及其使用方法

(57) 摘要

松弛素-2表现出强的抗纤维化活性。然而,由于松弛素的体内半衰期有限,必须每14至21天重复治疗患者一次,因此必须以连续输注的方式进行化合物施用至少48小时。此外,松弛素-2的合成很困难。由于B链的溶解度低,并且需要在A链和B链之间费力地、特异性地引入半胱氨酸桥,因此通过这些方法获得的活性肽的产量极低。需要一种具有更长半衰期和更易于生产的工程化松弛素-2类似物。本公开提供了具有增强的体内半衰期的松弛素-2融合蛋白类似物及其制备方法。本文还公开了使用本文所述的松弛素-2融合蛋白类似物治疗松弛素-2相关病症或疾病的方法。

1. 一种融合蛋白, 其从N-端到C-端包含,
第一肽;
连接肽; 以及
第二肽,
其中:

(a) 所述第一肽包含与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列, 并且所述第二肽包含与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列; 或者

所述第一肽包含与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列, 并且所述第二肽包含与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列;

(b) 所述连接肽包含具有12至15个氨基酸、包括2至5个酸性氨基酸和10至13个非酸性氨基酸的氨基酸序列; 并且

(c) 所述融合蛋白的pI为6.0至8.2。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白, 其中所述连接肽包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 195至199,

其中 R_1 为非酸性氨基酸并且 R_2 为酸性氨基酸。

3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白, 其中所述酸性氨基酸为天门冬氨酸或谷氨酸。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的融合蛋白, 其中所述酸性氨基酸为谷氨酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的融合蛋白, 其中所述非酸性氨基酸为甘氨酸、脯氨酸或丝氨酸。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的融合蛋白, 其中所述非酸性氨基酸为甘氨酸。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的融合蛋白, 其中所述连接肽包含以下项中的一者或多者的氨基酸序列: SEQ ID NO: 14、15、16、17或18。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的融合蛋白, 其中所述连接肽包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 19至23。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一肽包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列, 其中 X_3 为甲硫氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺, 并且其中 X_4 为甲硫氨酸或赖氨酸。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一肽包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列, 其中 X_5 为精氨酸或不存在, X_6 为亮氨酸或天门冬氨酸, 并且其中 X_7 为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸。

11. 根据权利要求1至8或10中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第二肽包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列, 其中 X_3 为甲硫氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺, 并且其中 X_4 为甲硫氨酸或赖氨酸。

12. 根据权利要求1至9中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第二肽包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列, 其中 X_5 为精氨酸或不存在, X_6 为亮氨酸或天门冬氨酸, 并且其中 X_7 为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸。

13. 根据权利要求1至9或12中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一肽包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 5至7。

14. 根据权利要求1至8、10或11中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二肽包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:5至7。

15. 根据权利要求1至8、10、11或14中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:8至13。

16. 根据权利要求1至9、12或13中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二肽包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:8至13。

17. 根据权利要求1至9、12、13或16中任一项所述的融合蛋白,其中
所述第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

所述第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;或者

所述第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第二肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

18.根据权利要求1至8、10、11、14或15中任一项所述的融合蛋白,其中

所述第二肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

所述第二肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;或者

所述第二肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述第一肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

19.根据权利要求1至9、12、13、16或17中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:25至48。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的融合蛋白,所述融合蛋白进一步包含IgG Fc。

21.根据权利要求20所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc在EU位置234和235处包含氨基酸丙氨酸。

22.根据权利要求20或21所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc在EU位置329处包含氨基酸丙氨酸。

23.根据权利要求20至22中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc在EU位置234、235和329处包含氨基酸丙氨酸。

24.根据权利要求20至23中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc在EU位置234、235、329、428和434处分别包含氨基酸丙氨酸、丙氨酸、丙氨酸、亮氨酸和丝氨酸。

25.根据权利要求20至23中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc在EU位置433、434和436处分别包含氨基酸赖氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

26.根据权利要求20至25中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc在EU位置252、254和256处分别包含氨基酸酪氨酸、苏氨酸和谷氨酸。

27.根据权利要求20至26中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc在EU位置428和434处分别包含氨基酸亮氨酸和丝氨酸。

28.根据权利要求20所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc包含与人IgG1 Fc的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

29.根据权利要求28所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc包含人IgG1 Fc的氨基酸序列。

30.根据权利要求29所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc包含与选自以下项组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:50至52和201至203。

31.根据权利要求29所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:50至52和201至203。

32.根据权利要求20至31中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc连接至所述第一肽的N-端。

33.根据权利要求20至31中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc连接至所述第二肽的C-端。

34.根据权利要求1至9、12、13、16、17或19中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:53至85和204至211。

35.根据权利要求1至9、12、13、16、17或19中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:86至118和214至221。

36.根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽和第二肽不包含选自以下项组成的组的肽的氨基酸序列:SEQ ID NO:187至190。

37.一种融合蛋白,其包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:53至118和204至225。

38.一种多核苷酸,其包含编码根据权利要求1至37中任一项所述的融合蛋白的核苷酸

序列。

39. 根据权利要求38所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸为RNA分子。
40. 根据权利要求38所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸为DNA分子。
41. 一种表达载体,其包含根据权利要求38至40中任一项所述的多核苷酸。
42. 根据权利要求41所述的表达载体,其中所述表达载体为质粒。
43. 根据权利要求41所述的表达载体,其中所述表达载体为病毒载体。
44. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求38至40中任一项所述的多核苷酸、或根据权利要求41至42中任一项所述的表达载体。
45. 根据权利要求44所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞为原核细胞。
46. 根据权利要求44所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞为真核细胞。
47. 根据权利要求45所述的宿主细胞,其中所述原核细胞为大肠杆菌细胞或芽孢杆菌细胞。
48. 根据权利要求46所述的宿主细胞,其中所述真核细胞选自由以下项组成的组:酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。
49. 根据权利要求48所述的宿主细胞,其中所述哺乳动物细胞选自由以下项组成的组:CHO细胞、海拉细胞和293细胞。
50. 一种细胞群,其包含根据权利要求44至49中任一项所述的宿主细胞中的两者或更多者。
51. 一种生产根据权利要求1至37中任一项所述的融合蛋白的方法,所述方法包括在使得产生所述融合蛋白的条件下培养根据权利要求44至49中任一项所述的宿主细胞。
52. 一种药物组合物,其包含有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的融合蛋白、或根据权利要求38至40中任一项所述的多核苷酸、或根据权利要求41至43中任一项所述的表达载体。
53. 一种增强原代细胞中的松弛素-2相关活性的方法,所述方法包括使所述原代细胞与根据权利要求1至37中任一项所述的融合蛋白接触,从而增强所述细胞中的松弛素-2相关活性。
54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述融合蛋白激活细胞表面上的松弛素-2受体(RXFP1)。
55. 根据权利要求53或54所述的方法,其中所述方法提升所述原代细胞中的cAMP水平,从而诱导血管舒张、诱导血管生成因子的表达、诱导MMP的表达并且诱导胶原降解。
56. 根据权利要求53至55中任一项所述的方法,其中所述原代细胞选自由以下项组成的组:内皮细胞、血管平滑肌细胞、其他血管细胞、心肌细胞、其他心脏细胞和成纤维细胞。
57. 根据权利要求53至56中任一项所述的方法,其中所述原代细胞在受试者体内。
58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述受试者患有松弛素2相关病症。
59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述松弛素2相关病症选自由以下项组成的组:肾脏疾病、纤维化疾病和心血管疾病。
60. 根据权利要求59的方法,其中所述病症选自由以下项组成的组:局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、糖尿病肾病、肝肾综合征、硬皮病、特发性肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化、NASH、扩张型心肌病、舒张性心力衰竭、肺动脉高压、慢性心力衰竭、急性心力衰竭、充血性

心力衰竭、冠状动脉疾病、高血压和先兆子痫。

61. 一种治疗有此需要的受试者中的松弛素相关病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的融合蛋白、根据权利要求38至40中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求41至43中任一项所述的表达载体、或根据权利要求52所述的药物组合物,从而治疗所述松弛素相关病症。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述松弛素2相关病症选自由以下项组成的组:肾脏疾病、纤维化疾病和心血管疾病。

63. 根据权利要求62的方法,其中所述病症选自由以下项组成的组:局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、糖尿病肾病、肝肾综合征、硬皮病、特发性肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化、NASH、扩张型心肌病、舒张性心力衰竭、肺动脉高压、慢性心力衰竭、急性心力衰竭、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、高血压和先兆子痫。

64. 根据权利要求61至63中任一项所述的方法,其中所述方法降低动脉压、增加肾动脉血流量、增加舒张期心脏充盈、消除已形成的纤维化或抑制新的纤维化发展。

65. 一种试剂盒,其包含有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的融合蛋白、根据权利要求38至40中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求41至43中任一项所述的表达载体、或根据权利要求52所述的药物组合物,以及使用说明。

松弛素-2融合蛋白类似物及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2021年11月11日提交的美国临时专利申请号63/263,917的优先权,该临时专利申请的全部公开内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,并特此通过引用以其全文并入本文(创建于2022年11月11日的所述ASCII副本名为“TECW-002_SL_ST26_2022-11-11”,并且大小为284,217字节)。

技术领域

[0005] 本公开提供了具有改善的药代动力学特性的松弛素-2融合蛋白类似物、用于制备这些融合蛋白的方法以及使用这些融合蛋白来增强受试者中的松弛素-2相关活性并治疗或预防松弛素-2相关疾病的方法。

背景技术

[0006] 松弛素-2具有很强的抗纤维化活性。在受伤的组织中,成纤维细胞活化和增殖引起增加的胶原蛋白产生和间质纤维化。心脏纤维化因生物力学超负荷而加剧,并影响心室功能障碍、重构和心律失常形成。然而,由于松弛素体内半衰期有限,患者的治疗必须每14至21天重复一次,其中化合物施用必须以连续输注进行至少48小时。此外,松弛素-2的合成也很困难。由于B链的溶解度低,并且需要在A链与B链之间费力地、特异性地引入半胱氨酸桥,因此通过这些方法获得的活性肽的产率极低。

[0007] 需要一种具有更长半衰期和更容易生产的工程化松弛素-2类似物。

发明内容

[0008] 本公开提供了具有改善的药代动力学特性的工程化松弛素-2类似物的融合蛋白。本公开还提供了使用这些融合蛋白来增强受试者中松弛素-2相关活性并治疗或预防松弛素-2相关疾病的方法。

[0009] 本文提供了一种融合蛋白,其从N-端到C-端包含第一肽;连接肽;以及第二肽,其中第一肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列,并且第二肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列;或者,第一肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列,并且第二肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列相比时在0、1、2、3、4或5个氨基酸处不同的氨基酸序列;连接肽包含具有12至15个氨基酸、包括2至5个酸性氨基酸和10至13个非酸性氨基酸的氨基酸序列;并且融合蛋白的pI为6.0至8.2。

[0010] 在一些实施例中,连接肽包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:

[0011] $R_1R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1$ (SEQ ID NO:195);

[0012] $R_1R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1R_1$ (SEQ ID NO:196);

[0013] $R_1R_1R_2R_1R_1R_1R_2R_2R_1R_1R_1R_2R_1R_1$ (SEQ ID NO:197);

[0014] $R_1R_1R_1R_2R_2R_1R_1R_1R_2R_2R_1R_1R_1$ (SEQ ID NO:198); 以及

[0015] $R_1R_1R_2R_1R_2R_1R_1R_2R_1R_2R_1R_1R_1$ (SEQ ID NO:199),

[0016] 其中 R_1 为非酸性氨基酸并且 R_2 为酸性氨基酸。

[0017] 在一些实施例中,酸性氨基酸为天门冬氨酸或谷氨酸。在一些实施例中,酸性氨基酸为谷氨酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸为甘氨酸、脯氨酸或丝氨酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸为甘氨酸。

[0018] 在一些实施例中,连接肽包含以下项中的一者或多者的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、15、16、17或18。在一些实施例中,连接肽包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19至23。

[0019] 在一些实施例中,第一肽包含DSWX₃EEVIKLCGRELVRAQIAICGX₄ST (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中 X_3 为甲硫氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺,并且其中 X_4 为甲硫氨酸或赖氨酸。在一些实施例中,第一肽包含 X_5 QX₆YSALANKCCHVGCTKRSLAX₇FC (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,其中 X_5 为精氨酸或不存在, X_6 为亮氨酸或天冬氨酸,并且其中 X_7 为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸。

[0020] 在一些实施例中,第二肽包含DSWX₃EEVIKLCGRELVRAQIAICGX₄ST (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中 X_3 为甲硫氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺,并且其中 X_4 为甲硫氨酸或赖氨酸。在一些实施例中,第二肽包含 X_5 QX₆YSALANKCCHVGCTKRSLAX₇FC (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,其中 X_5 为精氨酸或不存在, X_6 为亮氨酸或天门冬氨酸,并且其中 X_7 为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸。

[0021] 在一些实施例中,第一肽包括选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:5至7。在一些实施例中,第二肽包括选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:5至7。在一些实施例中,第一肽包括选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:8至13。在一些实施例中,第二肽包括选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:8至13。

[0022] 在一些实施例中,第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;第一肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID

N0:12的氨基酸序列;或者,第一肽包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列并且第二肽包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施例中,第二肽包含SEQ ID N0:5的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:8的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:5的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:9的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:5的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:10的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:5的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:11的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:5的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:5的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:8的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:9的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:10的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:11的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:8的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:9的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:10的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:11的氨基酸序列;第二肽包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列;或者,第二肽包含SEQ ID N0:7的氨基酸序列并且第一肽包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施例中,融合蛋白包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID N0:25至48。

[0025] 在一些实施例中,第一肽由选自由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID N0:5至7。在一些实施例中,第二肽由选自由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID N0:5至7。在一些实施例中,第一肽由选自由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID N0:8至13。在一些实施例中,第二肽由选自由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID N0:8至13。

[0026] 在一些实施例中,第一肽由SEQ ID N0:5的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:8的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:5的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:9的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:5的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:10的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:5的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:11的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:5的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:12的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:5的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:13的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:6的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:8的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:6的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:9的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:6的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:10的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:6的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:11的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:6的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID N0:12的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID N0:6的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID

NO:13的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成;第一肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;或者,第一肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第二肽由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。

[0027] 在一些实施例中,第二肽由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成;第二肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;或者,第二肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成并且第一肽由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。

[0028] 在一些实施例中,融合蛋白还包含IgG Fc。在一些实施例中,IgG Fc在EU位置234和235处包含氨基酸丙氨酸。在一些实施例中,IgG Fc在EU位置329处包含氨基酸丙氨酸。在一些实施例中,IgG Fc在EU位置234、235和329处包含氨基酸丙氨酸。在一些实施例中,IgG Fc在EU位置234、235、329、428和434处分别包含氨基酸丙氨酸、丙氨酸、丙氨酸、亮氨酸和丝氨酸。在一些实施例中,IgG Fc在EU位置433、434和436处分别包含氨基酸赖氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。在一些实施例中,IgG Fc在EU位置252、254和256处分别包含氨基酸酪氨酸、苏氨酸和谷氨酸。在一些实施例中,IgG Fc在EU位置428和434处分别包含氨基酸亮氨酸和丝氨酸。

[0029] 在一些实施例中,IgG Fc包含与人IgG1 Fc的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,IgG Fc包含人IgG1 Fc的氨基酸序列。在一些实施例中,IgG Fc包含与选自由以下项组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:50至52和201至203。在一些实施例中,IgG Fc包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:50至52和201至203。

[0030] 在一些实施例中,IgG Fc连接至第一肽的N-端。在一些实施例中,IgG Fc连接至第二肽的C-端。

[0031] 在一些实施例中,融合蛋白包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:53至85和204至211。在一些实施例中,融合蛋白包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:86至118和214至221。

[0032] 在一些实施例中,融合蛋白由选自由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:53至85和204至211。在一些实施例中,融合蛋白由选自由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:86至118和214至221。

[0033] 在一些实施例中,第一肽和第二肽不包含选自由以下项组成的组的肽的氨基酸序列:

[0034] DSWKEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTAS (SEQ ID NO:187);

[0035] DSWKEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTWS (SEQ ID NO:188);

[0036] DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTAS (SEQ ID NO:189);以及

[0037] DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTWS (SEQ ID NO:190)。

[0038] 本文还提供了一种融合蛋白,其包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:53至118和204至225。在一些实施例中,融合蛋白由选自由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:53至118和204至225。

[0039] 本文还提供了一种多核苷酸,其包含编码上文和本文提供的任何融合蛋白的核苷酸序列。在一些实施例中,多核苷酸为RNA分子。在一些实施例中,多核苷酸为DNA分子。

[0040] 本文还提供了一种表达载体,其包含上文和本文所述的任何多核苷酸。在一些实施例中,表达载体为质粒。在一些实施例中,表达载体为病毒载体。

[0041] 本文还提供了一种宿主细胞,其包含上文和本文所述的任何多核苷酸或表达载体。在一些实施例中,宿主细胞为原核细胞。在一些实施例中,宿主细胞为真核细胞。在一些实施例中,原核细胞为大肠杆菌细胞或芽孢杆菌细胞。在一些实施例中,真核细胞选自由以下项组成的组:酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。在一些实施例中,哺乳动物细胞选自由以下项组成的组:CHO细胞、海拉细胞和293细胞。

[0042] 本文还提供了一种细胞群,其包含上文和本文所述的任何宿主细胞的两者或更多者。

[0043] 本文还提供了一种生产上文和本文所述的任何融合蛋白的方法,其包括在使得生产融合蛋白的条件下培养上文和本文所述的任何宿主细胞。

[0044] 本文还提供了一种药物组合物,其包含有效量的上文和本文所述的任何融合蛋白、或上文和本文所述的任何多核苷酸、或上文和本文所述的任何表达载体。

[0045] 本文还提供了一种增强原代细胞中的松弛素-2相关活性的方法,其包括使原代细胞与上文和本文中所述的任何融合蛋白接触,从而增强细胞中的松弛素-2相关活性。在一些实施例中,融合蛋白激活细胞表面上的松弛素-2受体RXFP1。在一些实施例中,该方法提升原代细胞中的cAMP水平,从而诱导血管舒张、诱导血管生成因子的表达、诱导MMP的表达并且诱导胶原降解。在一些实施例中,原代细胞选自由以下项组成的组:内皮细胞、血管平滑肌细胞、其他血管细胞、心肌细胞、其他心肌细胞和成纤维细胞。在一些实施例中,原代细胞在受试者体内。在一些实施例中,受试者患有松弛素-2相关病症。在一些实施例中,松弛

素-2相关病症选自由以下项组成的组:肾脏疾病、纤维化疾病和心血管疾病。在一些实施例中,病症选自由以下项组成的组:局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、糖尿病肾病、肝肾综合征、硬皮病、特发性肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化、NASH、扩张型心肌病、舒张性心力衰竭、肺动脉高压、慢性心力衰竭、急性心力衰竭、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、高血压和先兆子痫。

[0046] 本文还提供了治疗有此需要的受试者中的松弛素相关病症的方法,其包括向受试者施用有效量的上文和本文所述的任何融合蛋白、上文和本文所述的任何多核苷酸、上文和本文所述的任何表达载体、或上文和本文所述的任何药物组合物,从而治疗松弛素相关病症。在一些实施例中,松弛素-2相关病症选自由以下项组成的组:肾脏疾病、纤维化疾病和心血管疾病。在一些实施例中,病症选自由以下项组成的组:局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、糖尿病肾病、肝肾综合征、硬皮病、特发性肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化、NASH、扩张型心肌病、舒张性心力衰竭、肺动脉高压、慢性心力衰竭、急性心力衰竭、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、高血压和先兆子痫。在一些实施例中,该方法降低动脉压、增加肾动脉血流量、增加舒张期心脏充盈、消除已形成的纤维化或抑制新的纤维化发展。

[0047] 本文还提供了一种试剂盒,该试剂盒包含有效量的上文和本文所述的任何融合蛋白、上文和本文所述的任何多核苷酸、上文和本文所述的任何表达载体或上文和本文所述的任何药物组合物,以及使用说明。

具体实施方式

[0048] 本公开提供了一种融合蛋白,该融合蛋白包含通过肽接头接合的人松弛素-2B链或其衍生物、以及人松弛素-2A链或其衍生物,其中所述融合蛋白在向哺乳动物施用时具有高体内循环半衰期。在一些实施例中,本公开提供的融合蛋白的体内循环半衰期大于2小时。在一些实施例中,本公开中提供的融合蛋白具有低pI。在一些实施例中,本公开中提供的融合蛋白的pI小于8.5。在一些实施例中,本公开中提供的融合蛋白的低pI是由肽接头中存在的酸性氨基酸残基引起的。在一些实施例中,融合蛋白的肽接头包含2个或更多个酸性氨基酸。在一些实施例中,肽接头的总长度为10至15个氨基酸。

[0049] 定义

[0050] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与所主张的主题所属领域中技术人员通常理解的相同含义。应当理解,前面的一般描述和以下详细描述仅是示范性和说明性的,而非对所主张的任何主题的限制。在本申请中,除非另外特别说明,否则单数的使用包含复数。必须注意,如在说明书和所附权利要求中所使用,单数形式“一个/一种(a和an)”和“所述(the)”包含复数指示物,除非上下文另外清楚地指示。在本申请中,除非另外说明,否则“或者”的使用是指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及诸如“包括(include)”、“包括(includes)”和“包括(included)”的其他形式的使用不是限制性的。本文中使用的章节标题仅出于组织目的,而不应被解释为对所描述的主题进行限制。

[0051] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指DNA或RNA的聚合物。多核苷酸序列可以是单链的或双链的;含有天然、非天然或改变的核苷酸;并且含有天然、非天然或改变的核苷酸间键合,诸如氨基磷酸酯键合或硫代磷酸酯键合,而非在未经修饰的多核苷酸序列的核苷酸之间发现的磷酸二酯。多核苷酸序列包括但不限于通过本领域可用的任何手段获得的所有

多核苷酸序列,包括但不限于重组手段,例如从重组文库或细胞基因组克隆多核苷酸序列,使用普通克隆技术和聚合酶链式反应等,以及通过合成手段。

[0052] 术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用并且是指通过一个或多个肽键连接的氨基酸聚合物。如本文所用,“氨基酸序列”是指描述构成多肽的氨基酸残基的相对顺序和相同的信息。

[0053] 如本文所使用的,关于氨基酸序列的术语“在1个或多个氨基酸处不同的氨基酸序列”是指与参考氨基酸序列相比包含至少一个氨基酸残基的取代、改变、倒位、添加或缺失的氨基酸序列。

[0054] 可以使用数学算法来实现对两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的“相同百分比”的测定。用于比较两个序列的数学算法的具体、非限制性实例是Karlin S和Altschul S F, (1990)PNAS 87:2264-2268的算法,如Karlin S和Altschul SF, (1993)PNAS 90:5873-5877中进行修改,这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。此类算法被并入Altschul SF等人, (1990)J Mol Biol 215:403的NBLAST和XBLAST程序中,该文献通过引用以其全文并入本文。可以用NBLAST核苷酸程序参数集(例如,以分数=100,字长=12)执行BLAST核苷酸搜索,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序参数集(例如,以分数=50,字长=3)执行BLAST蛋白搜索,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位的比对,可以如Altschul S F等人, (1997)Nuc Acids Res 25:3389-3402中所述使用间隙BLAST,该文献通过引用以其全文并入本文。可替代地,PSI BLAST可用于执行检测分子之间的距离关系的迭代搜索。Id.当利用BLAST、间隙BLAST和PSI BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如,万维网上的国家生物技术信息中心(NCBI), ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一具体、非限制性实例是Myers和Miller, (1988)CABIOS 4:11-17的算法,该文献通过引用以其全文并入本文。将这种算法并入到ALIGN程序(第2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12以及空位罚分4。

[0055] 在容许或不容许空位的情况下,可使用类似于以上所述的那些技术的技术,确定两个序列之间的相同百分比。在计算相同百分比时,通常仅对确切的匹配进行计数。

[0056] 如本文所用,术语“连接至”是指两个分子或部分之间的共价或非共价结合。技术人员将理解,当第一分子或部分连接至第二分子或部分时,该连接不需要是直接的,而是可以通过插入分子或部分实现。

[0057] 如本文所使用的,术语“人松弛素-2B链”或“松弛素B链”或“松弛素B”或“rel B”是指包含以下项或由以下项组成的肽或其衍生物:如DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:1)中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,松弛素B链的衍生物包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0058] 如本文所使用的,术语“人松弛素-2A链”或“松弛素A链”或“松弛素A”或“rel A”是指包含以下项或由以下项组成的肽或其衍生物:如QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:2)中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,松弛素A链的衍生物包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0059] 如本文所使用的,术语“连接肽”是指连接本文所述的融合蛋白中的松弛素A链和

松弛素B链的肽。

[0060] 如本文所用,术语“酸性氨基酸”是指在其侧链中具有羧酸的氨基酸。在一些实施例中,酸性氨基酸是天门冬氨酸、谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基丁酸或2-氨基庚二酸。在一些实施例中,酸性氨基酸包括天门冬氨酸和谷氨酸。

[0061] 如本文所使用的,术语“非酸性氨基酸”是指不是酸性氨基酸的氨基酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸包括甘氨酸、脯氨酸和丝氨酸。在一些实施例中,非特异性氨基酸还包括精氨酸、组氨酸、赖氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0062] 如本文所使用的,术语“IgG Fc”是指免疫球蛋白G (IgG) 片段可结晶 (Fc) 区。在一些实施例中,IgG Fc是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区。在一些实施例中,IgG Fc是IgG1 Fc区。

[0063] 如本文所使用的,术语“EU编号系统”是指针对抗体恒定区的EU编号规则,如Edelman,G.M.等人,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85 (1969) 和Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Dept.Health and Human Services,第5版,1991中所描述的,这些文献的每一者均引用以其全文并入本文。

[0064] 如本文所使用的,术语“松弛素-2受体”、“人松弛素-2受体”、“人松弛素受体1”、“RXFP1”或“LGR7”是人类松弛素-2的天然受体。在一些实施例中,RXFP1包含以下NCBI参考序列中所示的氨基酸序列:NP_067647.2、NP_001240656.1、NP_001240657.1、NP_001240658.1、NP_001240659.1、NP_001240661.1、NP_001240662.1或NP_001350705.1,这些序列通过引用引用以其全文并入本文。

[0065] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”是指本文描述的治疗或预防措施。在一些实施例中,“治疗”方法采用向患有疾病或病症或者易患有此类疾病或病症的受试者施用融合蛋白,以便预防、治愈、延迟、疾病或病症或者复发性疾病或病症、减轻其严重程度或改善其一种或多种症状,或者以便延长受试者的存活期,超过在不存在此类治疗的情况下所预期的存活期。

[0066] 如本文所用,术语“有效量”在向受试者施用疗法的上下文中是指实现期望的预防或治疗效果的疗法的量。

[0067] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人的动物。在一个实施例中,受试者是人或非人的动物。在一个实施例中,受试者是人。

[0068] 如本文所使用的,术语“pI”是指等电点,即,融合蛋白上的下一个电荷为零时的溶液的pH。在一些实施例中,pI是计算的或理论的pI。在一些实施例中,pI通过仪器实验性地测量。

[0069] 融合蛋白

[0070] 本发明提供了包含通过肽接头连接的人松弛素-2B链或其衍生物和人松弛素-2A链或其衍生物的融合蛋白,其中融合蛋白在向哺乳动物施用时具有高的体内循环半衰期。在一些实施例中,融合蛋白从N-端到C-端包含人松弛素-2B链或其衍生物、肽接头和人松弛素-2A链或其衍生物。在一些实施例中,融合蛋白从N-端到C-端包含人松弛素-2A链或其衍生物、肽接头和人松弛素-2B链或其衍生物。在一些实施例中,融合蛋白还包含IgG Fc。IgG Fc连接至人松弛素B链-接头蛋白-人松弛素A链融合蛋白、或人松弛素A链-接头蛋白-人松

弛素B链融合蛋白的N-端或C-端。在一些实施例中,上述IgG Fc被PEG所替代。

[0071] 人松弛素-2B链衍生物

[0072] 本公开提供了人松弛素-2B链衍生物,其中该衍生物与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相比时具有1、2、3、4或5个氨基酸变化。在一些实施例中,与SEQ ID NO:1的位置13对应的氨基酸必须为精氨酸。在一些实施例中,与SEQ ID NO:1的位置17对应的氨基酸必须为精氨酸。在一些实施例中,与SEQ ID NO:1的位置20对应的氨基酸必须为异亮氨酸。在一些实施例中,与SEQ ID NO:1的位置13对应的氨基酸必须为精氨酸;与SEQ ID NO:1的位置17对应的氨基酸必须为精氨酸;并且与SEQ ID NO:1的位置20对应的氨基酸必须为异亮氨酸。

[0073] 在一些实施例中,人松弛素-2B链衍生物包含下式或由下式组成: DSWX₃EEVIKLCGRELVRQAICGX₄ST (SEQ ID NO:3),其中X₃和X₄不存在或为任何氨基酸。在一些实施例中,X₃为甲硫氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺,并且X₄为甲硫氨酸或赖氨酸。在一些实施例中,X₄为赖氨酸。

[0074] 在一些实施例中,本文描述的融合蛋白中使用的人松弛素-2B链衍生物不包括SEQ ID NO:187至190的氨基酸序列。

[0075] 在一些实施例中,人松弛素-2B链衍生物的长度为22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或32个氨基酸。在一些实施例中,人松弛素-2B链衍生物的长度为25、26、27、28或29个氨基酸。在一些实施例中,人松弛素-2B链衍生物的长度为27个氨基酸。

[0076] 在一些实施例中,人松弛素-2B链衍生物包含下表1中所示的氨基酸序列或由下表1中所示的氨基酸序列组成。

[0077] 表1.人松弛素-2B链衍生物序列

[0078]	SEQ ID NO:	氨基酸序列
	5	DSWKEEVIKLCGRELVRQAICGKST
	6	DSWMEEVIKLCGRELVRQAICGKST
	7	DSWQEEVIKLCGRELVRQAICGKST

[0079] 人类松弛素-2A链衍生物

[0080] 本公开提供了人松弛素-2A链衍生物,其中该衍生物与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相比时具有1、2、3、4或5个氨基酸变化。在一些实施例中,与SEQ ID NO:2的位置3对应的氨基酸必须为赖氨酸。在一些实施例中,与SEQ ID NO:2的位置23对应的氨基酸必须为苯丙氨酸。在一些实施例中,与SEQ ID NO:2的位置3对应的氨基酸必须为赖氨酸;并且与SEQ ID NO:2的位置23对应的氨基酸必须为苯丙氨酸。

[0081] 在一些实施例中,人松弛素-2A链衍生物包含下式或由下式组成: X₅QX₆YSALANKCCHVGCTKRSLAX₇FC (SEQ ID NO:4),其中X₅、X₆和X₇不存在或为任何氨基酸。在一些实施例中,X₅为精氨酸或不存在,X₆为亮氨酸或天门冬氨酸,并且X₇为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸。

[0082] 在一些实施例中,人松弛素-2A链衍生物的长度为19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。在一些实施例中,人松弛素-2A链衍生物的长度为22、23、24、25或26个氨基酸。在一些实施例中,人松弛素-2A链衍生物的长度为24个氨基酸。在一些实施例中,人松弛素-2A链衍生物的长度为25个氨基酸。

[0083] 在一些实施例中,人松弛素-2A链衍生物包含下表2中所示的氨基酸序列或由下表

2中所示的氨基酸序列组成。

[0084] 表2.人松弛素-2 A链衍生物序列

[0085]	SEQ ID NO:	氨基酸序列
	8	RQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
	9	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
	10	RQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
	11	RQLYSALANKCCHVGCTKRSLAEFC
	12	RQDYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
[0086]	13	RQDYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0087] 连接肽

[0088] 本公开提供了连接肽,其中所述肽具有至少两个酸性氨基酸。在一些实施例中,酸性氨基酸为谷氨酸。在一些实施例中,酸性氨基酸为天门冬氨酸。在一些实施例中,酸性氨基酸为非标准氨基酸。在一些实施例中,酸性氨基酸为2-氨基己二酸、2-氨基丁酸或2-氨基庚二酸。在一些实施例中,连接肽具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个酸性氨基酸。

[0089] 在一些实施例中,连接肽的长度是8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。在一些实施例中,连接肽的长度为12、13、14或15个氨基酸。在一些实施例中,连接肽具有2、3、4或5个酸性氨基酸。在一些实施例中,连接肽的长度为12、13、14或15个氨基酸并且具有2、3、4或5个酸性氨基酸。在一些实施例中,剩余的氨基酸是非酸性氨基酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸可以为不是天门冬氨酸或谷氨酸的任何标准氨基酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸可以是在其侧链中不具有羧酸的任何氨基酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸是甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸是甘氨酸、脯氨酸或半胱氨酸。在一些实施例中,非酸性氨基酸是甘氨酸。

[0090] 在一些实施例中,连接肽包含酸性氨基酸,其中所有酸性氨基酸是相同的氨基酸。在一些实施例中,连接肽中的酸性氨基酸均为谷氨酸。在一些实施例中,连接肽中的酸性氨基酸均为天门冬氨酸。在一些实施例中,连接肽包含为酸性氨基酸的混合物的氨基酸。在一些实施例中,连接肽包含谷氨酸和天门冬氨酸作为酸性氨基酸。

[0091] 在一些实施例中,连接肽包含选自以下项组成的组的氨基酸序列:

[0092] $R_1R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1$ (SEQ ID NO:195);

[0093] $R_1R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_1R_1$ (SEQ ID NO:196);

[0094] $R_1R_1R_2R_1R_1R_2R_2R_1R_1R_2R_1R_1$ (SEQ ID NO:197);

[0095] $R_1R_1R_1R_2R_2R_1R_1R_2R_2R_1R_1$ (SEQ ID NO:198);以及

[0096] $R_1R_1R_2R_1R_2R_1R_2R_1R_2R_1R_1$ (SEQ ID NO:199),

[0097] 其中 R_1 为非酸性氨基酸并且 R_2 为酸性氨基酸。

[0098] 在一些实施例中,连接肽包含非酸性氨基酸,其中所有非酸性氨基酸是相同的氨基酸。在一些实施例中,连接肽中的非酸性氨基酸均为甘氨酸。在一些实施例中,连接肽包含为非酸性氨基酸的混合物的氨基酸。在一些实施例中,连接肽包含2、3、4、5、6、7、8、9或10

种不同类型的非酸性氨基酸。

[0099] 在一些实施例中,连接肽包含下表3中所示的氨基酸序列或由下表3中所示的氨基酸序列组成。

[0100] 表3.连接肽序列

[0101]	SEQ ID NO:	氨基酸序列
	14	GGGE
	15	GEGE
	16	GGEG
	17	GEGG
	18	GGEE
	19	GGGEGGGEGGGEG
	20	GGGEGGGEGGGEGGG
	21	GEGGGEEGGGEGG
	22	GGGEEGGGEEGGG
	23	GGEGEGGEGEGGS

[0102] 在一些实施例中,连接肽包含SEQ ID NO:14、15、16、17或18的2、3、4或5个重复序列。例如,SEQ ID NO:14的3个重复序列将是GGGEGGGEGGGEG (SEQ ID NO:24) 的氨基酸序列。

[0103] 用于融合蛋白的松弛素/连接肽组合

[0104] 在一些实施例中,融合蛋白包含N-端或第一肽、连接肽以及C-端或第二肽。在一些实施例中,N-端肽包含人松弛素-2A链或其衍生物,并且C-端肽包含人松弛素-2B链或其衍生物。在一些实施例中,N-端肽包含人松弛素-2B链或其衍生物,并且C-端肽包含人松弛素-2A链或其衍生物。人松弛素-2A链或其衍生物的任何实施例与通过本文公开的任何连接肽连接的人松弛素-2A链或其衍生物的任何组合可以用于构建融合的实施例本文描述的蛋白质。在一些实施例中,N-端肽和C-端肽中的至少一种是人松弛素-2A链或人松弛素-2B链的衍生物。在一些实施例中,N-端肽包含人松弛素-2A链衍生物并且C-端肽包含人松弛素-2B链衍生物。在一些实施例中,N-端肽包含人松弛素-2B链衍生物并且C-端肽包含人松弛素-2A链衍生物。本发明提供的融合蛋白的具体实施例如下表4所示。

[0105] 表4.融合蛋白

[0106]

B-SEQ ID NO: 19-A			B-SEQ ID NO: 20-A		
N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO	N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO
5	19	8	5	20	8
6	19	8	6	20	8
7	19	8	7	20	8
5	19	9	5	20	9
6	19	9	6	20	9
7	19	9	7	20	9
5	19	10	5	20	10
6	19	10	6	20	10
7	19	10	7	20	10
5	19	11	5	20	11
6	19	11	6	20	11
7	19	11	7	20	11
5	19	12	5	20	12
6	19	12	6	20	12
7	19	12	7	20	12
5	19	13	5	20	13
6	19	13	6	20	13
7	19	13	7	20	13

[0107] 表4.继续

[0108]

B-SEQ ID NO: 21-A			B-SEQ ID NO: 22-A		
N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO	N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO
5	21	8	5	22	8
6	21	8	6	22	8
7	21	8	7	22	8
5	21	9	5	22	9
6	21	9	6	22	9
7	21	9	7	22	9
5	21	10	5	22	10

[0109]

6	21	10	6	22	10
7	21	10	7	22	10
5	21	11	5	22	11
6	21	11	6	22	11
7	21	11	7	22	11
5	21	12	5	22	12
6	21	12	6	22	12
7	21	12	7	22	12
5	21	13	5	22	13
6	21	13	6	22	13
7	21	13	7	22	13

[0110] 表4.继续

[0111]

B-SEQ ID NO: 23-A			A-SEQ ID NO: 19-B		
N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO	N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO
5	23	8	8	19	5
6	23	8	8	19	6
7	23	8	8	19	7
5	23	9	9	19	5
6	23	9	9	19	6
7	23	9	9	19	7
5	23	10	10	19	5
6	23	10	10	19	6
7	23	10	10	19	7
5	23	11	11	19	5
6	23	11	11	19	6
7	23	11	11	19	7
5	23	12	12	19	5
6	23	12	12	19	6
7	23	12	12	19	7
5	23	13	13	19	5
6	23	13	13	19	6
7	23	13	13	19	7

[0112] 表4.继续

[0113]

A-SEQ ID NO: 20-B			A-SEQ ID NO: 21-B		
N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO	N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO
8	20	5	8	21	5
8	20	6	8	21	6
8	20	7	8	21	7
9	20	5	9	21	5
9	20	6	9	21	6
9	20	7	9	21	7
10	20	5	10	21	5
10	20	6	10	21	6
10	20	7	10	21	7
11	20	5	11	21	5
11	20	6	11	21	6
11	20	7	11	21	7
12	20	5	12	21	5
12	20	6	12	21	6
12	20	7	12	21	7
13	20	5	13	21	5
13	20	6	13	21	6
13	20	7	13	21	7

[0114] 表4.继续

[0115]

A-SEQ ID NO: 22-B			A-SEQ ID NO: 23-B		
N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO	N- 端 肽 的 SEQ ID NO	连 接 肽 的 SEQ ID NO	C- 端 肽 的 SEQ ID NO
8	22	5	8	23	5
8	22	6	8	23	6
8	22	7	8	23	7
9	22	5	9	23	5
9	22	6	9	23	6
9	22	7	9	23	7
10	22	5	10	23	5
10	22	6	10	23	6

[0116]

10	22	7	10	23	7
11	22	5	11	23	5
11	22	6	11	23	6
11	22	7	11	23	7
12	22	5	12	23	5
12	22	6	12	23	6
12	22	7	12	23	7
13	22	5	13	23	5
13	22	6	13	23	6
13	22	7	13	23	7

[0117] 在一些实施例中,N-端肽与连接肽之间存在额外的氨基酸。在一些实施例中,C-端肽与连接肽之间存在额外的氨基酸。在一些实施例中,N-端肽与连接肽之间不存在额外的氨基酸。在一些实施例中,C-端肽与连接肽之间不存在额外的氨基酸。

[0118] 在一些实施例中,包含N-端肽、连接肽和C-端肽的融合蛋白的部分包含下表5中所示的氨基酸序列或由下表5中所示的氨基酸序列组成。

[0119] 表5.用于融合蛋白的肽组合

[0120]

SEQ ID NO:	氨基酸序列
25	DSWKEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
26	DSWKEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
27	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
28	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
29	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
30	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
31	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0121]

32	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGQLYSALANK CCHVGCTKRSLARFC
33	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGQLYSALAN KCCHVGCTKRSLARFC
34	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGQLYSALANK CCHVGCTKRSLARFC
35	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANK CCHVGCTKRSLAQFC
36	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANK CCHVGCTKRSLARFC
37	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANK CCHVGCTKRSLAQFC
38	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANK CCHVGCTKRSLARFC
39	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANK CCHVGCTKRSLAQFC
40	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANK CCHVGCTKRSLARFC
41	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANK CCHVGCTKRSLAQFC
42	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQDYSALAN KCCHVGCTKRSLAQFC
43	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQDYSALAN KCCHVGCTKRSLARFC
44	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQDYSALAN KCCHVGCTKRSLAQFC
45	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGEGGEGEGGSRQLYSALANK CCHVGCTKRSLAQFC
46	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGEGGEGEGGSRQLYSALANK CCHVGCTKRSLARFC
47	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGEGGEGEGGSRQLYSALANK CCHVGCTKRSLAQFC
48	DSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGEGGEGEGGSRQDYSALANK CCHVGCTKRSLAQFC

[0122] IgG Fc

[0123] 在一些实施例中,本文提供的融合蛋白还包含IgG Fc。IgG Fc可以连接至N-端肽的N-末端或C-端肽的C-末端。IgG Fc可以直接连接至N-端肽或C-端肽,或者它们可以通过

IgG Fc接头连接至N-端肽或C-端肽。在一些实施例中,IgG Fc接头包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸或由1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸组成。在一些实施例中,IgG Fc接头包含1、2、3、4或5个氨基酸或由1、2、3、4或5个氨基酸组成。在一些实施例中,IgG Fc接头包含3或4个氨基酸或由3或4个氨基酸组成。在一些实施例中,IgG Fc接头包含GGG (SEQ ID NO: 193)的氨基酸序列或由GGG (SEQ ID NO: 193)的氨基酸序列组成。本领域已知,许多单克隆抗体中的C-端赖氨酸(K)是柔性的,并且经常在表达和纯化过程中被剪掉,而没有已知的活性损害。在一些实施例中,IgG Fc包含SEQ ID NO: 49至52之一的氨基酸序列,其中SEQ ID NO: 193作为在IgG Fc的C-端处的IgG Fc接头。在一些实施例中,IgG Fc包含SEQ ID NO: 200至203之一的氨基酸序列,其中SEQ ID NO: 193作为在IgG Fc的C-端处的IgG Fc接头。

[0124] 在一些实施例中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入根据EU编号系统编号的本文所述抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人IgG1的残基231至340)和/或CH3结构域(人IgG1的残基341至447))和/或铰链区中,以改变抗体的一种或多种功能特性,例如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。

[0125] 在某些实施例中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入Fc区(CH1结构域)的铰链区,使得铰链区中半胱氨酸残基的数量改变(例如,增加或减少),如例如美国专利号5,677,425,通过引用以其全文并入本文。改变CH1结构域的铰链区中的半胱氨酸残基的数量以例如促进轻链和重链的组装、或以改变(例如,增加或降低)抗体的稳定性。

[0126] 在一个具体实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn-结合片段(优选Fc或铰链-Fc结构域片段)中以改变(例如,减少或增加)抗体的体内半衰期。参见例如国际公开号W0 02/060919;W0 98/23289;和W0 97/34631;以及美国专利号5,869,046、6,121,022、6,277,375和6,165,745,其全部内容通过引用并入本文,例如将改变(例如,减少或增加)抗体体内半衰期的突变。在某些实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn-结合片段(优选Fc或铰链-Fc结构域片段)中以降低抗体的体内半衰期。在其他实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn-结合片段(优选Fc或铰链-Fc结构域片段)中以增加抗体的体内半衰期。在一个具体的实施例中,根据EU编号系统编号的抗体可以在第二恒定(CH2)结构域(人IgG1的残基231至340)和/或第三恒定(CH3)结构域(人IgG1的残基341至447)中具有一个或多个氨基酸突变(例如,取代)。在一个具体的实施例中,根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的IgG1的恒定区包含位置252处甲硫氨酸(M)向酪氨酸(Y)的取代、位置254处丝氨酸(S)向苏氨酸(T)的取代和位置256处的苏氨酸(T)向谷氨酸(E)的取代。参见,美国专利号7,658,921,其通过引用以其全文并入本文。与相同抗体的野生型版本相比,这种类型的突变IgG(称为“YTE突变体”)已被证明半衰期延长了四倍(参见,Dall’Acqua W F等人,(2006)J Biol Chem 281: 23514-24,其通过引用以其全文并入本文)。在某些实施例中,根据EU编号系统编号的抗体包含IgG恒定结构域,该IgG恒定结构域包含在位置251至257、285至290、308至314、385至389和428至436处的氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸取代。

[0127] 在某些实施例中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入根据EU编号系统编号的本文所述抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人IgG1的残基231至340)和/或CH3结构域(人IgG1的残基341至447))和/或铰链区,以增加或减少抗体对效应子细胞的表面上的Fc

受体(例如,经活化的Fc受体)的亲和力。抗体Fc区中降低或增加抗体对Fc受体的亲和力的突变以及将此类突变引入Fc受体或其片段的技术是本领域技术人员已知的。可以进行抗体的Fc受体中的突变以改变抗体对Fc受体的亲和力的实例描述于例如Smith P等人,(2012) PNAS109:6181-6186、美国专利号6,737,056和国际公开号WO 02/060919;WO 98/23289;以及WO 97/34631,所有这些均通过引用以它们的全文并入本文。

[0128] 在某些实施例中,抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中变体重链恒定区与Fc γ RIIB结合具有比野生型重链恒定区与Fc γ RIIB结合更高的亲和力。在某些实施例中,变体重链恒定区是变体人重链恒定区,例如变体人IgG1、变体人IgG2或变体人IgG4重链恒定区。在某些实施例中,根据EU编号系统,变体人IgG重链恒定区包含以下氨基酸突变中的一种或多种:G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E。在某些实施例中,根据EU编号系统,变体人IgG重链恒定区包含选自以下项组成的组的一组氨基酸突变:S267E和L328F;P238D和L328E;P238D和选自E233D、G237D、H268D、P271G和A330R组成的组的一个或多个取代;P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;G236D和S267E;S239D和S267E;V262E、S267E和L328F;以及V264E、S267E和L328F。在某些实施例中,Fc γ RIIB在选自以下项组成的组的细胞上表达:巨噬细胞、单核细胞、B细胞、树突细胞、内皮细胞和经活化的T细胞。

[0129] 在进一步的实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸取代引入IgG恒定结构域Fc区以改变抗体的效应子功能。例如,根据EU编号系统编号的、选自氨基酸残基234、235、236、237、239、243、267、292、297、300、318、320、322、328、330、332和396的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基取代,使得抗体具有针对效应子配体的经改变的亲和力,但是保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力被改变的效应子配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。此类方法在美国专利号5,624,821和5,648,260中有进一步的描述,这些专利的每一者通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可以减少循环抗体的Fc受体结合,从而增加肿瘤定位。参见,例如,美国专利号5,585,097和8,591,886,这些专利的每一者通过引用以其全文并入本文,用于描述删除或失活恒定结构域并由此增加肿瘤定位的突变。在某些实施例中,可以将一个或多个氨基酸取代引入本文所述抗体的Fc区中以去除Fc区上的潜在糖基化位点,这可以减少Fc受体结合(参见,例如Shields R L等人,(2001) J Biol Chem 276:6591-604,其通过引用以其全文并入本文)。在各种实施例中,可以在根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中进行一种或多种以下突变:N297A取代;N297Q取代;L234A取代;L234F取代;L235A取代;L235F取代;L235V取代;L237A取代;S239D取代;E233P取代;L234V取代;L235A取代;C236删除;P238A取代;S239D取代;F243L取代;D265A取代;S267E取代;L328F取代;R292P取代;Y300L取代;A327Q取代;P329A取代(PA);A332L取代;I332E取代;或P396L取代。

[0130] 在某些实施例中,可以在根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中产生选自D265A、P329A及其组合组成的组的突变。在某些实施例中,可以在根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中产生选自L235A、L237A及其组合组成的组的突变。在某些实施例中,可以在根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中产生选自S267E、L328F及其组合组成的组的突变。在某些实施例中,可以在根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中产生选自S239D、I332E、任选的A330L及其组合组成的组的突变。在某

些实施例中,可以在根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中产生选自由L235V、F243L、R292P、Y300L、P396L及其组合组成的组的突变。在某些实施例中,可以在根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中产生选自由S267E、L328F及其组合组成的组的突变。

[0131] 在一个具体的实施例中,根据EU编号系统编号的本文所述的抗体包含具有N297Q或N297A氨基酸取代的IgG1恒定结构域。在一个实施例中,根据EU编号系统编号的本文所述的抗体包含具有选自由D265A、P329A及其组合组成的组的突变的IgG1恒定结构域。在另一实施例中,根据EU编号系统编号的本文所述的抗体包含具有选自由L234A、L235A(LALA)及其组合组成的组的突变的IgG1恒定结构域。在另一实施例中,根据EU编号系统编号的本文所述的抗体包含具有选自由L234F、L235F、N297A及其组合组成的组的突变的IgG1恒定结构域。在某些实施例中,根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的恒定区中分别与人IgG1重链中的位置L234、L235和D265对应的位置中的氨基酸残基不是L、L和D。该方法在国际公开号W0 14/108483中详细描述,该文献通过引用以其全文并入本文。在一个具体实施例中,分别与根据EU编号系统编号的人IgG1重链中的位置L234、L235和D265对应的氨基酸是F、E和A;或A、A和A。

[0132] 在某些实施例中,选自根据EU编号系统编号的本文所述的抗体恒定区中氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基所取代,使得抗体改变了C1q结合、和/或减少了或消除了补体依赖性细胞毒性(CDC)。此类方法在美国专利号6,194,551(Idsogie等人)中进行了进一步的描述,其通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,对根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的CH2结构域的N-端区域中的氨基酸位置231至238内的一个或多个氨基酸残基进行改变,从而改变抗体固定补体的能力。该方法在国际公开号W0 94/29351中进一步描述,该文献通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,通过在以下位置处突变一个或多个氨基酸(例如,引入氨基酸取代)来修饰根据EU编号系统编号的本文所述的抗体的Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力、和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、328、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439。此类方法在国际公开号W0 00/42072中进行了进一步的描述,该文献通过引用以其全文并入本文。

[0133] 在一些实施例中,IgG Fc是IgG1 Fc或其衍生物。在一些实施例中,IgG Fc或IgG1Fc包含与IgG1 Fc的氨基酸序列至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,IgG Fc或IgG1 Fc包含与下表6中提供的氨基酸序列至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0134] 表6.IgG Fc氨基酸序列

[0135]

SEQ ID NO:	描述	序列
49	IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	IgG1 Fc LALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	IgG1 Fc LALA PA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	IgG1 Fc LALA PAL S	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
200	不含 C-端赖氨酸的 IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
201	不含 C-端赖氨酸的 IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV

[0136]

	酸的 IgG1 Fc LALA	VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
202	不含 C-端赖氨 酸的 IgG1 Fc LALA PA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
203	不含 C-端赖氨 酸的 IgG1 Fc LALA PA LS	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

[0137] 在一些实施例中,任何IgG Fc或其衍生物可以在使用或不使用IgG Fc接头的情況下连接至上表4或5中描述的任何实施例的N-端或C-端。在一些实施例中,人IgG1 Fc或其衍生物可以在使用或不使用IgG Fc接头的情況下连接至上表4或5中描述的任何实施例的N-端或C-端。在一些实施例中,人IgG1 Fc的氨基酸序列包括SEQ ID NO:49或200的氨基酸序列或由SEQ ID NO:49或200的氨基酸序列组成。在一些实施例中,人IgG1 Fc的衍生物包含与SEQ ID NO:49或200的氨基酸序列至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0138] 在一些实施例中,包含LALA突变的人IgG1 Fc或其衍生物可以在使用或不使用IgG Fc接头的情況下连接至上表4或5中描述的任何实施例的N-端或C-端。在一些实施例中,包含LALA突变的人IgG1 Fc的氨基酸序列包含SEQ ID NO:50或201的氨基酸序列或由SEQ ID NO:50或201组成。在一些实施例中,包含LALA突变的人IgG1Fc的衍生物包含与SEQ ID NO:50或201的氨基酸序列至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0139] 在一些实施例中,包含LALA PA突变的人IgG1 Fc或其衍生物可以在使用或不使用IgG Fc接头的情況下连接至上文表4或5中描述的任何实施例的N-端或C-端。在一些实施例中,包含LALAPA突变的人IgG1 Fc的氨基酸序列包含SEQ ID NO:51或202的氨基酸序列或由SEQ ID NO:51或202的氨基酸序列组成。在一些实施例中,包含LALA PA突变的人IgG1 Fc的衍生物包含与SEQ ID NO:51或202的氨基酸序列至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0140] 在一些实施例中,包含LALA PALS突变的人IgG1 Fc或其衍生物可以在使用或不使用IgG Fc接头的情況下连接至上表4或5中描述的任何实施例的N-端或C-端。在一些实施例中,包含LALAPA LS突变的人IgG1 Fc的氨基酸序列包含SEQ ID NO:52或203的氨基酸序列

或由SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:203的氨基酸序列组成。在一些实施例中,包含LALA PA LS突变的人IgG1 Fc的衍生物包含与SEQ ID NO:52或203的氨基酸序列至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施例中,融合蛋白包含下表7中所示的氨基酸序列或由下表7中所示的氨基酸序列组成。

[0142] 表7.融合蛋白氨基酸序列

[0143]

SEQ ID NO:	序列
53	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWKEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST GGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
54	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWKEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST GGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
55	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWMEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST GGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0144]

56	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST GGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
57	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
58	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWMEEVILKCGRELVRQAIAICGKST GGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
59	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST GGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
60	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
61	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC

[0145]

	VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKST GGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
62	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKST GGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
63	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTG GEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
64	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTG GEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
65	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKST GGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
66	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTG GGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
67	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

[0146]

	KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
68	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGG GEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
69	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
70	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGG GEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
71	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST GGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
72	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0147]

73	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST GGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
74	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
75	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
76	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGG GEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
77	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
78	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC

[0148]

	VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGG GEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
79	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTG GGEGGGEGGGEGGRQDYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
80	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGG GEGGGEGGGEGGRQDYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
81	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGG GEGGGEGGGEGGRQDYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
82	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTG GEGEGGEGEGGSRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
83	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGG EGEGGEGEGGSRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
84	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

[0149]

	KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGG EGEGGEGEGGSRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
85	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTG GEGEGGEGEGSRQDYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
191	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWKEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST ASDAAGANANAGARQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
192	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWKEEVIKLCGRELVRQAIAICGKST ASDAAGANANAGARQLYSALANKCCHVGCTKRSLAEFC
86	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWK EEVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGEGGGEGGGEGRQLYSALANKCCHVG CTKRSLARFC
87	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWK

[0150]

	EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHV GCTKRSLARFC
88	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSW M EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHV G CTKRSLARFC
89	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSW Q EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHV G CTKRSLARFC
90	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSW QE EVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHV GC TKRSLARFC
91	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSW M EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHV G GCTKRSLARFC
92	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SF

[0151]

	FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQ EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHV GCTKRSLARFC
93	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQE EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVG CTKRSLARFC
94	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWM EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVG CTKRSLARFC
95	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQ EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVG CTKRSLARFC
96	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWME EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGGQLYSALANKCCHVGC TKRSLARFC
97	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL

[0152]

	PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQE EVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGQLYSALANKCCHVGC TKRSLARFC
98	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQ EEVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVG CTKRSLAQFC
99	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQE EVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGC TKRSLAQFC
100	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQE EVIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGC TKRSLARFC
101	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEE VIKLCGRELVRAQIAICGKSTGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCT KRSLARFC
102	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

[0153]

	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGC TKRSLAQFC
103	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
104	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
105	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGC TKRSLARFC
106	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQEEVIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGGEGGGEGGRQLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC
107	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL

[0154]

	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHESYHQKSLSLSPGKGGSDSWQE EVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGC TKRSLAQFC
108	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAEPAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHESYHQKSLSLSPGGGSDSWQE EVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGC TKRSLARFC
109	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAEPAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHESYHQKSLSLSPGGGSDSWQEE VIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCT KRSLARFC
110	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAEPAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHESYHQKSLSLSPGGGSDSWQE EVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGC TKRSLAQFC
111	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAEPAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHESYHQKSLSLSPGGGSDSWQEE VIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGGEEGGGEEGGGRQLYSALANKCCHVGCT KRSLAQFC

[0155]

112	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQE EVIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGEGGEGGRQDYSALANKCCHVGCT TKRSLAQFC
113	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEE VIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGEGGEGGRQDYSALANKCCHVGCT KRSLARFC
114	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEE VIKLCGRELVRQAICGKSTGGGEGGEGGEGGRQDYSALANKCCHVGCT KRSLAQFC
115	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHSHYTQKSLSLSPGKGGSDSWQE EVIKLCGRELVRQAICGKSTGGEGEGGEGEGGSRQLYSALANKCCHVGCT KRSLAQFC
116	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHSHYTQKSLSLSPGGGSDSWQEE VIKLCGRELVRQAICGKSTGGEGEGGEGEGGSRQLYSALANKCCHVGCT

[0156]		KRSLARFC
	117	METDTLLLVVLLLVWPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHESLYSKLTSLQDSYSSNQV VIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGEGEGEGEGGSRQLYSALANKCCHVGCT KRSLAQFC
	118	METDTLLLVVLLLVWPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSHESLYSKLTSLQDSYSSNQV EVIKLCGRELVRQAIAICGKSTGGEGEGEGEGGSRQDYSALANKCCHVGC TKRSLAQFC

[0157] 如上表7所示, 在一些实施例中, IgG Fc 包含小鼠 IgG κ 信号序列, 其包含 METDTLLLVVLLLVWPGSTG (SEQ ID NO: 194) 的氨基酸序列。在一些实施例中使用了不同的信号序列。在一些实施例中, 一些实施例如表7所示, 所产生的融合蛋白上不存在信号序列。

[0158] 其他半衰期延长部分

[0159] 如本文所使用的, 术语“半衰期延长部分”包括非蛋白质半衰期延长部分 (例如, PEG 或 HES) 以及蛋白质半衰期延长部分 (例如, Fc 结构域)。在一些实施例中, 非蛋白质半衰期延长部分连接至本文所述的融合蛋白。在一些实施例中, 非蛋白质半衰期延长部分连接至融合蛋白而不是 IgG Fc。在一些实施例中, 非蛋白质半衰期延长部分连接至除 IgG Fc 之外的融合蛋白。

[0160] 充当非蛋白质半衰期延长部分的合适聚合物分子的实例包括选自以下组成的组的聚合物分子: 聚亚烷基氧化物 (PAO), 包括聚亚烷基二醇 (PAG), 例如聚乙二醇 (PEG) 和聚丙二醇 (PPG)、支化的 PEG; 羟烷基淀粉 (HAS), 例如羟乙基淀粉 (HES); 聚唾液酸 (PSA); 聚乙烯醇 (PVA); 聚羧酸酯、聚(乙烯基吡咯烷酮); 聚乙烯-共-马来酸酐; 聚苯乙烯-共-马来酸酐; 葡聚糖, 包括羧甲基-葡聚糖; 或适合于降低免疫原性和/或增加功能性体内半衰期和/或血清半衰期的任何其他生物聚合物。聚合物分子的另一实例是人白蛋白或另一种丰富的血浆蛋白。一般来说, 聚亚烷基二醇衍生的聚合物是生物相容性的、无毒的、非抗原性的、非免疫原性的、具有多种水溶性特性并且容易从生物体中排出。

[0161] 与例如多糖 (如葡聚糖) 相比, PEG 的优点是仅具有很少的能够交联的反应基团。特别是, 单功能 PEG、例如甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 因其偶联化学相对简单 (只有一个反应基团可用于与多肽上的附接基团缀合) 而受到关注。因此, 由于消除了交联的风险, 所得到的本文所述的缀合融合蛋白更加均一, 并且聚合物分子与变体多肽的反应更容易控制。

[0162] 为了实现聚合物分子与本文所述的融合蛋白的共价附接, 聚合物分子的羟基端基必须以活化形式提供, 即, 具有反应性官能团 (其实例包括伯氨基、酰肼 (HZ)、硫醇、琥珀酸

酯(SUC)、琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(SS)、琥珀酰亚胺基琥珀酰胺(SSA)、丙酸琥珀酰亚胺酯(SPA)、丁酸琥珀酰亚胺酯(SBA)、羧甲基琥珀酰亚胺基酯(SCM)、苯并三唑碳酸酯(BTC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、醛、硝基苯碳酸酯(NPC)和三氟乙磺酸酯(TRES))。合适的经活化的聚合物分子是可商购的,例如,来自美国阿拉巴马州亨茨维尔的Shearwater Polymers, Inc.或来自英国的PolyMASC Pharmaceuticals plc。

[0163] 替代地,聚合物分子可以通过本领域已知的常规方法活化,例如如WO 90/13540中所公开的。用于本文的经活化的线性或支化聚合物分子的具体实例描述于Shearwater Polymers, Inc. 1997和2000 Catalogs (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives, 通过引用并入本文)。经活化的PEG聚合物的具体实例包括以下线性PEG: NHS-PEG (例如, SPA-PEG、SSPA-PEG、SBA-PEG、SS-PEG、SSA-PEG、SC-PEG、SG-PEG和SCM-PEG) 以及NOR-PEG、BTC-PEG、EPOXPEG、NCO-PEG、NPC-PEG、CDI-PEG、ALD-PEG、TRES-PEG、VS-PEG、IODO-PEG和MAL-PEG; 以及支化PEG, 例如PEG2-NHS和美国专利号5,932,462和美国专利号5,643,575中描述的那些, 两者都通过引用并入本文。此外, 以下出版物公开了有用的聚合物分子和/或PEG化化学物质: 美国专利号5,824,778、美国专利号5,476,653、WO 97/32607、EP 229,108、EP 402,378、美国专利号4,902,502、美国专利号5,281,698、美国专利号5,122,614、美国专利号5,219,564、WO 92/16555、WO 94/04193、WO 94/14758、WO 94/17039、WO 94/18247、WO 94/28024、WO 95/00162、WO 95/11924、WO 95/13090、WO 95/33490、WO 96/00080、WO 97/18832、WO 98/41562、WO 98/48837、WO 99/32134、WO 99/32139、WO 99/32140、WO 96/40791、WO 98/32466、WO 95/06058、EP 439 508、WO 97/03106、WO 96/21469、WO 95/13312、EP 921 131、美国专利号5,736,625、WO 98/05363、EP 809 996、美国专利号5,629,384、WO 96/41813、WO 96/07670、美国专利号5,473,034、美国专利号5,516,673、EP 605 963、美国专利号5,382,657、EP 510 356、EP 400 472、EP 183 503和EP 154 316。

[0164] 特别优选用于与半胱氨酸残基偶联的经活化PEG聚合物的合适实例包括以下线性PEG: 乙烯基磺-PEG (VS-PEG), 优选乙烯基磺-mPEG (VS-mPEG); 马来酰亚胺-PEG (MAL-PEG), 优选马来酰亚胺-mPEG (MAL-mPEG) 和邻吡啶基-二硫化物-PEG (OPSS-PEG), 优选邻吡啶基-二硫化物-mPEG (OPSS-mPEG)。典型地, 此类PEG或mPEG聚合物将具有约5kDa、约10kDa、约12kDa或约20kDa的尺寸。

[0165] 本文所述的融合蛋白和经活化的聚合物分子的缀合通过使用任何常规方法进行, 例如, 如以下参考文献中所描述的 (其还描述了用于经活化聚合物分子的合适方法): Harris和Zalipsky, 编辑, Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, AZC Washington; R.F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications," Marcel Dekker, N.Y.; S.S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking," CRC Press, Boca Raton; G.T. Hermanson等人, (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y.。

[0166] 技术人员将意识到, 所使用的活化方法和/或缀合化学取决于融合蛋白的附接基团 (其实例在上面进一步给出), 以及聚合物的官能团 (例如, 为胺、羟基、羧基、醛、硫氢基、琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺、乙烯磺或卤代乙酸酯)。PEG化可以针对与融合蛋白上所有可用

的附接基团(即,暴露于多肽表面处的此类附接基团)的缀合,或者可以针对一个或多个特定的附接基团,例如,N-端氨基基团,如美国专利号5,985,265中所描述的或半胱氨酸残基。此外,缀合可以以一步或逐步的方式实现(例如,如WO 99/55377中所描述的)。

[0167] 对于半胱氨酸残基的PEG化(见上文),融合蛋白通常在PEG化之前用还原剂处理,例如二硫苏糖醇(DTT)。随后通过任何常规方法例如通过脱盐除去还原剂。PEG与半胱氨酸残基的缀合典型地在pH 6-9的合适缓冲液中、在4°C至25°C变化的温度下进行长达16小时的时间。

[0168] 应当理解,设计PEG化以便产生关于所附接的PEG分子的数量、此类分子的大小和形式(例如,无论它们是直链的还是支化的)以及在融合蛋白中附加位点的最佳分子。所使用的聚合物的分子量可以例如基于要实现的所需效果来选择。

[0169] 与与融合蛋白上的单个附接基团(例如,N-端氨基基团)缀合有关,可以是线性或支化的聚合物分子的高分子量优选约10-25kDa、诸如约15-25kDa、例如约20kDa能够是优选的。

[0170] 通常,聚合物缀合是在旨在使尽可能多的可用聚合物附接基团与聚合物分子反应的条件下进行的。这是通过聚合物相对于多肽适当地摩尔过量来实现的。典型地,经活化的聚合物分子与多肽的摩尔比高达约1000-1,诸如高达约200-1、或高达约100-1。然而,在一些情况下,该比率可以稍低,例如高达约50-1、10-1、5-1、2-1或1-1以获得最佳反应。

[0171] 还考虑通过接头将聚合物分子与融合蛋白偶联。合适的接头是技术人员众所周知的。优选的实例是氰尿酸氯(Abuchowski等人,(1977),J.Biol.Chem.,252,3578-3581;美国专利号4,179,337;Shafer等人,(1986),J.Polym.Sci.Polym.Chem.编辑,24,375-378)。

[0172] 缀合后,根据本领域已知的方法封闭残余的经活化的聚合物分子,例如,通过向反应混合物中添加伯胺,并通过合适的方法除去所得到的失活聚合物分子。

[0173] 应当理解,根据情况,例如,融合蛋白的氨基酸序列、所使用的经活化的PEG化化合物的性质和具体的PEG化条件(包括PEG与多肽的摩尔比),可以获得不同程度的PEG化,通常通过较高的PEG与融合蛋白的比率来获得较高程度的PEG化。然而,由任何给定的PEG化过程产生的经PEG化融合蛋白通常包含具有稍微不同的PEG化程度的经缀合的融合蛋白的随机分布。

[0174] 为了改善本文所述的融合蛋白的生物半衰期,可应用化学修饰,例如PEG化或HES化。

[0175] HAS和HES非蛋白质聚合物以及生产HAS或HES缀合物的方法公开于例如WO 02/080979、WO 03/070772、WO 057092391和WO 057092390中。

[0176] 聚唾液酸化(Polysialylation)是另一种技术,它使用天然聚合物聚唾液酸(PSA)来延长治疗性肽和蛋白质的半衰期并提高稳定性。PSA是唾液酸(一种糖)的聚合物。当用于蛋白质和治疗性肽药物递送时,聚唾液酸在缀合时提供保护性微环境。这增加了融合蛋白在循环中的活性寿命,并防止其被免疫系统识别。PSA聚合物天然存在于人体中。它被某些细菌采用,这些细菌经过数百万年的进化以用它覆盖了它们的细胞壁。这些天然的聚唾液酸化细菌能够通过分子模拟来挫败人体的防御系统。PSA是大自然的终极隐形技术,可以轻松地从此类细菌中大量生产并具有预定的物理特性。细菌PSA完全不具有免疫原性,即使与蛋白质偶联也是如此,因为它的化学性质与人体内的PSA相同。

[0177] 松弛素-2融合蛋白的生物活性

[0178] 在一些实施例中,与天然松弛素-2相比,本文所述的松弛素-2融合蛋白具有高水平的生物活性。在一些实施例中,本文所描述的任何松弛素-2融合蛋白与天然松弛素-2相比具有约1%至约200%的生物活性。在一些实施例中,与天然松弛素-2相比,松弛素-2融合蛋白的生物活性为至少约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约125%、约150%、约175%或约200%。

[0179] 在一些实施例中,本文所描述的任何松弛素-2融合蛋白与天然松弛素-2相比的最大生物活性为约1%至约200%。在一些实施例中,最大生物活性是松弛素-2或松弛素-2融合蛋白的最大响应($E_{\text{最大}}$)。在一些实施例中,与天然松弛素-2相比,松弛素-2融合蛋白的最大生物活性为至少约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约125%、约150%、约175%或约200%。

[0180] 在一些实施例中,与天然松弛素-2相比,本文所描述的任何松弛素-2融合蛋白效力增强约至少约0.001倍至约至少1,000倍。在一些实施例中,效力是引起半最大反应(EC_{50})的松弛素-2或松弛素-2融合蛋白的浓度。在一些实施例中,与天然松弛素-2相比,松弛素-2融合蛋白的效力为至少约0.001倍、约0.01倍、约0.1倍、约1倍、约10倍、约100倍或约1,000倍。

[0181] 生物活性可以是天然松弛素-2的任何生物活性。例如,生物活性可以是结合天然松弛素-2的受体RXFP1的能力。松弛素-2与RXFP1的结合可以通过本领域任何众所周知的方法来测量,例如放射性配体结合。在一些实施例中,当RXFP1在细胞表面上表达时,本文描述的融合蛋白与RXFP1结合。

[0182] 在一些实施例中,生物活性可以是激活细胞表面上的RXFP1的能力。本文所描述的松弛素-2融合蛋白对RXFP1的激活可以使用本领域熟知的任何方法通过cAMP的增加来确定,诸如测量cAMP驱动的报告基因(例如, β -半乳糖苷酶)的活性。还可以通过使用生物传感器(诸如GloSensor生物传感器)来测定细胞中本文所描述的松弛素-2融合蛋白对RXFP1的激活。细胞中本文所描述的松弛素-2融合蛋白对RXFP1的激活还可以通过使用本领域众所周知的方法测量某些基因(诸如血管生成因子,例如VEGF)的表达或MMP的表达来确定。在一些实施例中,生物活性是松弛素-2的生理学、生化活性或任何其他效应诱导活性。示例性的生物活性包括但不限于血管舒张、胶原降解、血管生成、降低动脉血压、增加肾动脉血流量、增加舒张期心脏充盈、消除已形成的纤维化和抑制新的纤维化发展。

[0183] 在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白具有改善的药代动力学特征。不希望受任何理论的束缚,本文所描述的融合蛋白的结构至少部分基于以下令人惊奇的发现:松弛素-2融合蛋白类似物的pI的降低增加了其循环半衰期。在一些实施例中,循环半衰期在哺乳动物中。在一些实施例中,哺乳动物是啮齿动物或灵长类动物。在一些实施例中,啮齿动物是大鼠或小鼠。在一些实施例中,灵长动物是人类或猴。在一些实施例中,猴是蟹猴。在一些实施例中,哺乳动物是人。在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白的循环半衰期可以为大于约5小时、10小时、20小时、50小时、75小时、100小时、125小时、150小时或更长。在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白的循环半衰期可以为5至10小时、10至20小时、20至50小时、50至75小时、75至100小时、100至125小时或125至150小时。所列举值中间的值和范围也旨在成为本公开的一部分。在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白具有比天然二链松弛

素-2更长的循环半衰期。例如,天然二链松弛素-2的循环半衰期可以小于约5小时。(参见,例如,Chen等人,The Pharmacokinetics of Recombinant Human Relaxin in Non-Pregnant Women after Intravenous, Intravaginal, and Intracervical Administration, Pharm. Res. 10:834038 (1993), 其通过引用并入本文)。

[0184] 这种半衰期的增加可以至少部分归因于本文所描述的融合蛋白的降低的pI。在一些实施例中,融合蛋白的pI小于9.4。在一些实施例中,融合蛋白的pI小于9.0、8.9、8.8、8.7、8.6、8.5、8.4、8.3、8.2、8.1或8.0。在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白的pI介于6.0与9.4之间。在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白的pI为6.5至8.5、6.6至8.4、6.7至8.3、6.8至8.2、6.8至8.1、6.8至8.0或6.8至7.9。在一些实施例中,上文提及的pI是计算的或理论的pI。在一些实施例中,上文提及的pI是实验测量的pI。

[0185] 如本文所使用的,“循环半衰期”是指当药物在生物体的全血中循环时其稳态减半所花费的时间。特定药剂的循环半衰期可以根据多种因素而变化,包括但不限于药剂的剂量、制剂和/或施用途径。本领域普通技术人员能够使用本领域公知的方法(诸如上文Chen描述的方法)确定药剂的循环半衰期。

[0186] 载体

[0187] 本公开内容还提供了编码本文所描述的任何融合蛋白或肽的核酸分子。在一些实施例中,本文所描述的核酸分子是DNA分子。在一些实施例中,本文所描述的核酸分子是RNA分子。

[0188] 本文所描述的核酸分子可以从表达载体中的启动子转录。在一些实施例中,载体是非病毒载体。示例性非病毒载体包括但不限于质粒DNA、转座子、附加型质粒、微环、微串和寡核苷酸(例如,mRNA、裸DNA)。在一些实施例中,载体是DNA质粒载体。

[0189] 在一些实施例中,载体是病毒载体。病毒载体可以是有复制能力的或无复制能力的。病毒载体可以是整合的或非整合的。已经开发了许多基于病毒的系统以用于将基因转移到哺乳动物细胞中,并且本领域普通技术人员可以选择合适的病毒载体。示例性病毒载体包括但不限于腺病毒载体(例如,腺病毒5)、腺相关病毒(AAV)载体(例如,AAV2、3、5、6、8、9)、逆转录病毒载体(MMSV、MSCV)、慢病毒载体(例如,HIV-1、HIV-2)、 γ 逆转录病毒载体、疱疹病毒载体(例如,HSV1、HSV2)、甲病毒载体(例如,SFV、SIN、VEE、M1)、黄病毒(例如,昆津病毒、西尼罗河病毒、登革病毒)、弹状病毒载体(例如,狂犬病病毒、VSV)、麻疹病毒载体(例如,MV-Edm)、新城疫病毒载体、痘病毒载体(例如,VV)、麻疹病毒和小核糖核酸病毒载体(例如,柯萨奇病毒)。

[0190] 在一些实施例中,载体或表达盒包含一种或多种额外的元件。额外的元件包括但不限于启动子、增强子、聚腺苷酸化(polyA)序列和选择基因。

[0191] 在一些实施例中,载体包含多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码与表1-表7中所列举的氨基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,载体包含以下核苷酸序列或由以下核苷酸序列组成:与表8中任何核苷酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0192] 表8. 编码融合蛋白和肽成分的核苷酸序列

[0193]

SEQ ID NO:	序列
119	GATAAAACACACACGTGTCCCCCTGCCCGGCTCCAGAGGCGGCTGGTG GTCCCAGCGTATTCTTGTTTCCTCCCAAACCTAAGGATACGCTCATGATAT CCCGCACCCCAGAAGTTACGTGTGTAGTCGTCGACGTCAGTCACGAAGAT CCAGAGGTCAAATTTAACTGGTATGTCGACGGAGTAGAGGTCCACAATGC GAAAACCAAGCCCAGAGAAGAGCAGTACAACCTCCACGTATCGCGTCGTC TCCGTCCTCACCGTACTCCATCAAGATTGGCTGAATGGGAAAGAGTATAA ATGCAAAGTATCTAACAAGGCTCTGCCAGCTCCGATAGAAAAGACTATAT CAAAGGCCAAGGGGCAGCCAAGGGAGCCTCAAGTCTATACTTTGCCCCC ATCTCGGGATGAGCTTACGAAAAACCAGGTCAGCCTTACCTGTCTTGTTA AAGGTTTTTATCCGAGTGACATCGCAGTGGAATGGGAATCTAATGGTCAA CCTGAAAACAATTACAAAACCACACCGCCAGTATTGGACAGCGATGGTA GTTTTTTTCTTTACTCAAACTGACTGTAGATAAAAGCAGATGGCAGCAG GGCAATGTCTTTTCATGTAGCGTTATGCATGAGGCTCTTCACAACCACTAT ACCCAAAAGTCATTGTCTCTTAGTCCCGGAAAGGGCGGAAGTGATTCTTG GAAGGAGGAGGTAATCAAGTTGTGCGGGCGAGAGTTGGTACGGGCACAG ATCGCGATATGCGGAAAATCCACAGGTGGGGGCGAAGGAGGAGGTGAGG GTGGAGGTGAAGGACGACAGTTGTATTCCGCCTTGGCAAACAAGTGTTG

[0194]

	CCATGTGGGTTGCACAAAACGCAGTCTTGCCCGCTTCTGT
120	GATAAGACACATACATGCCCTCCCTGTCCGGCTCCAGAGGCAGCCGGGGG TCCATCAGTCTTCCTTTTTCCGCCTAACCTAAGGATACACTGATGATCTC TCGAACACCGGAGGTCACTTGTGTTGTCGTTGACGTATCACATGAGGATC CCGAAGTAAAGTTCAACTGGTATGTTCGATGGTGTGGAGGTTTCATAATGCT AAAATAAACACGGGAGGAGCAATATAATTCCACATATAGGGTCGTGAG CGTGTTGACGGTGCTTCATCAAGACTGGCTTAATGGGAAGGAATATAAAT GCAAAGTGTCAAATAAAGCACTTCCTGCGCCAATCGAGAAAACAATTAGT AAGGCAAAGGGGCAGCCGCGAGAACCTCAGGTGTACACCTTGCCGCCTT CTAGAGACGAGCTCACAAAGAACCAAGTTTCCCTGACTTGCCCTCGTTAA GGGGTTTTATCCGTCCGATATAGCCGTGGAGTGGGAGTCAAACGGCCAAC CGGAAAATAATTACAAAACGACACCCCCAGTATTGGATAGTGACGGCTCT TTTTTCCTTTATTCTAAGCTGACTGTGGACAAAAGCCGCTGGCAGCAGGG CAATGTCTTTTCATGCAGCGTAATGCATGAAGCCCTGCACAACCACTACA CGCAAAAATCCCTTTCCTTGTACCCGGCAAGGGCGGGCTCTGACTCCTGG AAAGAGGAAGTTATAAACTCTGTGGCCGAGAACTTGTTTCGAGCTCAAA TCGCGATTTGTGGTAAGTCAACGGGTGGGGGCGAAGGTGGAGGCGAGGG TGGGGGAGAAGGAGGAGGCCAGTTGTACTCAGCTCTTGCAAATAAGTGT TGCCACGTTGGTTGTACGAAGCGGAGCCTTGCTCGCTTCTGC
121	GACAAAACACATACTTGTCCGCCTTGCCCGGCACCCGAAGCGGCCGGCG GACCCAGTGTCTTTCTCTTCCCACCCAAACCGAAAGACACTCTGATGATT TCCAGGACGCCTGAAGTGACCTGCGTTGTAGTTGATGTATCACACGAGGA TCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAGGTCCATAATG CAAAGACGAAGCCACGGGAGGAACAGTACAACCTCTACGTACAGAGTTGT CAGTGTTTTGACCGTCCTTCATCAGGATTGGCTGAACGGTAAAGAATATA AATGCAAGGTTAGCAATAAAGCTTTGCCCGCCCCCTATAGAGAAAACGATC AGTAAGGCGAAGGGGCAGCCTAGGGAACCCAGGTATATACCTTGCCGC CAAGTCGAGATGAGCTGACGAAGAACCAAGTGAGTCTGACATGCCTCGT GAAGGGCTTCTATCCGAGCGATATCGCTGTCTGAATGGGAGAGCAATGGGC AGCCTGAGAATAACTATAAAACAACGCCACCCGTCCTCGACTCCGATGGC TCATTCTTCTGTACAGTAACTTACAGTAGATAAGAGTAGATGGCAGCA GGGTAAACGTCTTTAGTTGCTCCGTGATGCACGAGGCATTGCACAATCATT CACTCAAAAATCTCTGTCCCTGAGTCCGGGCAAAGGCGGTTTCAGATAGCT GGATGGAGGAGGTCATAAAGCTTTGTGGACGAGAACTCGTTTCGCGCCCA

[0195]

	GATAGCTATTTGTGGGAAATCAACCGGGGGTGGAGAAGGTGGCGGAGAA GGGGGAGGCGAAGGGCGCCAACTGTATTCTGCATTGGCTAATAAGTGCTG TCACGTAGGATGTACAAAAAGGTCTCTGGCGAGATTCTGC
122	GACAAGACGCACACTTGTCCACCTTGCCCTGCGCCGGAAGCTGCTGGAG GCCCCAGTGTCTTTTTGTTCCCGCCCAAACCGAAGGACACTTTGATGATA AGTCGCACGCCCCGAGGTTACCTGTGTGGTTGTTCGATGTCTCACACGAAGA TCCGGAGGTGAAGTTTAATTGGTATGTAGATGGCGTGGAGGTTTCATAACG CCAAAACGAAACCCAGAGAAGAACAATATAACAGTACATATCGAGTAGTA TCCGTTCTCACTGTCCTGCATCAAGACTGGTTGAACGGGAAGGAATATAA GTGCAAGGTGAGCAATAAAGCACTCCCGGCCCAATCGAAAAGACCATC AGCAAAGCGAAGGGGCAACCTCGAGAACCCAGGTATATACGCTCCCCC CTAGTCGGGATGAACTTACTAAAAATCAGGTTAGCCTCACTTGCCTTGTTA AAGGGTTCTATCCCAGTGATATTGCCGTCGAATGGGAATCAAACGGGCAG CCGGAATAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTCGATAGCGATGGCTC TTTTTTCCTCTACAGCAAACCTTACCGTTGATAAGAGCCGGTGGCAACAAG GTAATGTTTTCTCCTGCTCCGTTATGCATGAAGCACTCCATAACCATTATAC CCAAAAAGCCTGTCACTTAGTCCGGGTAAAGGAGGTAGTGATTCTTGGC AGGAGGAGGTAATCAAACCTTTGTGGGAGGGAGCTGGTACGAGCTCAGAT TGCTATATGTGGAAAAAGCACGGGCGGAGGAGAAGGAGGTGGCGAAGG CGGGGGTGAAGGTCGGCAACTCTACTCCGCTCTCGCTAATAAGTGCTGCC ACGTCGGGTGTACGAAGCGCTCCCTGGCGCGATTCTGC
123	GATAAACGCACACGTGTCCGCCCTGCCAGCGCCTGAAGCCGCAGGCG GGCCGTCCGTCTTCCTCTTTCCTCCAAAACCCAAAGACACACTTATGATC AGTAGGACCCAGAGGTAACCTGCGTCGTGGTCGACGTTTCCCATGAAG ACCCAGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTCGACGGTGTCTGAAGTACATAAT GCTAAACGAAGCCTCGGGAAGAGCAGTACAACTCTACCTACCGCGTCG TTCCGTACTCACCGTACTTCACCAGGACTGGCTTAACGGTAAAGAGTAT AAATGCAAAGTATCTAATAAGGCTCTCGCCGCGCCGATTGAGAAGACAAT TTCAAAGGCCAAGGGGCAGCCGCGGGAGCCCCAAGTGTATACCTTGCCC CCGTCCCGAGATGAGCTGACTAAAAACCAAGTAAGCTTGACTTGCTTGGT CAAAGGCTTCTACCCTTCCGATATAGCTGTCGAATGGGAGTCAAATGGCC AACCAGAGACAATTATAAACTACACCCCGGTCTTGGATTCTGATGGC TCATTTTTTCTCTATTCTAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAGCAA GGTAACGTGTTCAAGTTGCTCTGTTCTTCACGAAGCACTGCACAGTCATTA

[0196]

	CACTCAGAAGAGTCTTAGCCTGAGCCCTGGTAAAGGGGGTTCTGATTCTT GGCAGGAGGAAGTAATAAACTCTGTGGCCGGGAGTTGGTACGGGCGCA GATTGCGATATGCGGTAAGAGCACCGGCGGAGGCGAAGGCGGTGGGGAA GGAGGAGGAGAAGGGAGACAACTCTATTCCGCATTGGCAAATAAGTGCT GCCACGTCGGGTGTACCAAACGATCCCTTGACACGGTTCTGT
124	GATAAGACCCATACGTGCCCCCTTGCCCTGCGCCTGAGGCAGCGGGTGG CCCATCAGTCTTTTTGTTCCCGCCCAAGCCAAAGGACACCCTCATGATTA GTAGAACACCGGAGGTTACGTGCGTCGTAGTGGATGTCAGCCACGAGGA TCCCGAGGTTAAGTTTAACTGGTACGTTGATGGGGTTGAGGTCCATAATG CGAAGACTAAGCCGAGAGAGGAACAGTACAATTCCACGTATAGAGTTGT CTCTGTACTGACTGTGCTGCATCAAGATTGGCTTAACGGTAAGGAGTACA AGTGCAAAGTCTCTAATAAGGCTCTTCCTGCACCCATTGAGAAAACATA AGCAAAGCAAAAGGTCAACCTCGCGAACCTCAGGTGTACACACTGCCAC CCTCTAGGGACGAGCTTACCAAAAATCAAGTATCTCTTACCTGCCTTGTG AAAGGGTTTTATCCCTCAGATATTGCGGTTGAGTGGGAGTCTAACGGACA ACCTGAGAACAACATAAGACTACTCCCCCGGTGCTTGATTCAGACGGGA GTTTTTTTTTGTATAGCAAACCTTACCGTCGACAAAAGCCGGTGGCAACAG GGCAATGTATTAGTTGTTCTGTAATGCATGAAGCTTTGCATAATCATTAC ACCCAAAAGAGTCTTTCCTGTCTCCTGGAAAAGGGGGGTCAGACTCCT GGATGGAGGAGGTGATCAAACCTGTGTGGGAGAGAGCTCGTCCGGGCTCA GATAGCTATATGCGGCAAGTCTACGGGTGGGGGAGAGGGCGGAGGAGAG GGCGGTGGAGAAGGAGGCGGCCAACTCTACAGCGCTCTGGCCAATAAAT GTTGTCATGTCGGGTGTACTAAGCGCTCACTGGCACGCTTTTGC
125	GACAAGACGCATACATGCCCCGCCATGCCCGGCCCGCCGAAGCTGCTGGGG GACCATCCGTATTCTCTTCCCTCCCAAACCAAAAGACACGTTGATGATA AGTAGAACACCAGAGGTAACGTGCGTGTTGTCGATGTTTCCACGAAG ATCCGGAGGTAAAATTCAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAAGTGACAAT GCCAAAACAAAGCCGCGAGAAGAACAATACAATAGTACTTACCGGGTTG TGAGCGTGCTCACGGTGTTGCACCAAGACTGGCTCAACGGCAAGGAATA CAAGTGCAAAGTATCTAATAAGCTCTGCCTGCGCCGATAGAGAAGACCA TCAGTAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCGCAAGTTTACACTCTTCC TCCGAGCAGAGATGAATTGACCAAGAACCAAGTAAGTTTGACGTGCCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCTCAGACATTGCGGTGGAGTGGGAAAGTAATG GTCAACCGGAAAACAACATAAGACCACGCCCGCCCGTCCTCGACTCCGA

[0197]

	TGGGTCTTTCTTTCTTTATTCAAAGTTGACAGTAGATAAGTCAAGGTGGCA GCAAGGTAACGTGTTTAGTTGTAGTGTAATGCACGAGGCCCTGCATAATC ATTATACCCAAAAGAGTTTGAGCCTCTCACCAGGAAAAGGCGGATCAGA CAGCTGGCAGGAGGAGGTAATTAAATTGTGTGGACGGGAGTTGGTCAGG GCGCAAATAGCCATCTGCGGTAAGAGCACGGGTGGAGGAGAGGGTGGAG GGGAAGGTGGGGGAGAAGGCGGCGGGCAGCTCTATTCTGCACTCGCCAA CAAGTGTTGTCACGTCGGATGCACAAAGAGATCTCTTGCTCGATTCTGC
126	GACAAAACACACACCTGTCCGCCTTGCCCGGCTCCTGAAGCCGCGGGTG GCCCTAGTGTGTTTTTGTTCGCGCGAAACCTAAGGATACCCTCATGATAA GCCGGACGCCCCGAGGTTACCTGTGTCTGTTGGTCGATGTTAGTCATGAGGAT CCAGAAGTCAAGTTTAATTGGTACGTCGACGGCGTTGAAGTCCACAATGC AAAACTAAACCGCGAGAAGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTTGTC TCAGTTTTGACAGTTCTCCATCAGGATTGGCTCAATGGAAAGGAATATAA GTGCAAGGTCAGCAATAAAGCGCTTGCCGCCCCTATAGAGAAGACCATTA GCAAGGCGAAAGGACAGCCCCGCGAGCCCCAGGTCTATACGCTGCCTCC TAGCAGAGATGAGCTCACGAAAAATCAGGTCAGCTTGACATGCTTGGTG AAGGGCTTCTACCCCAGTGACATCGCAGTTGAATGGGAGAGCAACGGCC AACCTGAGAACAACTACAAAACAACGCCCCCGGTTCTTGACAGCGATGG GTCCTTCTTTCTTTACTCTAAGCTTACAGTTGATAAAAGCAGGTGGCAGC AGGGGAATGTGTTCTCATGTTCCGTACTGCATGAGGCTCTGCATTCTCACT ACACCCAAAAAAGCCTTAGCCTGAGCCCCGGTAAGGGAGGTAGTGACTC ATGGCAAGAGGAAGTGATTAAGCTCTGCGGCCGGGAGTTGGTGAGAGCC CAAATCGCCATTTGCGGTAAAAGTACCGGAGGGGGCGAGGGAGGAGGCG AAGGTGGAGGTGAAGGAGGTGGACAGTTGTACTCAGCTCTTGCAAATAA ATGTTGTCATGTTGGTTGCACGAAAAGATCTCTTGCGAGGTTCTGT
127	GATAAGACGCATACTTGTCCACCGTGCCCCGCACCGGAAGCGGCTGGTG GTCCATCAGTTTTTCTGTTCCACCGAAACCTAAGGACACGTTGATGATAT CACGGACACCAGAGGTTACGTGCGTAGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGA TCCAGAAGTTAAATTTAATTGGTACGTAGATGGAGTGGAGGTTTCATAATGC GAAGACAAAGCCTCGCGAGGAACAGTATAATTCCACCTATCGCGTCGTAT CTGTGCTTACGGTACTTCACCAAGACTGGTTGAACGGTAAGGAATATAAA TGCAAGGTTTCCAATAAAGCACTTCCTGCGCCAATTGAGAAGACAATATC CAAAGCTAAAGGTCAACCCAGGGAACCGCAAGTCTACACTCTCCCCCG TCTCGCGATGAATTGACGAAGAACCAGGTTAGTCTCACCTGCCTGGTCAA

[0198]

	GGGGTTTTACCCCTCTGACATAGCTGTAGAATGGGAGTCTAATGGACAGC CAGAGAACAATTACAAAACGACCCCCCGGTCCTCGATTCTGATGGGAGT TTTTTTCTTTATTCAAAATTGACTGTGCGATAAGTCAAGATGGCAACAGGGT AACGTATTTTCTTGCAAGTGTATGCATGAAGCATTGCACAACCACTATACA CAAAAATCATTGAGTTTGAGTCCCGGTAAAGGGGGAAGCGACTCATGGAT GGAAGAAGTAATCAAGCTGTGCGGGCGAGAGCTTGTGCGAGCTCAGATA GCAATCTGTGGTAAGTCTACAGGTGGAGAGGGTGGCGGTGAAGAAGGCG GGGGAGAGGGAGGCCAGCTTTATTCTGCCCTGGCTAACAAGTGCTGTCA CGTTGGATGCACGAAGCGCTCCCTGGCCCGATTCTGC
128	GATAAGACGCATACTTGTCCCCCATGTCCCGCTCCGGAAGCCGCTGGCGG CCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCGCCGAAACCGAAAGACACCCTGATGATAT CACGCACTCCCGAGGTCACTTGCGTGGTAGTCGATGTTAGTCATGAAGAT CCTGAGGTCAAATTCAATTGGTATGTAGATGGCGTTGAGGTACACAACGC GAAGACAAAACCCCGAGAAGAACAGTATAACTCAACCTACCGCGTAGTT TCAGTTCTTACCGTACTGCACCAAGACTGGTTGAACGGTAAAGAGTACAA ATGTAAAGTCAGCAATAAAGCTTTGCCAGCACCTATCGAAAAAACCATCA GTAAGGCCAAGGGTCAACCCAGGGAGCCGCAAGTGTACACTCTTCCCCC TAGCAGGGATGAATTGACCAAGAATCAGGTCTCTTTGACGTGCCTCGTTA AGGGTTTCTATCCCAGCGATATAGCCGTAGAATGGGAGTCTAACGGTCAG CCAGAAAATAACTATAAGACAACCCCGCCTGTTTTGGATTCCGACGGCTC TTTTTTTCTCTACTCTAAGTTGACCGTTGATAAGAGCAGATGGCAGCAGG GAAACGTATTTTCTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTATA CGCAAAAGTCTCTGAGCTTGAGTCCGGGTAAAGGCGGTTCTGACTCCTG GCAGGAGGAAGTCATAAACTCTGCGGAAGAGAGCTCGTAAGGGCGCA AATCGCTATTTGTGGTAAGAGCACCGGTGGGGAAGGAGGCGGTGAAGAG GGTGGCGGCGAGGGTGGGCAATTGTATTCCGCGCTTGCCAATAAATGTTG TCACGTAGGCTGCACAAAGCGAAGTCTCGCTAGGTTCTGC
129	GACAAGACCCACACATGTCCCCCGTGTCCGGCACCAGAAGCAGCGGGGG GACCGTCAGTATTCTTGTTTCCACCGAAGCCCAAAGACACATTGATGATT TCACGAACTCCTGAAGTTACCTGTGTGGTTGTAGATGTATCACACGAAGA CCCAGAAGTCAAATTCAATTGGTATGTGACGCGGGTTGAAGTTCACAATG CGAAGACGAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAACAGCACGTACAGGGTTG TGAGCGTTCTTACTGTATTGCACCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTAT AAATGTAAAGTTTCTAATAAGGCTCTTCCTGCCCAATTGAAAAGACGAT

[0199]

	ATCTAAAGCGAAGGGCCAACCACGGGAACCTCAGGTGTACACACTTCCG CCTAGCAGGGATGAGTTGACCAAGAATCAAGTCTCTTTGACGTGCCTGGT CAAGGGGTTTTACCCATCAGATATCGCCGTCGAATGGGAGTCAAACGGAC AACCCGAAAATAACTATAAACTACTCCACCAGTTCTGGATAGCGACGGC TCATTTTTTCTGTATTCAAAGCTCACTGTAGACAAGTCTAGGTGGCAGCA GGGTAATGTCTTCTCCTGCTCAGTAATGCATGAGGCTCTTCACAACCACTA TACTCAAAAGAGCCTTTCCCTGTCACCTGGCGGTGGAAGCGACTCATGGA TGGAGGAGGTAATAAAGCTCTGCGGAAGAGAACTGGTACGCGCACAAAT CGCAATTTGTGGTAAGAGTACTGGCGGGGAAGGAGGTGGGGAAGAAGG GGGCGGTGAGGGCGGACAGCTCTATTCTGCACTTGCAAACAAATGTTGCC ACGTGGGATGTACTAAGCGAAGCCTTGCAAGATTCTGC
130	GATAAAACCCACACATGCCCTCCATGCCCTGCTCCAGAGGCCGCCGGTGG GCCATCAGTTTTCTTGTTTTCCGCCTAAACCAAAGGACACGCTTATGATCTC CAGGACCCCCGAAGTTACGTGTGTGGTGGTTGATGTTAGTCACGAGGACC CGGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTTGATGGTGTAGAGGTGCACAATGC AAAGACGAAGCCACGCGAAGAACAATACAACAGCACATATCGAGTTGTG AGCGTACTCACGGTACTGCATCAGGACTGGCTGAACGGTAAAGAATACA AATGTAAAGTCTCCAATAAGGCACTTCCCTGCGCCGATAGAAAAAACGATC AGTAAGGCCAAGGGCCAACCCCGAGAACCACAGGTATATACGCTCCAC CGTCACGAGACGAGTTGACAAAAAATCAGGTCTCCCTGACTTGCCTCGT GAAAGGTTTTTATCCCTCAGATATTGCTGTTGAGTGGGAAAGCAATGGGC AGCCAGAGAATAATTATAAGACGACTCCTCCGGTTTTGGATTCCGACGGT AGTTTTTTCTTGTATAGTAAGCTTACTGTAGACAAGTCAAGATGGCAACA AGGTAATGTGTTCTCTTGCTCAGTTATGCATGAAGCTCTTCATAACCATTA CACGCAAAAGAGTCTCAGTCTGAGCCCCGGTGGCGGTAGCGACAGTTGG CAGGAAGAGGTGATTAAGTTGTGCGGTCGCGAGCTCGTTCCGGCCCCAAA TTGCAATCTGCGGAAAATCTACGGGCGGAGAGGGCGGGGGTGAGGAGGG TGGGGGTGAAGGTGGGCAGCTCTATAGCGCCCTTGCGAATAAATGTTGTC ACGTCGGATGCACAAAGAGGTCCCTCGCCAGGTTCTGC
131	GATAAGACCCACACTTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAAGCGGCCGGAG GTCCTTCAGTATTTTTGTTTTCCACCGAAACCCAAAGATACTTTGATGATAT CAAGAACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTAGTTGACGTATCTCATGAGGAT CCCGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGATGGCGTCGAGGTTTCATAACGC TAAGACTAAGCCGAGGGAAGAGCAATATAATTCCACTTATAGGGTGGTGT

[0200]

	CCGTCTTGACTGTTTTGCACCAGGATTGGTTGAACGGGAAAGAGTACAA ATGTAAGGTGAGTAATAAAGCTTTGGCTGCTCCCATCGAAAAGACAATAA GCAAGGCCAAGGGGCAACCTCGGGAGCCGCAGGTGTACACCCTTCCTCC CAGTAGAGACGAACTGACAAAAAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTTGTG AAGGGGTTTTACCCGAGCGACATAGCGGTTGAATGGGAGAGCAACGGGC AACCCGAGAACAACCTACAAAACCTACACCGCCTGTCCTGGACTCCGATGG AAGCTTCTTCCTCTACTCCAACTGACCGTGGACAAAAGCAGATGGCAA CAAGGAAACGTATTCTCATGCTCAGTAATGCACGAAGCATTGCACAATCA CTACACCCAAAAGTCCCTCTCACTCTCCCCTGGTAAGGGCGGATCAGACT CATGGCAAGAGGAGGTAATTAAGTTGTGCGGGAGGGAGCTCGTCCGCGC GCAAATAGCCATTTGTGGCAAGTCCACTGGAGGAGGCGAGGGTGGAGGA GAGGGTGGTGGGGAGGGCAGGCAACTCTACAGTGCGCTCGCCAATAAAT GCTGCCATGTTGGGTGCACGAAGCGCAGTCTCGCACAATTCTGC
132	GATAAGACCCACACGTGTCTCCATGTCCGGCACCGGAGGCTGCTGGCG GGCCTTCTGTATTCTCTTCCACCCAAGCCAAAAGACACATTGATGATAT CAAGGACGCCGGAAGTCACCTGTGTTGTTGTGGACGTTTCCCATGAAGA CCCAGAGGTAAAATTCAATTGGTATGTGGACGGCGTAGAGGTTCAACAACG CCAAAACCAAACCCCGAGAGGAACAGTATAATAGCACATATCGAGTAGTA TCTGTTCTCACAGTGCTCCATCAAGACTGGCTTAATGGTAAAGAGTATAA ATGCAAAGTTTCCAATAAAGCCCTCGCTGCACCGATCGAGAAGACAATCA GTAAAGCGAAGGGCCAGCCTCGGGAACCGCAGGTGTATACTCTTCCACC CTCAAGAGACGAGCTCACTAAAAACCAAGTTTCATTGACATGCCTCGTCA AAGGTTTCTACCCATCAGACATCGCGGTCGAATGGGAAAGTAATGGGCAG CCGGAACAACTATAAACGACGCCGCCCGTCTTGGATTCTGATGGTTC ATTTTTTCTTTACTCTAAATTGACCGTCGATAAAAGTAGGTGGCAACAAGG AAATGTTTTTTCCTGCTCCGTCCTGCATGAAGCGTTGCACAGTCACTATAC CCAGAAGAGTCTTTCTTTGTCACCCGGAAGAGCGGTTTCAGATTCATGGC AGGAAGAAGTAATTAACTCTGTGGCCGCGAGCTTGTTAGGGCGCAGATA GCCATATGTGGTAAAAGCACCGGAGGAGGTGAAGGCGGAGGCGAAGGA GGTGGGGAAGGAAGACAATTGTATTCTGCACTTGCAAATAAATGCTGTCA TGTGGGGTGCACGAAACGCAGTCTTGACACAATTTTGT
133	GACAAAACCCATACCTGCCCCCTTGCCCTGCACCAGAAGCGGCGGGAG GACCTAGCGTTTTTCTTTTCTCCGAAACCGAAAGATACCCTCATGATAT CAAGAACACCTGAGGTTACTTGCGTTGTCGTGGACGTGAGTCACGAAGA

[0201]

	CCCCAGGTTGAAGTTCAACTGGTATGTAGATGGAGTGGAGGTCCATAATG CAAAAACGAAACCGAGAGAAGAACAATACTCTACATATCGAGTCGT GTCAGTACTCACGGTTTTGTCATCAAGATTGGCTGAACGGTAAGGAGTACA AGTGTAAGGTTAGCAACAAGGCTCTCGCGGCGCCGATAGAAAAGACTAT AAGTAAAGCAAAAGGCCAGCCCAGAGAACCTCAAGTTTACACTCTGCCT CCCAGCAGAGATGAACTGACTAAAAATCAGGTTTCATTGACCTGTCTCGT CAAGGGTTTTTATCCAAGCGACATAGCAGTTGAATGGGAAAGCAACGGTC AACCAGAAAATAATTACAAAACCACTCCACCAGTCTTGGACTCTGACGG ATCCTTCTTTCTCTATTCAAAATTGACGGTGGATAAATCTAGGTGGCAGCA AGGCAACGTCTTCTCTTGTAGCGTTATGCATGAGGCGCTGCACAACCACT ACACACAAAAGTCTCTTAGTTTGAGCCCGGGCGGCGGAAGCGACTCTTG GCAAGAGGAAGTGATAAACTCTGTGGTCGAGAATTGGTACGCGCGCAG ATCGCTATCTGCGGCAAGTCCACAGGGGGAGGGGAAGGTGGCGGGGAAG GTGGTGGCGAGGGCAGGCAGTTGTATAGTGCACCTGCCAACAAGTGCTG CCATGTGGGGTGCACCAAGCGCAGTTTGGCACGGTTCTGC
134	GATAAACTCACACTTGTCCCCCGTGTCCGGCACCAGAAGCCGCAGGAG GGCCATCTGTCTTTCTTTTTCCCCAAAACCCAAGGATACACTGATGATCT CCCGCACTCCCGAAGTTACTTGTGTCTGTAGTAGACGTTTCTCACGAGGAC CCAGAGGTGAAATTCAATTGGTATGTTGACGGAGTAGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCCCGAGAGGAACAATAACAATTCAACCTACAGAGTAGTG TCCGTTCTTACGGTTCTCCATCAGGATTGGCTCAACGGTAAGGAATATAAG TGCAAGGTAAGCAACAAAGCGCTGGCCGCACCCATTGAGAAAACCATTT CAAAAGCTAAAGGCCAACCCCGCGAACCACAAGTTTATACTCTCCCCCA AGTCGCGATGAACTTACAAAAATCAAGTCTCATTGACGTGCTTGGTCAA AGGCTTCTACCCGAGCGATATCGCTGTTGAATGGGAGTCTAATGGACAAC CGGAAAATAACTATAAACTACACCCCCAGTCCTCGATTACAGACGGCAGC TTCTTCTGTATTCAAACTGACGGTTGACAAATCACGCTGGCAACAGGG TAACGTTTTTCTCTGTAGCGTTCTTCATGAAGCCTTGACAGTCACTACAC CCAGAAGTCCCTTAGCTTGTACCTGGCGGGGGTTTCAGACTCTTGGCAGG AGGAGGTAATCAAATGTGCGGAAGAGAACTGGTGAGGGCTCAGATTGC AATTTGTGGGAAGAGCACGGGTGGCGGTGAAGGAGGTGGCGAGGGCGG AGGAGAGGGGAGGCAACTCTACAGTGCGTTGGCTAATAAATGCTGTCAC GTCGGCTGTACTAAGAGAAGCCTCGCCAGATTTTGC
135	GACAAGACGCATACTTGCCCTCCGTGCCCTGCACCAGAAGCCGCTGGTG

[0202]

	GCCCATCTGTGTTTTTGTTCCTCCCTAAGCCAAAAGACACATTGATGATT CACGAACTCCAGAAGTGACTTGCGTAGTTGTTGACGTATCACACGAAGA CCCCGAGGTAAATTTAATTGGTATGTGGACGGGGTCGAGGTGCATAACG CCAAAACCAAACCCCGGGAGGAACAATATAACTCTACGTATCGGGTCGTA TCTGTGTTGACCGTCCTTCACCAAGATTGGTTGAACGGCAAGGAATATAA GTGTAAAGTGTCTAATAAAGCATTGGCTGCCCCGATAGAAAAGACGATCT CTAAAGCCAAGGGCCAACCCAGAGAGCCTCAAGTATATACTCTCCCACCG AGTCGAGATGAGCTCACTAAGAACCAGGTGTCACGTGTCTGGTTAA AGGATTTTACCCTAGTGATATAGCCGTCGAGTGGGAATCAAATGGGCAGC CGGAGAATAACTATAAGACCACGCCTCCAGTTCTCGATTCCGATGGTAGC TTTTTCCTTTACTCTAAACTTACGGTCGACAAGTCCAGGTGGCAACAGGG CAATGTATTTTCTTGCTCCGTCATGCACGAGGCTTTGCACAACCATTACAC GCAAAAGTCACTGTCCCTGTCTCCTGGAGGCGGTTCTGACAGTTGGCAG GAGGAGGTAATCAAATTGTGTGGGCGGGAGTTGGTTAGGGCGCAAATTG CTATTTGCGGCAAAAGTACTGGGGGCGGTGAAGGCGGAGGCGAGGGAGG AGGAGAAGGTCGACAACGTATTCTGCCTTGGCGAACAATGCTGTAC GTCGGCTGTACGAAACGGTCTTTGGCCCAGTTTTGT
136	GATAAGACACACACTTGTCCGCCATGCCCTGCGCCGGAAGCGGCGGGAG GACCGTCCGTTTTCTGTTCCTCCCAAACCCAAAGACACGTTGATGATT AGTCGCACGCCAGAAGTTACGTGCGTTGTCGTAGATGTATCCCACGAAGA CCCCGAGGTGAAGTTCAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAGGTCCATAACG CTAAGACCAAACCACGCGAGGAACAATATAATTCTACGTACCGCGTAGTG AGCGTTCTCACAGTTCTTCACCAGGATTGGCTTAACGGCAAGGAGTATAA GTGTAAGGTGTCTAATAAGGCCTTGGCTGCCCCGATCGAAAAACGATAA GTAAAGCAAAGGGTCAACCTAGAGAACCCCAAGTGTACACTCTCCCGCC ATCACGGGATGAATTGACTAAGAACCAAGTGTCACTCACGTGTCTTGTA AGGGCTTCTACCCATCCGATATAGCCGTTGAGTGGGAATCCAATGGTCAG CCAGAGAACAACCTATAAGACAACCTCCGCCCCGTACTTGATAGTGACGGTTC CTTTTTCTTTACAGTAAATTGACGGTAGATAAGTCTCGCTGGCAGCAAG GAAACGTCTTTTCTTGTTCAAGTGTTCATGAGGCGCTTCACTCACACTATA CTCAGAAGAGTTTGAGTTTGTCTCCAGGTGGAGGCAGCGACTCATGGCA AGAGGAAGTAATCAAACGTGTGTGGTCGCGAATTGGTACGAGCACAGATC GCGATCTGCGGGAAATCAACAGGTGGCGGCGAAGGCGGCGGGGAAGGC GGCGGCGAAGGTAGGCAACTTTACTCAGCCCTTGCGAACAATGTTGCC

[0203]

	ACGTAGGCTGTACTAAGAGAAGTCTCGCCCAGTTTTGC
137	GACAAGACTCATACCTGCCCCCCTTGTCCAGCACCAAGAAGCAGCTGGCG GGCCAAGCGTGTTCTGTTCCTGTTTCCACCTAAGCCCAAAGATACGTTGATGATC AGCCGCACCCCGGAAGTAACCTGTGTAGTAGTAGATGTGTCCACGAAG ACCCCGAAGTAAAGTTTAATTGGTACGTCGATGGTGTCTGAAGTACATAAC GCTAAACGAAGCCCCGAGAAGAGCAGTACAACAGTACTTACAGAGTAG TTTCTGTTCTTACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTAT AAATGTAAAGTCTCAAACAAGGCACCTTGCGGCACCAATAGAGAAGACAA TATCTAAGGCCAAAGGGCAGCCTAGAGAGCCACAAGTATATACGCTGCCC CCCAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAAGTGTCACTGACCTGCCTTG TTAAGGGCTTCTATCCGAGTGATATTGCTGTTGAATGGGAAAGTAACGGA CAGCCGGAGAACAACCTATAAACTACTCCACCCGTGTTGGATAGTGACGG TAGCTTTTTTCTGTACTCCAAGTTGACGGTAGACAAAAGTCGGTGGCAGC AGGGGAACGTATTTTCTTGTCTGTATGCACGAAGCTCTTCACAATCACT ATACGCAGAAGTCCCTCTCTCTCTCTCCTGGGAAGGGTGGTTCCGACAGC TGGCAGGAGGAGGTCATTAACTGTGTGGTAGAGAGCTGGTACGGGCTC AAATTGCAATTTGTGGTAAGAGTACTGGCGGTGGCGAGGAAGGGGGTGG GGAGGAGGGCGGAGGTAGGCAGCTCTACTCTGCTCTCGCCAACAAGTGT TGTCACGTCGGGTGTACTAAAAGATCACTTGCCCCGCTTTTGT
138	GACAAAACACATACATGCCCCGCCGTGTCCGGCGCCTGAAGCAGCAGGAG GCCCCAGTGTATTCCTTTTCCCTCCAAAGCCAAAAGATACGTTGATGATAT CTAGGACACCTGAGGTTACCTGCGTCGTAGTGGACGTATCCACGAAGAC CCAGAAGTCAAGTTTAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTACACAATG CAAAGACAAAGCCGCGAGAGGAACAATATAATTCCACCTATAGAGTCGTG TCAGTCCTTACGGTCTTGCACCAGGACTGGCTCAATGGTAAGGAGTATAA GTGCAAAGTATCAAACAAAGCTCTCGCAGCGCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAAGCTAAGGGCCAGCCAAGAGAGCCTCAAGTGTACACGTTGCCGC CTTCAAGGGACGAGCTCACTAAAAATCAGGTATCACTTACGTGTCTTGTC AAAGGGTTTTATCCTTCCGACATCGCGGTTGAATGGGAGAGCAATGGACA GCCGGAGAATAATTATAAACGACGCCGCCGGTCCTTGACAGCGATGGTT CATTTTTCTTTACTCAAAGCTGACGGTTGATAAGTCTAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTTTCTGTAGTGTACTTCATGAGGCGCTCCATTCTCATTAC ACTCAGAAGTCACTGAGCCTTTCACCCGGCAAAGGTGGATCAGACTCCT GGCAAGAAGAGGTAATCAAACCTCTGTGGGAGGGAACCTCGTTCGAGCCCA

[0204]

	GATTGCAATCTGTGGGAAAAGCACAGGCGGAGGGGAAGAAGGGGGTGG CGAAGAAGGTGGGGGCAGGCAGCTCTATTAGCTCTTGCCAACAAATGC TGTCATGTAGGCTGCACAAAGCGATCACTGGCGAGATTCTGT
139	GATAAACTCATACTTGCCACCCTGCCCGGCTCCCGAGGCAGCAGGTGG ACCCTCAGTATTTTTGTTCCCTCCGAAACCTAAAGATACACTTATGATTAG CCGGACCCCTGAGGTAACGTGTGTGGTGGTTGACGTAAGTCATGAAGATC CAGAAGTAAAGTTTAACTGGTACGTAGACGGTGTGGAGGTACATAATGCG AAGACAAAACACGAGAGGAACAGTATAACTCTACCTACCGCGTAGTAA GCGTACTTACTGTGCTCCACCAAGACTGGCTTAACGGGAAAGAGTATAAG TGTAAGTCAGTAATAAAGCACTGGCCGCCCGATCGAAAAACAATCA GCAAGGCCAAAGGACAACCAAGGGAGCCTCAGGTCTATACTCTTCCCC GAGTAGGGATGAGCTTACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGCCTTGTC AGGGATTTTACCCGAGTGACATAGCCGTAGAATGGGAGTCAAACGGCCA ACCTGAAAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTACTCGACTCAGATGGAA GCTTTTTCTCTATAGCAAGCTGACCGTCGACAAAAGTAGGTGGCAACAG GGAAACGTCTTTAGTTGTTCCGTCATGCACGAAGCTTTCATAACCATTAC ACCCAGAAGAGTCTTTCCCTTTCCCCTGGCAAGGGGGGCTCCGACTCCTG GCAAGAGGAAGTAATCAAACGTGTGTGGGCGCGAGCTTGTCGCGCGCAA ATAGCCATTTGCGGAAAAAGTACTGGAGGAGGAGAGGAAGGCGGCGGC GAGGAAGGTGGGGGCAGGCAGCTGTACAGTGCCTTGCTAACAAGTGCT GCCATGTCGGCTGTACGAAAAGGTCTCTTGCTCAATTCTGT
140	GATAAGACACATACCTGTCCACCCTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGCG GCCCCAGCGTATTCCTGTTTCCTCCGAAGCCGAAAGACACACTTATGATT CCCGGACGCCTGAGGTAACCTTGCCTCGTAGTAGATGTGTCTCACGAAGAC CCCGAGGTGAAATTCAACTGGTACGTTGATGGTGTGGAAGTTCATAATGC GAAAACATAACCACGAGAGGAGCAATATAACTCAACTTATAGAGTTGTGA GCGTCTTGACGGTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGTACAA ATGCAAAGTCTCAAATAAGGCGTTGGCGGCTCCCATAGAGAAAACATCA GCAAAGCCAAGGGTCAACCTCGGGAGCCACAAGTGTATACTCTTCCGCC TAGTCGCGACGAGCTCACAAAGAATCAGGTGAGTCTTACTTGTTTGGTTA AGGGTTTCTACCCCAGTGACATTGCGGTCGAGTGGGAAAGTAACGGACA GCCTGAAAACAACATAAAACAACGCCTCCAGTACTCGATTGAGATGGTT CATTCTTTCTTTATTCCAACTCACAGTCGACAAGAGTAGATGGCAACAA GGGAACGTGTTTAGCTGTAGCGTACTCCATGAGGCACTCCACTCTCACTA

[0205]

	TACCCAAAAGTCTCTCAGCTTGTACCCGGAAAAGGCGGTTCTGACAGTT GGCAAGAGGAAGTGATTAAATTGTGTGGGCGGGAAGTTGTGAGGGCTCA AATCGCGATTTGCGGCAAGTCCACTGGTGGCGGCGAGGAAGGAGGAGGT GAAGAAGGAGGAGGTAGGCAACTGTATTGAGCGTTGGCGAATAAATGCT GCCATGTTGGATGTACTAAACGGAGCCTTGCTCAGTTCTGC
141	GATAAAACGCATACTTGCCCTCCTTGCCCGGCACCTGAAGCTGCCGGAGG TCCTTCCGTGTTCTGTTCACCTAAGCCAAAAGACACACTTATGATTTT TCGCACACCAGAAGTAACGTGCGTCGTAGTTGACGTCTCCCATGAAGACC CGGAGGTAAAATTTAATTGGTACGTGACGGGGTAGAAGTTCATAACGCA AAGACTAAACCACGAGAAGAGCAATACTCTACATACAGAGTAGTAA GCGTTCTCACCGTTCTTCATCAAGATTGGCTCAACGGAAAGGAGTATAAG TGTAAGGTGTCCAATAAAGCGTTGGCCGCACCAATCGAAAAGACCATAA GCAAAGCCAAAGGCCAACCCCGCGAACCGCAGGTGTACACACTTCCCCC GTCCAGGGATGAATTGACAAAAAACCAAGTTTCCCTCACGTGTCTCGTCA AGGGATTCTACCCGAGTGATATCGCAGTTGAATGGGAAAGCAATGGTCAG CCCGAGAATAACTACAAGACTACTCCCCCTGTGTTGGACTCAGACGGCTC ATTCTTCCTCTACAGTAAGTTGACTGTGGACAAAAGTCGGTGGCAGCAAG GCAATGTCTTCAGTTGTAGTGTAATGCATGAAGCACTCCACAATCATTACA CCCAAAAATCCCTGAGCCTGTCCCCGGGCGGAGGTTTCAGATTCATGGCAG GAGGAAGTTATAAACTGTGCGGGCGCGAGTTGGTGAGGGCGCAGATCG CAATCTGTGGAAAGAGTACGGGAGGTGGCGAAGAGGGTGGTGGAGAAG AGGGAGGAGGTGACAACTGTATTCCGCGCTCGCGAACAAGTGTTGCCA CGTTGGCTGCACCAAACGAAGCCTGGCTCGATTTTGC
142	GACAAGACACACACTTGTCACCTTGCCCGGCTCCCGAGGCGGCAGGAG GACCAAGCGTTTTTCTGTTCCCTCCCAAACCAAAGGATACGCTTATGATCT CTCGAACGCCGGAAGTTACTTGCGTAGTAGTTGATGTCTCCCATGAAGAT CCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTATGTAGATGGTGTGGAAGTTCATAACGC GAAAACCAAACCACGCGAAGAACAGTATAACAGTACTTATCGGGTTGTTT CAGTACTCACGGTGCTCCATCAAGACTGGCTTAATGGAAAGGAGTATAAA TGTAAGGTAAGTAACAAGGCATTGGCGGCTCCCATCGAGAAGACAATCTC CAAAGCAAAAGGGCAACCACGGGAGCCTCAGGTGTATACGTTGCCGCCC AGCAGAGATGAACTTACTAAGAATCAGGTGAGTCTCACTTGTCTCGTCAA GGGCTTCTATCCCAGCGATATAGCCGTAGAATGGGAGAGTAACGGTCAGC CGGAGAACAATACTACAAAACAACCCCGCCTGTTTTGGACTCCGATGGGAG

[0206]

	TTTTTTTCTCTACAGCAAACCTCACGGTAGACAAAAGCAGGTGGCAGCAG GGCAATGTTTTTCAGTTGCTCTGTTCTCCACGAAGCCCTCCACTCCCCTAT ACTCAGAAGTCTCTGAGTCTCTCACCAGGGGGAGGTAGCGATAGCTGGC AGGAGGAAGTGATCAAGTTGTGCGGGCGCGAACTCGTGCGGGCACAAT TGCTATATGCGGTAAAAGTACGGGAGGTGGAGAGGAGGGTGGAGGTGAA GAAGGCGGTGGTAGACAATTGTATAGTGCCTCGCCAACAAGTGTGTCA TGTCGGGTGTACGAAACGGTCCTTGGCGCGGTTTTGC
143	GACAAGACACATACTTGTCCACCATGTCCCGCCCCAGAAGCTGCGGGAG GACCATCAGTTTTTTTTGTTCCCCCGAAACCGAAGGATACCCTCATGATAA GTCGAACGCCCCGAAGTCACTTGCGTGGTGGTTGATGTTAGCCACGAGGA CCCAGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTCGAAGTTCATAAT GCGAAAACAAAGCCTCGCGAGGAACAGTACAACCTCTACATACAGGGTTG TGTCTGTTTTGACAGTCTTGACCAAGATTGGCTCAACGGGAAGGAATAT AAGTGTAAGGTAAGCAATAAAGCACTGGCGGCCCCGATCGAAAAAACGA TATCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGAGAGCCTCAGGTATATACTCTGCCG CCAAGCCGGGATGAACTGACTAAAAACCAGGTCTCTTTGACTTGTCTTGT CAAGGGATTTTACCCAAGTGACATTGCGGTAGAGTGGGAAAGCAACGGT CAACCAGAAAACAATTACAAGACGACACCGCCGGTACTCGACTCAGATG GATCCTTTTTCTGTATAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG CAAGGGAACGTATTTTCATGCAGCGTGATGCATGAGGCTCTTCACAACCA TTACACACAGAAAAGTCTGTCATTGAGCCCTGGCGGCGGGAGCGATTCTT GGCAAGAAGAAGTTATAAACTTTGCGGTGCGAGAGCTGGTTTCGGGCACA AATTGCTATCTGCGGAAAATCTACAGGAGGAGGCGAGGAGGGAGGGGGC GAAGAAGGCGGGGGGAGACAGTTGTACAGTGCCTCGCTAACAAGTGT GCCACGTCGGTTGCACAAAGAGATCCCTGGCTCAATTCTGT
144	GATAAACTCACACCTGTCCCCGTGTCCCGCACCAGAAGCGGCCGGTG GTCCCTCCGTTTTTCTCTTCCCTCCTAAACCTAAGGACACACTTATGATTA GCAGAACTCCAGAAGTTACGTGCGTAGTCGTTGACGTTAGTCATGAAGAT CCTGAGGTAAAGTTCAACTGGTACGTAGACGGAGTAGAGGTCCACAACG CCAAGACGAAACCCCGAGAAGAGCAGTATAATTCTACCTATCGAGTTGTT TCAGTATTGACGGTGCTTCACCAAGATTGGCTGAATGGCAAAGAGTATAA GTGCAAGGTAAGCAACAAAGCACTCGCGGCTCCTATCGAGAAAATATTT CCAAAGCTAAGGGCCAGCCTCGCGAACCACAAGTCTATACCCTGCCACC GAGTCGGGACGAACTCACCAAGAACCAAGTGTCTCTTACTTGCCCTCGTTA

[0207]

	AAGGTTTTTATCCCAGCGACATAGCCGTCGAATGGGAGTCCAATGGCCAA CCTGAGAACAACCTATAAACTACCCCTCCTGTACTTGATAGCGACGGAAG TTTTTTCCTCTATTCAAACTCACAGTTGATAAGTCTCGATGGCAACAGGG CAACGTCTTCTCTTGCAGTGTGTTGCATGAAGCTCTGCACTCTCATTACAC ACAGAAGAGTTTGTCTCTCAGTCCAGGTGGCGGCTCAGATAGCTGGCAG GAAGAAGTAATCAAGTTGTGCGGCAGGGAACCTGGTAAGGGCACAGATAG CCATTTGTGGAAAATCTACGGGTGGCGGTGAGGAAGGCGGCGGAGAAGA AGGGGGAGGTGCGCAGCTGTATAGTGCCTCGCAAACAAGTGCTGCCAT GTCGGGTGCACCAAGCGATCCCTTGCCCAGTTTTGC
145	GACAAAACGCACACCTGTCCACCGTGTCTGCTCCAGAGGCGGCCGGGG GACCGTCCGTTTTCTTTTTCTCCCAAACCTAAGGATACCCTTATGATCT CTCGCACGCCCAGGTTACCTGTGTTGTGGTTGACGTGTCCCATGAAGAC CCGGAAGTAAAATTTAATTGGTACGTGGACGGGGTCGAGGTTTCATAACGC AAAGACCAAGCCACGAGAGGAGCAATATAATTCCACCTATCGCGTAGTCT CCGTCCTCACCGTGCTTCACCAGGATTGGCTCAACGGGAAGGAATACAA ATGTAAAGTCAGTAATAAGGCTTTGGCGGCCCCGATTGAGAAGACTATAA GTAAGGCTAAGGGACAGCCACGAGAACCGCAAGTTTATACATTGCCCCC TCTAGGGATGAGTTGACTAAGAATCAGGTGTCACTCACTTGTCTGGTAAA AGGGTTCTACCCGTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGGCAA CCTGAAAATAATTATAAGACAACCCCTCCGGTGCTTGATAGCGACGGATC ATTCTTTCTCTATTCCAAGCTTACTGTAGATAAGAGTCGATGGCAACAGGG GAACGTATTCAAGTTGCTCTGTTCTCCATGAGGCCCTGCATAGTCACTACAC CCAAAAAGCCTTAGTTTGAGTCCCGGGAAAGGAGGCTCCGATTCTTGG CAAGAAGAGGTAATAAAGCTGTGTGGACGAGAACTTGTCAGAGCACAAA TTGCGATTTGTGGCAAATCTACAGGAGGGGGAGAAGGAGGCGGCGAAGG GGGAGGCGAGGGCAGGCAGGATTATCCGCTCTGGCGAACAATGTTGC CATGTTGGATGCACGAAACGAAGCCTGGCTCAGTTTTGC
146	GATAAAACGCATACCTGCCCACCGTGTCTGACCTGAGGCCGCTGGAGG ACCTTCCGTCTTCTCTTTCCACCCAAGCCGAAAGACACACTCATGATTA GTAGAACTCCAGAGGTCACGTGTGTTGTGGTGGACGTCACTACGAGGA CCCTGAGGTTAAGTTCAACTGGTACGTTGATGGCGTAGAAGTCCACAATG CAAAGACCAAACCGAGAGAGGAGCAATATAACAGTACATATAGGGTTGTT AGCGTACTTACTGTTTTGCATCAAGACTGGTTGAATGGGAAGGAATATAA ATGTAAAGTCTCCAACAAGGCTCTGGCTGCACCAATAGAAAAAACTATTT

[0208]

	CTAAGGCAAAGGGTCAGCCTAGAGAGCCTCAAGTCTATACCTTGCCACCG TCAAGAGACGAGCTCACTAAAAATCAGGTGAGCCTGACCTGTCTTGTGA AGGGCTTTTACCCGTCAGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAACGGTCAG CCGGAGAATAACTACAAGACGACCCACCAGTACTCGATAGCGATGGGTC TTTCTTTCTGTACTCCAAGCTCACCGTGGACAAATCACGCTGGCAACAGG GCAACGTCTTTAGTTGCAGCGTACTGCACGAGGCACTGCACAGCCACTAC ACACAAAAGAGTCTTTCTCTGTCTCCCGGTGGTGGCTCCGATAGTTGGCA GGAAGAAGTCATAAAGCTTTGTGGAAGAGAGCTTGTACGAGCGCAGATT GCAATCTGCGGGAAGAGCACTGGAGGAGGTGAGGGAGGGGGTGAGGGC GGGGGCGAAGGACGCCAGGACTATTCAAGCACTTGCAAACAAATGCTGCC ATGTAGGGTGTACGAAGCGCTCACTGGCCCCGGTTTTGC
147	GATAAAACACATACCTGCCCCCATGCCCAGCCCCGAAGCTGCAGGGG GGCCCTCTGTTTTCTTTTTCCACCCAAACCTAAAGATACTCTGATGATTA GTCGGACTCCGGAAGTGACTTGCGTCGTTGTCGACGTCTCTCATGAGGAT CCAGAAGTTAAGTTTAACTGGTATGTCGACGGGGTTGAGGTTTATAATGC AAAACTAAACCGAGAGAAGAACAGTACAACCTCTACTTATAGGGTTGTC AGTGTACTGACCGTCCTGCACCAGGATTGGCTTAACGGTAAGGAGTATAA GTGTAAAGTGTCCAATAAAGCCCTTGCCGCACCCATCGAGAAAACCATCT CCAAGGCAAAAGGACAGCCAAGGGAACCGCAGGTATATACACTTCCGCC AAGCCGAGACGAACTTACGAAGAACCAGGTGTCTCTCACGTGTCTCGTA AAAGGGTTTTATCCCAGCGATATCGCAGTTGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCAGAGAATAATTATAAGACAACCCCTCCCGTGCTGGATTCAGACGGGA GTTTTTTTCTTTACTCTAAGCTGACCGTAGACAAAAGTCGATGGCAGCAA GGCAACGTCTTTTCTGCTCCGTTCTCCATGAAGCACTGCATAGCCATTAT ACCCAGAAGTCACTGAGCCTCTCTCCAGGGGGCGGGTCCGATTCATGGC AGGAAGAGGTAATCAAACCTCTGTGGACGCGAACTGGTTCGCGCGCAGAT AGCGATTTGCGGCAAAAGCACAGGCGGTGGGGAAGGCGGTGGCGAGGG CGGTGGTGAAGGTCGACAAGATTATTCTGCTCTCGCTAACAAGTGTGTGTC ATGTAGGATGTACTAAAAGGAGTCTTGCGCAGTTCTGT
148	GATAAGACGCACACATGCCACCCTGTCCTGCGCCTGAAGCCGCGGGGG GACCCAGCGTTTTTCTCTTCCCGCCGAAACCGAAAGACACACTTATGATC AGCCGGACTCCCGAGGTTACCTGCGTGGTGGTAGATGTATCTCACGAGGA TCCCGAGGTCAAATTCAACTGGTACGTTGATGGGGTTGAAGTTCATAATG CCAAAACGAAGCCAAGAGAAGAGCAGTATAACTCCACATATAGAGTTGTT

[0209]

	TCCGTCTTGACTGTTCTTCACCAAGATTGGCTGAATGGGAAGGAGTACAA ATGTAAAGTTAGCAACAAGGCACTCGCCGCTCCCATTGAAAAAACTATAA GCAAAGCTAAGGGCCAACCGCGCGAACCACAGGTCTACACGTTGCCGCC CTCTAGGGACGAACTCACGAAGAATCAGGTTTCCCTTACCTGCCTCGTTA AAGGATTCTACCCCTCTGACATAGCGGTTGAATGGGAGAGCAACGGTCAG CCTGAGAACAACACTACAAAACGACGCCTCCGGTGTGGATTCCGACGGTA GTTTTTCTCTATAGTAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGGTGGCAGCAA GGGAATGTATTCTCCTGTTCACTCCTGCATGAAGCCCTCCACTCCCATTAT ACACAGAAATCTCTTTCTCTGAGTCCCGGTAAAGGTGGGAGTGACTCTTG GCAGGAAGAGGTAATTAAGTTGTGTGGAAGGGAGCTGGTAAGAGCACAG ATTGCCATCTGTGGCAAATCCACGGGCGGCGAAGGTGAGGGGGGTGAGG GGGAAGGGGGGTCCAGACAACGTATTCTGCTCTGGCGAATAAGTGTTGC CATGTAGGGTGCACTAAACGGTCCTTGGCGCAGTTCTGT
149	GATAAACTCATACGTGCCCACCTTGCCCCGCACCGGAGGCTGCTGGAGG ACCCTCTGTCTTCCTGTTCCCGCCGAAGCCTAAAGACACATTGATGATCA GTCGAACACCGGAAGTCACCTGTGTAGTGGTTGATGTGAGCCATGAGGA CCCTGAAGTAAAATTTAACTGGTATGTTGATGGCGTAGAAGTACACAACG CGAAGACTAAACCAAGGGAAGAGCAATACAACTCTACCTATAGGGTTCGTT AGCGTACTGACTGTGCTTCACCAAGACTGGCTTAACGGGAAGGAGTACA AGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCCCTCGCCGCGCCTATCGAGAAAACCAT TTCCAAAGCCAAGGGTCAACCAAGGGAGCCTCAGGTTTACACCCTGCCC CCTTCAAGGGATGAGTTGACAAAAAACAGGTAAGTCTGACGTGTCTCG TTAAGGGATTCTACCCGTCAGATATCGCGGTAGAGTGGGAGAGCAACGGT CAGCCAGAAAATAATTACAAAACAACACCTCCAGTTTGGACTCTGATGG GAGTTTTTTTCTTTATTCTAAGTTGACAGTGGATAAGTCACGCTGGCAACA GGGGAACGTATTTAGCTGCTCAGTACTTCATGAAGCGTTGCATTCTACTA CACACAGAAGAGCCTCTCCTTGAGTCCCGGAGGTGGCTCTGATTCTTGGC AGGAGGAGGTAATAAACTTTGTGGTAGAGAACTGGTTCGCGCTCAGATA GCTATTTGTGGAAAATCCACTGGCGGTGAAGGTGAAGGTGGAGAAGGAG AGGGCGGAAGCCGGCAGTTGTACTCTGCCCTGGCTAATAAGTGCTGTCAC GTGGGCTGCACTAAGCGGAGCTTGGCAAGATTTTGC
150	GATAAACTCATACCTGTCCACCTTGTCCTGCGCCTGAGGCAGCTGGAGG GCCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAACCCAAAGACACGCTCATGATTA GCCGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTTGTTGTGGACGTAAGCCACGAAGA

[0210]

	CCCCGAAGTTAAGTTTAATTGGTACGTCGACGGTGTTGAGG TTCATAACG CGAAGACTAAGCCGAGAGAGGAGCAATATAACAGCACCTACCGCGTAGT CTCAGTTCTTACCGTGCTCCACCAGGACTGGCTTAACGGGAAGGAATACA AATGCAAAGTTTCCAACAAAGCCTTGGCAGCCCCAATAGAGAAGACAAT ATCTAAGGCGAAAGGCCAACCGCGGGAACCGCAAGTTTATACCCTCCCA CCGAGCAGGGATGAGCTGACAAAAAATCAGGTTTCCCTCACTTGTCTGGT CAAGGGATTTTATCCTTCAGACATAGCCGTTGAATGGGAGAGTAATGGGC AGCCGGAGAATAATTACAAGACCACCCCCCGGTGTTGGACAGCGACGG TTCCTTCTTTCTCTATTCTAAACTTACCGTCGACAAATCACGGTGGCAACA AGGAAATGTATTCTCATGCAGTGTATTGCACGAAGCTCTGCACTCTCATT CACCCAAAAATCCCTCTCTCTCAGCCCTGGCGGTGGATCTGATTCTTGGC AGGAAGAGGTGATTAACTGTGTGGGCGAGAGCTTGTCCGAGCTCAGAT CGCTATTTGTGGCAAGAGTACCGGAGGCGAGGGTGAGGGAGGCGAAGGC GAGGGCGGAAGCCGGCAACTCTATAGCGCACTCGCTAATAAATGTTGTCA TGTCGGCTGCACGAAGCGCTCACTGGCGCAGTTCTGC
151	GACAAAACGCATACCTGTCTCCATGCCCGCTCCCGAGGCTGCCGGCGG ACCAAGCGTATTTCTCTTCCCCCTAAACCTAAAGACACATTGATGATAAG TAGGACGCCTGAAGTAACGTGTGTTGTCGTTGATGTAAGCCATGAAGATC CTGAAGTAAAGTTTAATTGGTATGTTGATGGCGTAGAAGTACATAACGCTA AGACGAAGCCACGGGAAGAGCAGTATAACTCAACTTACCGCGTTGTAAG CGTGCTTACCGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAATGGTAAGGAATATAAGT GCAAAGTAAGCAACAAAGCATTGGCCGCACCAATAGAGAAGACGATTAG TAAAGCAAAAGGCCAGCCCAGAGAGCCGCAGGTTTATACACTTCCACCA AGCAGAGATGAACTTACGAAGAACCAGGTGTCTCTGACTTGTCTGGTCA AGGGTTTCTATCCTTCCGACATTGCAGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAG CCCGAAAACAATTATAAGACGACACCTCCAGTGTTGGACTCAGACGGTTC CTTTTTCTTGTATTCCAACTTACAGTGGATAAGTCAAGGTGGCAGCAAG GCAACGTATTTTCTTGTAGTGTGTTGCACGAAGCCCTGCATTCCCACTATA CTCAAAGAGCCTCAGTCTGTCCCCAGGAAAGGGAGGGAGTGACAGTTG GCAAGAGGAGGTAATAAAATTGTGTGGCAGAGAGCTTGTGCGCGCTCAG ATCGCAATATGCGGGAAATCTACTGGGGGTGAGGGTGAGGGCGGCGAGG GAGAGGGGGGCAGTCGCCAAGATTATCCGCCCTTGCGAATAAGTGTTGT CACGTCCGATGTACTAAGAGATCATTGGCTCAGTTTTGT
152	ATGGAGACGGACACTTTGCTGCTTTGGGTACTGCTGCTTTGGGTTTCTGG

[0211]

	ATCTACTGGCGATAAAACACACACGTGTCCCCCTGCCCGGCTCCAGAGG CGGCTGGTGGTCCCAGCGTATTCTTGTTCCTCCCAAACCTAAGGATACG CTCATGATATCCCGCACCCCAGAAGTTACGTGTGTAGTCGTCGACGTCAG TCACGAAGATCCAGAGGTCAAATTTAACTGGTATGTCGACGGAGTAGAGG TCCACAATGCGAAAACCAAGCCCAGAGAAGAGCAGTACAACCTCCACGTA TCGCGTCGTCTCCGTCTCACCCTACTCCATCAAGATTGGCTGAATGGGA AAGAGTATAAATGCAAAGTATCTAACAAGGCTCTGCCAGCTCCGATAGAA AAGACTATATCAAAGGCCAAGGGGCAGCCAAGGGAGCCTCAAGTCTATA CTTTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTTACGAAAAACCAGGTCAGCCTTACC TGTCTTGTTAAAGGTTTTTATCCGAGTGACATCGCAGTGGAATGGGAATCT AATGGTCAACCTGAAAACAATTACAAAACCACACCGCCAGTATTGGACA GCGATGGTAGTTTTTTTCTTTACTCAAACTGACTGTAGATAAAAGCAGAT GGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCATGTAGCGTTATGCATGAGGCTCTTCAC AACCACTATACCCAAAAGTCATTGTCTCTTAGTCCCGGAAAGGGCGGAAG TGATTCTTGGAAGGAGGAGGTAATCAAGTTGTGCGGGCGAGAGTTGGTA CGGGCACAGATCGCGATATGCGGAAAATCCACAGGTGGGGGCGAAGGAG GAGGTGAGGGTGGAGGTGAAGGACGACAGTTGTATTCCGCCTTGGCAAA CAAGTGTTGCCATGTGGGTTGCACAAAACGCAGTCTTGCCCGCTTCTGT
153	ATGGAGACCGATACGCTGTTGCTGTGGGTATTGCTTCTCTGGGTGCCCGG CTCAACTGGGGATAAGACACATACATGCCCTCCCTGTCCGGCTCCAGAGG CAGCCGGGGGTCCATCAGTCTTCCTTTTTCCGCCTAAACCTAAGGATACA CTGATGATCTCTCGAACACCGGAGGTCACTTGTGTTGTCGTTGACGTATC ACATGAGGATCCCGAAGTAAAGTTCAACTGGTATGTCGATGGTGTGGAGG TTCATAATGCTAAAACTAAACCACGGGAGGAGCAATATAATTCCACATATA GGGTCTGTGAGCGTGTTGACGGTGCTTCATCAAGACTGGCTTAATGGGAAG GAATATAAATGCAAAGTGTCAAATAAAGCACTTCCTGCGCCAATCGAGAA AACAATTAGTAAGGCAAAGGGGCAGCCGCGAGAACCTCAGGTGTACACC TTGCCGCCTTCTAGAGACGAGCTCACAAAGAACCAAGTTTCCCTGACTTG CCTCGTTAAGGGGTTTTATCCGTCCGATATAGCCGTGGAGTGGGAGTCAA ACGGCCAACCGGAAAATAATTACAAAACGACACCCCCAGTATTGGATAGT GACGGCTCTTTTTTCCTTTATTCTAAGCTGACTGTGGACAAAAGCCGCTG GCAGCAGGGCAATGTCTTTTCATGCAGCGTAATGCATGAAGCCCTGCACA ACCACTACACGCAAAAATCCCTTTTCTTGTACCCGGCAAGGGCGGCTCT GACTCCTGGAAAGAGGAAGTTATAAACTCTGTGGCCGAGAACTTGTTT

[0212]

	GAGCTCAAATCGCGATTTGTGGTAAGTCAACGGGTGGGGGCGAAGGTGG AGGCGAGGGTGGGGGAGAAGGAGGAGGCCAGTTGTACTCAGCTCTTGC AAATAAGTGTTGCCACGTTGGTTGTACGAAGCGGAGCCTTGCTCGCTTCT GC
154	ATGGAAACTGATACTCTTCTGCTGTGGGTCTGCTGCTGTGGGTTCAGG ATCTACTGGAGACAAAACACATACTTGTCCGCCTTGCCCGGCACCCGAAG CGGCCGGCGGACCCAGTGTCTTTCTCTTCCACCCAAACCGAAAGACAC TCTGATGATTTCCAGGACGCCTGAAGTGACCTGCGTTGTAGTTGATGTATC ACACGAGGATCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAGG TCCATAATGCAAAGACGAAGCCACGGGAGGAACAGTACAACCTCTACGTA CAGAGTTGTCAAGTGTGTTTACCGTCCTTCATCAGGATTGGCTGAACGGTA AAGAATATAAATGCAAGGTTAGCAATAAAGCTTTGCCCCGCCCTATAGAG AAAACGATCAGTAAGGCGAAGGGGCAGCCTAGGGAACCCAGGTATATA CCTTGCCGCCAAGTCGAGATGAGCTGACGAAGAACCAAGTGAGTCTGAC ATGCCTCGTGAAGGGCTTCTATCCGAGCGATATCGCTGTGCAATGGGAGA GCAATGGGCAGCCTGAGAATAACTATAAAACAACGCCACCCGTCCTCGAC TCCGATGGCTCATTCTTCTGTACAGTAACTTACAGTAGATAAGAGTAGA TGGCAGCAGGGTAACGTCTTTAGTTGCTCCGTGATGCACGAGGCATTGCA CAATCATTACACTCAAAAATCTCTGTCCCTGAGTCCGGGCAAAGGCGGTT CAGATAGCTGGATGGAGGAGGTCATAAAGCTTTGTGGACGAGAACTCGTT CGCGCCCAGATAGCTATTTGTGGGAAATCAACCGGGGGTGGAGAAGGTG GCGGAGAAGGGGGAGGCGAAGGGCGCCAACTGTATTCTGCATTGGCTAA TAAGTGCTGTCACGTAGGATGTACAAAAGGTCTCTGGCGAGATTCTGC
155	ATGGAGACCGACACCCTCTTGTTGTGGGTCTCCTCTTGTTGGGTGCCCCG CAGTACTGGAGACAAGACGCACACTTGTCCACCTTGCCCTGCGCCGGAA GCTGCTGGAGGCCCCAGTGTCTTTTGTGTTCCCGCCCAAACCGAAGGACA CTTTGATGATAAGTCGCACGCCCCGAGGTTACCTGTGTGGTTGTGATGTCT CACACGAAGATCCGGAGGTGAAGTTTAATTGGTATGTAGATGGCGTGGAG GTTTATAACGCCAAAACGAAACCCAGAGAAGAACAATATAACAGTACATA TCGAGTAGTATCCGTTCTCACTGTCCTGCATCAAGACTGGTTGAACGGGA AGGAATATAAGTGCAAGGTGAGCAATAAAGCACTCCCGGCCCAATCGA AAAGACCATCAGCAAAGCGAAGGGGCAACCTCGAGAACCCAGGTATAT ACGCTCCCCCTAGTCGGGATGAACTTACTAAAAATCAGGTTAGCCTCAC TTGCCTTGTTAAAGGGTTCTATCCAGTGATATTGCCGTGCAATGGGAATC

[0213]

	AAACGGGCAGCCGGAATAAATACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTCGAT AGCGATGGCTCTTTTTCTCTACAGCAAACCTACCGTTGATAAGAGCCG GTGGCAACAAGGTAATGTTTTCTCCTGCTCCGTTATGCATGAAGCACTCC ATAACCATTATACCCAAAAAAGCCTGTCACTTAGTCCGGGTAAAGGAGGT AGTGATTCTTGGCAGGAGGAGGTAATCAAACCTTGTGGGAGGGAGCTGG TACGAGCTCAGATTGCTATATGTGGAAAAAGCACGGGCGGAGGAGAAGG AGGTGGCGAAGGCGGGGGTGAAGGTCGGCAACTCTACTCCGCTCTCGCT AATAAGTGCTGCCACGTCGGGTGTACGAAGCGCTCCCTGGCGCGATTCTG C
156	ATGGAAACAGATACCCTCCTCCTCTGGGTCCTTCTTCTTTGGGTGCCTGGC TCAACTGGAGATAAAACGCACACGTGTCCGCCCTGCCCAGCGCCTGAAG CCGCAGGCGGGCCGTCCGTCTTCTCCTTCTTCTCCAAAACCCAAAGACAC ACTTATGATCAGTAGGACCCAGAGGTAACTGCGTCGTGGTCGACGTTT CCCATGAAGACCCAGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTCGACGGTGTGCA AGTACATAATGCTAAACGAAGCCTCGGGAAGAGCAGTACAACCTCTACCT ACCGCGTCGTTTCCGTACTCACCGTACTTCACCAGGACTGGCTTAACGGT AAAGAGTATAAATGCAAAGTATCTAATAAGGCTCTCGCCGCGCCGATTGA GAAGACAATTTCAAAGGCCAAGGGGCAGCCGCGGGAGCCCCAAGTGTAT ACCTTGCCCCCGTCCCGAGATGAGCTGACTAAAAACCAAGTAAGCTTGA CTTGCTTGGTCAAAGGCTTCTACCCTTCCGATATAGCTGTGAATGGGAGT CAAATGGCCAACCAGAGAACAATTATAAACTACACCCCCGGTCTTGGAT TCTGATGGCTCATTTTTTCTCTATTCTAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGCT GGCAGCAAGGTAACGTGTTTCAAGTTGCTCTGTTCTTACGAAGCACTGCAC AGTCATTACACTCAGAAGAGTCTTAGCCTGAGCCCTGGTAAAGGGGGTTC TGATTCTTGGCAGGAGGAAGTAATAAACTCTGTGGCCGGGAGTTGGTAC GGGCGCAGATTGCGATATGCGGTAAGAGCACCGGCGGAGGCGAAGGCGG TGGGGAAGGAGGAGGAGAAGGGAGACAACCTCTATTCCGCATTGGCAAAT AAGTGCTGCCACGTCGGGTGTACCAAACGATCCCTTGACGGTTCTGT
157	ATGGAGACGGACACCCTCCTTCTCTGGGTTTTGCTCCTTTGGGTCCCTGG TTCCACTGGAGATAAGACCCATACGTGCCCCCTTGCCCTGCGCCTGAGG CAGCGGGTGGCCCATCAGTCTTTTTGTTCCCGCCCAAGCCAAAGGACACC CTCATGATTAGTAGAACACCGGAGGTTACGTGCGTCGTAGTGGATGTCAG CCACGAGGATCCCGAGGTAAAGTTAACTGGTACGTTGATGGGGTTGAGG TCCATAATGCGAAGACTAAGCCGAGAGAGGAACAGTACAATTCCACGTAT

[0214]

	AGAGTTGTCTCTGTACTGACTGTGCTGCATCAAGATTGGCTTAACGGTAA GGAGTACAAGTGCAAAGTCTCTAATAAGGCTCTTCCTGCACCCATTGAGA AAACTATAAGCAAAGCAAAAGGTCAACCTCGCGAACCTCAGGTGTACAC ACTGCCACCCTCTAGGGACGAGCTTACCAAAAATCAAGTATCTCTTACCT GCCTTGTGAAAGGGTTTTATCCCTCAGATATTGCGGTTGAGTGGGAGTCT AACGGACAACCTGAGAACAACCTATAAGACTACTCCCCGGTGCTTGATTC AGACGGGAGTTTTTTTTTGTATAGCAAACCTTACCGTCGACAAAAGCCGGT GGCAACAGGGCAATGTATTCAGTTGTTCTGTAATGCATGAAGCTTTGCATA ATCATTACACCCAAAAGAGTCTTTCCTGTCTCCTGGAAAAGGGGGGTCA GACTCCTGGATGGAGGAGGTGATCAAACCTGTGTGGGAGAGAGCTCGTCC GGGCTCAGATAGCTATATGCGGCAAGTCTACGGGTGGGGGAGAGGGCGG AGGAGAGGGCGGTGGAGAAGGAGGCGGCCAACTCTACAGCGCTCTGGC CAATAAATGTTGTCATGTCGGGTGTACTAAGCGCTCACTGGCACGCTTTTG C
158	ATGGAAACCGACACCCTTTTGTGTTGTGGGTATTGCTGTTGTGGGTTCCTCG TAGCACGGGGGACAAGACGCATACATGCCCCGCCATGCCCGGCCCGGAA GCTGCTGGGGGACCATCCGTATTCTCTTCCCTCCCAAACCAAAAAGACAC GTTGATGATAAGTAGAACACCAGAGGTAACGTGCGTGTTGTCGATGTTT CCCACGAAGATCCGGAGGTAAAATTCAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAA GTGCACAATGCCAAAACAAAGCCGCGAGAAGAACAATACAATAGTACTT ACCGGGTTGTGAGCGTGCTCACGGTGTTGCACCAAGACTGGCTCAACGG CAAGGAATACAAGTGCAAAGTATCTAATAAAGCTCTGCCTGCGCCGATAG AGAAGACCATCAGTAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCGCAAGTTTA CACTCTTCTCCTCCGAGCAGAGATGAATTGACCAAGAACCAAGTAAGTTTGA CGTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCAGACATTGCGGTGGAGTGGGA AAGTAATGGTCAACCGGAAAACAACCTACAAGACCACGCCGCCCGTCTCTC GACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTTTATTCAAAGTTGACAGTAGATAAGTCA AGGTGGCAGCAAGGTAACGTGTTTAGTTGTAGTGTAATGCACGAGGCCCT GCATAATCATTATACCCAAAAGAGTTTGAGCCTCTCACCAGGAAAAGGCG GATCAGACAGCTGGCAGGAGGAGGTAATTAAATTGTGTGGACGGGAGTT GGTCAGGGCGCAAATAGCCATCTGCGGTAAGAGCACGGGTGGAGGAGAG GGTGGAGGGGAAGGTGGGGGAGAAGGCGGCGGGCAGCTCTATTCTGCA CTCGCCAACAAGTGTTGTCACGTGCGATGCACAAAGAGATCTCTTGCTCG ATTCTGC

[0215]

159	ATGGAGACTGATACTCTTTTGTGTGGGTACTGCTCCTGTGGGTTCAGGC TCCACAGGAGACAAAACACACACCTGTCCGCCTTGCCCGGCTCCTGAAG CCGCGGGTGGCCCTAGTGTGTTTTTGTTCGCGGAAACCTAAGGATACC CTCATGATAAGCCGGACGCCCGAGGTTACCTGTGTCTGTGGTTCGATGTTAG TCATGAGGATCCAGAAGTCAAGTTTAATTGGTACGTCGACGGCGTTGAAG TCCACAATGCAAAAATAAACC GCGAGAAGAACAGTACA ACTCCACCTA CAGAGTTGTCTCAGTTTTGACAGTTCTCCATCAGGATTGGCTCAATGGAA AGGAATATAAGTGCAAGGTCAGCAATAAAGCGCTTGCCGCCCTATAGAG AAGACCATTAGCAAGGCGAAAGGACAGCCCCGCGAGCCCCAGGTCTATA CGCTGCCTCCTAGCAGAGATGAGCTCACGAAAAATCAGGTCAGCTTGAC ATGCTTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGTGACATCGCAGTTGAATGGGAGA GCAACGGCCAACCTGAGAACA ACTACAAAACAACGCCCCCGGTTCTTGA CAGCGATGGGTCCTTCTTTCTTTACTCTAAGCTTACAGTTGATAAAGCAG GTGGCAGCAGGGGAATGTGTTCTCATGTTCCGTACTGCATGAGGCTCTGC ATTCTCACTACACCCAAAAAAGCCTTAGCCTGAGCCCCGGTAAGGGAGG TAGTGACTCATGGCAAGAGGAAGTGATTAAGCTCTGCGGCCGGGAGTTG GTGAGAGCCCAAATCGCCATTTGCGGTAAAAGTACCGGAGGGGGCGAGG GAGGAGGCGAAGGTGGAGGTGAAGGAGGTGGACAGTTGTACTCAGCTC TTGCAAATAAATGTTGTCATGTTGGTTGCACGAAAAGATCTCTTGCGAGG TTCTGT
160	ATGGAGACTGACACTCTTTTGTGTGGGTGCTTCTTCTGTGGGTACCTGG ATCCACTGGGGATAAGACGCATACTTGTCCACCGTGCCCCGCACCGGAAG CGGCTGGTGGTCCATCAGTTTTTCTGTTCCACCGAAACCTAAGGACACG TTGATGATATCACGGACACCAGAGGTTACGTGCGTAGTGGTGGATGTGAG CCACGAGGATCCAGAAGTTAAATTTAATTGGTACGTAGATGGAGTGGAGG TTCATAATGCGAAGACAAAGCCTCGCGAGGAACAGTATAATTCCACCTAT CGCGTCGTATCTGTGCTTACGGTACTTCACCAAGACTGGTTGAACGGTAA GGAATATAAATGCAAGGTTTCCAATAAAGCACTTCCTGCGCCAATTGAGA AGACAATATCCAAAGCTAAAGGTCAACCCAGGGAACCGCAAGTCTACAC TCTCCCCCGTCTCGCGATGAATTGACGAAGAACCAGGTTAGTCTCACCT GCCTGGTCAAGGGGTTTTACCCCTCTGACATAGCTGTAGAATGGGAGTCT AATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAAACGACCCCCCGGTCCTCGATT CTGATGGGAGTTTTTTTCTTTATTCAA AATTGACTGTCGATAAGTCAAGAT GGCAACAGGGTAACGTATTTTCTTGCAGTGTTATGCATGAAGCATTGCAC

[0216]

	AACCACTATACACAAAAATCATTGAGTTTGAGTCCCGGTAAAGGGGGAA GCGACTCATGGATGGAAGAAGTAATCAAGCTGTGCGGGCGAGAGCTTGT GCGAGCTCAGATAGCAATCTGTGGTAAGTCTACAGGTGGAGAGGGTGGC GGTGAAGAAGGCGGGGGAGAGGGAGGCCAGCTTTATTCTGCCCTGGCTA ACAAGTGCTGTCACGTTGGATGCACGAAGCGCTCCCTGGCCCCGATTCTGC
161	ATGGAAACCGATACATTGCTTTTGTGGGTCTCCTTCTTTGGGTTCTTGGC TCTACAGGCGATAAGACGCATACTTGTCCCCCATGTCCCGCTCCGGAAGC CGCTGGCGGCCCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCGCCGAAACCGAAAGACACCC TGATGATATCACGCACTCCCGAGGTCACCTTGCCTGGTAGTCGATGTTAGTC ATGAAGATCCTGAGGTCAAATTCAATTGGTATGTAGATGGCGTTGAGGTA CACAACGCGAAGACAAAACCCCGAGAAGAACAGTATAACTCAACCTACC GCGTAGTTTCAGTTCTTACCGTACTGCACCAAGACTGGTTGAACGGTAAA GAGTACAAATGTAAAGTCAGCAATAAAGCTTTGCCAGCACCTATCGAAAA AACCATCAGTAAGGCCAAGGGTCAACCCAGGGAGCCGCAAGTGTACACT CTTCCCCCTAGCAGGGATGAATTGACCAAGAATCAGGTCTCTTTGACGTG CCTCGTTAAGGGTTTCTATCCCAGCGATATAGCCGTAGAATGGGAGTCTAA CGGTCAGCCAGAAAATAACTATAAGACAACCCCGCCTGTTTTGGATTCCG ACGGCTCTTTTTTCTCTACTCTAAGTTGACCGTTGATAAGAGCAGATGGC AGCAGGGAAACGTATTTTCTTGTTCCTGATGCACGAAGCCCTGCACAAT CACTATACGCAAAAGTCTCTGAGCTTGAGTCCGGGTAAAGGCGGTTCTGA CTCCTGGCAGGAGGAAGTCATAAACTCTGCGGAAGAGAGCTCGTAAGG GCGCAAATCGCTATTTGTGGTAAGAGCACCGGTGGGGAAGGAGGCGGTG AAGAGGGTGGCGGCGAGGGTGGGCAATTGTATTCCGCGCTTGCCAATAA ATGTTGTCACGTAGGCTGCACAAAGCGAAGTCTCGCTAGGTTCTGC
162	ATGGAAACCGACACCTTGCTTTTGTGGGTGCTCTTGCTGTGGGTTCCGGG GAGCACTGGCGACAAGACCCACACATGTCCCCCGTGTCCGGCACCAGAA GCAGCGGGGGGACCGTCAGTATTCTTGTTCACCGAAGCCCAAAGACA CATTGATGATTTACGAACCTCTGAAGTTACCTGTGTGGTTGTAGATGTAT CACACGAAGACCCAGAAGTCAAATTCAATTGGTATGTCGACGGGGTTGA AGTTCACAATGCGAAGACGAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAACAGCAC GTACAGGGTTGTGAGCGTTCTTACTGTATTGCACCAGGATTGGCTCAACG GCAAGGAGTATAAATGTAAAGTTTCTAATAAGGCTCTTCTGCCCAATTG AAAAGACGATATCTAAAGCGAAGGGCCAACACGGGAACCTCAGGTGTA CACACTCCGCCTAGCAGGGATGAGTTGACCAAGAATCAAGTCTCTTTGA

[0217]

	CGTGCCTGGTCAAGGGGTTTTACCCATCAGATATCGCCGTCGAATGGGAG TCAAACGGACAACCCGAAAATAACTATAAACTACTCCACCAGTTCTGGA TAGCGACGGCTCATTTTTTCTGTATTCAAAGCTCACTGTAGACAAGTCTAG GTGGCAGCAGGGTAATGTCTTCTCCTGCTCAGTAATGCATGAGGCTCTTC ACAACCACTATACTCAAAAGAGCCTTTCCCTGTCACCTGGCGGTGGAAGC GACTCATGGATGGAGGAGGTAATAAAGCTCTGCGGAAGAGAACTGGTAC GCGCACAAATCGCAATTTGTGGTAAGAGTACTGGCGGGGAAGGAGGTGG GGAAGAAGGGGGCGGTGAGGGCGGACAGCTCTATTCTGCACTTGCAAAC AAATGTTGCCACGTGGGATGTACTAAGCGAAGCCTTGCAAGATTCTGC
163	ATGGAGACCGACACACTGTTGCTGTGGGTACTCCTCCTGTGGGTGCCAGG AAGCACGGGCGATAAAACCCACACATGCCCTCCATGCCCTGCTCCAGAG GCCGCCGGTGGGCCATCAGTTTTTCTTGTTCGCTAAACCAAAGGACAC GCTTATGATCTCCAGGACCCCCGAAGTTACGTGTGTGGTGGTTGATGTTA GTCACGAGGACCCGGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTTGATGGTGTAGA GGTGCACAATGCAAAGACGAAGCCACGCGAAGAACAATACAACAGCAC ATATCGAGTTGTGAGCGTACTCACGGTACTGCATCAGGACTGGCTGAACG GTAAAGAATACAAATGTAAAGTCTCCAATAAGGCACTTCCTGCGCCGATA GAAAAAACGATCAGTAAGGCCAAGGGCCAACCCCGAGAACCACAGGTAT ATACGCTCCCACCGTCACGAGACGAGTTGACAAAAAATCAGGTCTCCCTG ACTTGCCCTCGTGAAAGGTTTTTATCCCTCAGATATTGCTGTTGAGTGGGAA AGCAATGGGCAGCCAGAGAATAATTATAAGACGACTCCTCCGGTTTTGGA TTCCGACGGTAGTTTTTTCTTGTATAGTAAGCTTACTGTAGACAAGTCAAG ATGGCAACAAGGTAATGTGTTCTCTTGCTCAGTTATGCATGAAGCTCTTCA TAACCATTACACGCAAAAGAGTCTCAGTCTGAGCCCCGGTGGCGGTAGC GACAGTTGGCAGGAAGAGGTGATTAAGTTGTGCGGTGCGGAGCTCGTTC GGGCCCAAATTGCAATCTGCGGAAAATCTACGGGCGGAGAGGGCGGGGG TGAGGAGGGTGGGGGTGAAGGTGGGCAGCTCTATAGCGCCCTTGCGAAT AAATGTTGTCACGTTCGGATGCACAAAGAGGTCCCTCGCCAGGTTCTGC
164	ATGGAACTGACACACTGTTGCTGTGGGTGCTGCTCCTTTGGGTACCCGG ATCAACCGGGGATAAGACCCACACTTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAAG CGGCCGGAGGTCCTTCAGTATTTTTGTTTCCACCGAAACCCAAAGATACT TTGATGATATCAAGAACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTAGTTGACGTATCT CATGAGGATCCCGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTTCGATGGCGTCGAGGT TCATAACGCTAAGACTAAGCCGAGGGAAGAGCAATATAATTCCACTTATA

[0218]

	GGGTGGTGTCCGTCTTGACTGTTTTGCACCAGGATTGGTTGAACGGGAAA GAGTACAAATGTAAGGTGAGTAATAAAGCTTTGGCTGCTCCCATCGAAAA GACAATAAGCAAGGCCAAGGGGCAACCTCGGGAGCCGCAGGTGTACACC CTTCTCCAGTAGAGACGAACTGACAAAAAACAGGTGTCCCTGACCT GCCTTGTGAAGGGGTTTTACCCGAGCGACATAGCGGTTGAATGGGAGAG CAACGGGCAACCCGAGAACAACCTACAAAACCTACACCGCCTGTCCTGGAC TCCGATGGAAGCTTCTTCTCTACTCCAACTGACCGTGGACAAAAGCAG ATGGCAACAAGGAAACGTATTCTCATGCTCAGTAATGCACGAAGCATTGC ACAATCACTACACCCAAAAGTCCCTCTCACTCTCCCCTGGTAAGGGCGGA TCAGACTCATGGCAAGAGGAGGTAATTAAGTTGTGCGGGAGGGAGCTCG TCCGCGCGCAAATAGCCATTTGTGGCAAGTCCACTGGAGGAGGCGAGGG TGGAGGAGAGGGTGGTGGGGAGGGCAGGCAACTCTACAGTGCCTCGC CAATAAATGCTGCCATGTTGGGTGCACGAAGCGCAGTCTCGCACAATTCT GC
165	ATGGAGACCGACACTCTGCTGCTCTGGGTACTCTTGCTGTGGGTGCCTGG GTCTACTGGGGATAAGACCCACACGTGTCCTCCATGTCCGGCACCGGAGG CTGCTGGCGGGCCTTCTGTATTCTCTTCCCACCCAAGCCAAAAGACACA TTGATGATATCAAGGACGCCGGAAGTCACCTGTGTTGTTGTGGACGTTTC CCATGAAGACCCAGAGGTAAAATTCAATTGGTATGTGGACGGCGTAGAGG TTCACAACGCCAAAACCAAACCCCGAGAGGAACAGTATAATAGCACATAT CGAGTAGTATCTGTTCTCACAGTGCTCCATCAAGACTGGCTTAATGGTAA AGAGTATAAATGCAAAGTTTCCAATAAAGCCCTCGCTGCACCGATCGAGA AGACAATCAGTAAAGCGAAGGGCCAGCCTCGGGAACCGCAGGTGTATAC TCTTCCACCCTCAAGAGACGAGCTCACTAAAAACCAAGTTTCATTGACAT GCCTCGTCAAAGGTTTCTACCCATCAGACATCGCGGTCTGAATGGGAAAGT AATGGGCAGCCGGAACAACCTATAAACGACGCCGCCCGTCTTGGATT CTGATGGTTCATTTTTTCTTTACTCTAAATTGACCGTCGATAAAAGTAGGT GGCAACAAGGAAATGTTTTTCTGCTCCGTCCTGCATGAAGCGTTGCAC AGTCACTATACCCAGAAGAGTCTTTCTTTGTCACCCGGAAGGCGGTTC AGATTCATGGCAGGAAGAAGTAATTAACCTCTGTGGCCGCGAGCTTGTTA GGGCGCAGATAGCCATATGTGGTAAAAGCACCGGAGGAGGTGAAGGCGG AGGCGAAGGAGGTGGGGAAGGAAGACAATTGTATTCTGCACTTGCAAAT AAATGCTGTCTATGTGGGGTGCACGAAACGCAGTCTTGACACAATTTGT
166	ATGGAAACCGATACGCTGCTTCTTTGGGTTCTTCTCTCTGGGTTCCAGG

[0219]

	GTCCACCGGCGACAAAACCCATACCTGCCCCCTTGCCCTGCACCAGAA GCGGCGGGAGGACCTAGCGTTTTTCTTTTCTCCTCCGAAACCGAAAGATAC CCTCATGATATCAAGAACACCTGAGGTTACTTGCGTTGTCGTGGACGTGA GTCACGAAGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTAGATGGAGTGGA GGTCCATAATGCAAAAACGAAACCGAGAGAAGAACAATACAACCTCTACA TATCGAGTCGTGTCAGTACTCACGGTTTTGCATCAAGATTGGCTGAACGG TAAGGAGTACAAGTGTAAGGTTAGCAACAAGGCTCTCGCGGCGCCGATA GAAAAGACTATAAGTAAAGCAAAAGGCCAGCCAGAGAACCTCAAGTTT ACACTCTGCCTCCCAGCAGAGATGAACTGACTAAAAATCAGGTTTCATTG ACCTGTCTCGTCAAGGGTTTTTATCCAAGCGACATAGCAGTTGAATGGGA AAGCAACGGTCAACCAGAAAATAATTACAAAACCACTCCACCAGTCTTG GACTCTGACGGATCCTTCTTTCTCTATTCAAATGACGGTGGATAAATCT AGGTGGCAGCAAGGCAACGTCTTCTTGTAGCGTTATGCATGAGGCGCT GCACAACCACTACACACAAAAGTCTCTTAGTTTGAGCCCGGGCGGCGGA AGCGACTCTTGGCAAGAGGAAGTGATAAACTCTGTGGTCGAGAATTGG TACGCGCGCAGATCGCTATCTGCGGCAAGTCCACAGGGGGAGGGGAAGG TGGCGGGGAAGGTGGTGGCGAGGGCAGGCAGTTGTATAGTGCACCTGCC AACAAGTGCTGCCATGTGGGGTGCACCAAGCGCAGTTTGGCACGGTCT GC
167	ATGGAAACGGACACCCTTCTGCTCTGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCTG TTCTACCGGTGATAAACTCACACTTGTCCCCGTGTCCGGCACCAGAAG CCGAGGAGGGCCATCTGTCTTTCTTTTCCCCCAAACCCAAGGATACA CTGATGATCTCCCGCACTCCCGAAGTTACTTGTGTCGTAGTAGACGTTTCT CACGAGGACCCAGAGGTGAAATTCAATTGGTATGTTGACGGAGTAGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGAGAGGAACAATACAATTCAACCTAC AGAGTAGTGTCCGTTCTTACGGTTCTCCATCAGGATTGGCTCAACGGTAA GGAATATAAGTGCAAGGTAAGCAACAAAGCGCTGGCCGCACCCATTGAG AAAACCATTTCAAAGCTAAAGGCCAACCCCGCAACCACAAGTTTATA CTCTCCCCCAAGTCGCGATGAACTTACAAAAAATCAAGTCTCATTGACG TGCTTGGTCAAAGGCTTCTACCCGAGCGATATCGCTGTTGAATGGGAGTC TAATGGACAACCGGAAAATAACTATAAACTACACCCCCAGTCCTCGATT CAGACGGCAGCTTCTTCTGTATTCAAACCTGACGGTTGACAAATCACGC TGGCAACAGGGTAACGTTTTTCTGTAGCGTTCTTCATGAAGCCTTGCA CAGTCACTACACCCAGAAGTCCCTTAGCTTGTCACCTGGCGGGGGTTTCAG

[0220]

	ACTCTTGGCAGGAGGAGGTAATCAAACCTGTGCGGAAGAGAACTGGTGAG GGCTCAGATTGCAATTTGTGGGAAGAGCACGGGTGGCGGTGAAGGAGGT GGCGAGGGCGGAGGAGAGGGGAGGCAACTCTACAGTGC GTTGGCTAATA AATGCTGTCACGTCGGCTGTACTAAGAGAAGCCTCGCCAGATTTTGC
168	ATGGAAACAGATACTTTGTTGCTGTGGGTACTCCTCCTCTGGGTACCTGG GAGCACCGGGGACAAGACGCATACTTGCCCTCCGTGCCCTGCACCAGAA GCCGCTGGTGGCCCATCTGTGTTTTTTGTTCCCCCTAAGCCAAAAGACAC ATTGATGATTTACGAACTCCAGAAGTGACTTGCGTAGTTGTTGACGTATC ACACGAAGACCCCGAGGTAAATTTAATTGGTATGTGGACGGGGTCGAGG TGCATAACGCCAAAACCAAACCCCGGAGGAACAATAACTCTACGTAT CGGGTCGTATCTGTGTTGACCGTCCTTCACCAAGATTGGTTGAACGGCAA GGAATATAAGTGTAAGTGTCTAATAAAGCATTGGCTGCCCCGATAGAAA AGACGATCTCTAAAGCCAAGGGCCAACCCAGAGAGCCTCAAGTATATACT CTCCACCGAGTCGAGATGAGCTACTAAGAACCAGGTGTCACTCACGT GTCTGGTTAAAGGATTTTACCCTAGTGATATAGCCGTCGAGTGGGAATCAA ATGGGCAGCCGGAGAATAACTATAAGACCACGCCTCCAGTTCTCGATTCC GATGGTAGCTTTTTCTTTACTCTAAACTTACGGTCGACAAGTCCAGGTG GCAACAGGGCAATGTATTTTCTTGCTCCGTCATGCACGAGGCTTTGCACA ACCATTACACGCAAAAGTCACTGTCCCTGTCTCCTGGAGGCGGTTCTGAC AGTTGGCAGGAGGAGGTAATCAAATTGTGTGGGCGGGAGTTGGTTAGGG CGCAAATTGCTATTTGCGGCAAAAGTACTGGGGGCGGTGAAGGCGGAGG CGAGGGAGGAGGAGAAGGTCGACAACCTGTATTCTGCCTTGCGAACA TGCTGTCACGTCGGCTGTACGAAACGGTCTTTGGCCCAGTTTTGT
169	ATGGAAACTGACACTCTTCTGTTGTGGGTCCTTCTGCTGTGGGTTCTGG CTCTACTGGAGATAAGACACACACTTGTCCGCCATGCCCTGCGCCGGAAG CGGCGGGAGGACCGTCCGTTTTCTGTTCCCTCCCAAACCCAAAGACAC GTTGATGATTAGTCGCACGCCAGAAGTTACGTGCGTTGTCGTAGATGTATC CCACGAAGACCCCGAGGTGAAGTTCAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAG GTCCATAACGCTAAGACCAAACACGCGAGGAACAATAATTCTACGTA CCGCGTAGTGAGCGTTCTCACAGTTCTTCACCAGGATTGGCTTAACGGCA AGGAGTATAAGTGTAAGGTGTCTAATAAGGCCTTGGCTGCCCCGATCGAA AAAACGATAAGTAAAGCAAAGGGTCAACCTAGAGAACCCCAAGTGTACA CTCTCCCGCCATCACGGGATGAATTGACTAAGAACCAAGTGTCACCTACG TGCTTTGTAAAGGGCTTCTACCCATCCGATATAGCCGTTGAGTGGGAATCC

[0221]

	AATGGTCAGCCAGAGAACAACCTATAAGACAACCTCCGCCCCGTA CTTGATAG TGACGGTTCCTTTTTCTTTACAGTAAATTGACGGTAGATAAGTCTCGCTG GCAGCAAGGAAACGTCTTTTCTTGTTCA GTGCTTCATGAGGCGCTTCACT CACACTATACTCAGAAGAGTTTGAGTTTGTCTCCAGGTGGAGGCAGCGAC TCATGGCAAGAGGAAGTAATCAAAC TGTGTGGTCGCGAATTGGTACGAG CACAGATCGCGATCTGCGGGAAATCAACAGGTGGCGGCGAAGGCGGCGG GGAAGGCGGCGGCGGAAGGTAGGCAACTTTACTCAGCCCTTGCGAACAAA TGTTGCCACGTAGGCTGTACTAAGAGAAGTCTCGCCAGTTTTGC
170	ATGGAGACAGATACCCTTCTGTTGTGGGTCCTTCTGCTTTGGGTGCCGGG AAGTACAGGCGACAAGACTCATACCTGCCCCCTTGTCAGCACCAGAA GCAGCTGGCGGGCCAAGCGTGTTCTGT TCCACCTAAGCCCAAAGATAC GTTGATGATCAGCCGCACCCCGGAAGTAACCTGTGTAGTAGTAGATGTGT CCCACGAAGACCCCGAAGTAAAGTTTAATTGGTACGTCGATGGTGTCGAA GTACATAACGCTAAAACGAAGCCCCGAGAAGAGCAGTACAACAGTACTT ACAGAGTAGTTTCTGTTCTTACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGG AAGGAGTATAAATGTAAAGTCTCAAACAAGGCACTTGCGGCACCAATAG AGAAGACAATATCTAAGGCCAAAGGGCAGCCTAGAGAGCCACAAGTATA TACGCTGCCCCCAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAAGTGTCACTG ACCTGCCTTGTTAAGGGCTTCTATCCGAGTGATATTGCTGTTGAATGGGAA AGTAACGGACAGCCGGAGAACAAC TATAAACTACTCCACCCGTGTTGG ATAGTGACGGTAGCTTTTTTCTGTACTCCAAGTTGACGGTAGACAAAAGT CGGTGGCAGCAGGGGAACGTATTTTCTTGTTCTGT CATGCACGAAGCTCT TCACAATCACTATACGCAGAAGTCCCTCTCTCTCTCTCTCTGGAAGGGTG GTTCCGACAGCTGGCAGGAGGAGGTCATTAACTGTGTGGTAGAGAGCT GGTACGGGCTCAAATTGCAATTTGTGGTAAGAGTACTGGCGGTGGCGAGG AAGGGGGTGGGGAGGAGGGCGGAGGTAGGCAGCTCTACTCTGCTCTCGC CAACAAGTGTGTACGTCGGGTGTACTAAAAGATCACTTGCCCGCTTTT GT
171	ATGGAAACCGATACCCTGCTCTTGTTGGGTCCTCCTGCTTTGGGTCCCAGG TTCCACAGGCGACAAAACACATACATGCCCCGCCGTGTCGGGCGCCTGAA GCAGCAGGAGGCCCCAGTGTATTCCTTTTCCCTCCAAAGCCAAAAGATAC GTTGATGATATCTAGGACACCTGAGGTTACCTGCGTCGTAGTGGACGTATC CCACGAAGACCCAGAAGTCAAGTTTAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAG GTACACAATGCAAAGACAAAGCCGCGAGAGGAACAATATAATTCCACCTA

[0222]

	TAGAGTCGTGTCAGTCCTTACGGTCTTGCACCAGGACTGGCTCAATGGTA AGGAGTATAAGTGCAAAGTATCAAACAAAGCTCTCGCAGCGCCCATCGA AAAGACCATCAGCAAAGCTAAGGGCCAGCCAAGAGAGCCTCAAGTGTAC ACGTTGCCGCCTTCAAGGGACGAGCTCACTAAAAATCAGGTATCACTTAC GTGTCTTGTCAAAGGGTTTTATCCTTCCGACATCGCGGTTGAATGGGAGA GCAATGGACAGCCGGAGAATAATTATAAAACGACGCCGCCGGTCCTTGAC AGCGATGGTTCATTTTTCTTTACTCAAAGCTGACGGTTGATAAGTCTAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTTTCTGTAGTGTACTTCATGAGGCGCTCCA TTCTCATTACACTCAGAAGTCACTGAGCCTTTCACCCGGCAAAGGTGGAT CAGACTCCTGGCAAGAAGAGGTAATCAAACCTCTGTGGGAGGGAACTCGT TCGAGCCCAGATTGCAATCTGTGGGAAAAGCACAGGCGGAGGGGAAGA AGGGGGTGGCGAAGAAGGTGGGGGCAGGCAGCTCTATTAGCTCTTGCC AACAAATGCTGTCATGTAGGCTGCACAAAGCGATCACTGGCGAGATTCTG T
172	ATGGAAACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTTCTTCTCCTCTGGGTTCCCGG CTCAACCGGAGATAAACTCATACTTGCCACCCCTGCCCGGCTCCCGAGG CAGCAGGTGGACCCTCAGTATTTTTGTTCCCTCCGAAACCTAAAGATACA CTTATGATTAGCCGGACCCCTGAGGTAACGTGTGTGGTGGTTGACGTAAG TCATGAAGATCCAGAAGTAAAGTTTAACTGGTACGTAGACGGTGTGGAGG TACATAATGCGAAGACAAAACACGAGAGGAACAGTATAACTCTACCTAC CGCGTAGTAAGCGTACTTACTGTGCTCCACCAAGACTGGCTTAACGGGAA AGAGTATAAGTGTAAGTCAAGTAATAAAGCACTGGCCGCCCGGATCGAAA AAACAATCAGCAAGGCCAAAGGACAACCAAGGGAGCCTCAGGTCTATAC TCTTCCCCCGAGTAGGGATGAGCTTACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACAT GCCTTGTCAAGGGATTTTACCCGAGTGACATAGCCGTAGAATGGGAGTCA AACGGCCAACCTGAAAACAACCTATAAGACCACGCCTCCCGTACTCGACT CAGATGGAAGCTTTTTCTCTATAGCAAGCTGACCGTCGACAAAAGTAGG TGGCAACAGGGAAACGTCTTTAGTTGTTCCGTCATGCACGAAGCTTTGCA TAACCATTACACCCAGAAGAGTCTTTCCTTTCCCCTGGCAAGGGGGGCT CCGACTCCTGGCAAGAGGAAGTAATCAAACCTGTGTGGGCGCGAGCTTGT CCGCGCGCAAATAGCCATTTGCGGAAAAAGTACTGGAGGAGGAGAGGAA GGCGGCGGCGAGGAAGGTGGGGGCAGGCAGCTGTACAGTGCCTTGGCTA ACAAGTGCTGCCATGTCGGCTGTACGAAAAGGTCTCTTGCTCAATTCTGT
173	ATGGAAACTGATACTCTTCTCCTTTGGGTGCTCCTCCTCTGGGTTCCCGGG

[0223]

	TCCACAGGCGATAAGACACATACCTGTCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGC TGCAGGCGGCCCCAGCGTATTCCTGTTTCTCCGAAGCCGAAAGACACAC TTATGATTTCCCGGACGCCTGAGGTAACCTTGCCTCGTAGTAGATGTGTCTC ACGAAGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTACGTTGATGGTGTGGAAGT TCATAATGCGAAAATAAACCACGAGAGGAGCAATATAACTCAACTTATA GAGTTGTGAGCGTCTTGACGGTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA AGAGTACAAATGCAAAGTCTCAAATAAGGCGTTGGCGGCTCCCATAGAG AAAACATATCAGCAAAGCCAAGGGTCAACCTCGGGAGCCACAAGTGTATA CTCTTCCGCCTAGTCGCGACGAGCTCACAAAGAATCAGGTGAGTCTTACT TGTTTGGTTAAGGGTTTCTACCCCAAGTGACATTGCGGTGAGTGGGAAAG TAACGGACAGCCTGAAAACAATAAAACAACGCCTCCAGTACTCGATT CAGATGGTTCATTCTTTCTTTATTCCAAACTCACAGTCGACAAGAGTAGAT GGCAACAAGGGAACGTGTTTAGCTGTAGCGTACTCCATGAGGCACTCCA CTCTCACTATACCCAAAAGTCTCTCAGCTTGTCACCCGGAAGGCGGTT CTGACAGTTGGCAAGAGGAAGTGATTAAATTGTGTGGGCGGGAAGTGT GAGGGCTCAAATCGCGATTTGCGGCAAGTCCACTGGTGGCGGCGAGGAA GGAGGAGGTGAAGAAGGAGGAGGTAGGCAACTGTATTCAGCGTTGGCGA ATAAATGCTGCCATGTTGGATGTACTAAACGGAGCCTTGCTCAGTTCTGC
174	ATGGAACTGACACCTTGTTGCTTTGGGTATTGCTTCTGTGGGTTCGGG TAGCACGGGTGATAAAACGCATACTTGCCCTCCTTGCCCGGCACCTGAAG CTGCCGGAGGTCCTTCCGTGTTCTGTTCACCTAAGCCAAAAGACACA CTTATGATTTCTCGCACACCAGAAGTAACGTGCGTCGTAGTTGACGTCTC CCATGAAGACCCGGAGGTAAAATTTAATTGGTACGTCGACGGGGTAGAAG TTCATAACGCAAAGACTAAACCACGAGAAGAGCAATACAACCTCTACATAC AGAGTAGTAAGCGTTCTCACCGTTCTTCATCAAGATTGGCTCAACGGAAA GGAGTATAAGTGTAAGGTGTCCAATAAAGCGTTGGCCGCACCAATCGAAA AGACCATAAGCAAAGCCAAAGGCCAACCCCGCGAACCGCAGGTGTACAC ACTTCCCCCGTCCAGGGATGAATTGACAAAAAACCAAGTTTCCCTCACGT GTCTCGTCAAGGGATTCTACCCGAGTGATATCGCAGTTGAATGGGAAAGC AATGGTCAGCCCGAGAATAACTACAAGACTACTCCCCCTGTGTTGGACTC AGACGGCTCATTCTTCTCTACAGTAAGTTGACTGTGGACAAAAGTCGGT GGCAGCAAGGCAATGTCTTCAGTTGTAGTGTAATGCATGAAGCACTCCAC AATCATTACACCCAAAAATCCCTGAGCCTGTCCCCGGGCGGAGGTTCAGA TTCATGGCAGGAGGAAGTTATAAACTGTGCGGGCGCGAGTTGGTGAGG

[0224]

	GCGCAGATCGCAATCTGTGGAAAGAGTACGGGAGGTGGCGAAGAGGGTG GTGGAGAAGAGGGAGGAGGTCGACAACTGTATTCCGCGCTCGCGAACAA GTGTTGCCACGTTGGCTGCACCAAACGAAGCCTGGCTCGATTTTGC
175	ATGGAGACTGACACCCTTCTCCTCTGGGTCCTCTTGCTTTGGGTCCCTGG CTCTACTGGTGACAAGACACACACTTGTCCACCTTGCCCGGCTCCCGAGG CGGCAGGAGGACCAAGCGTTTTTCTGTTCCCTCCCAAACCAAAGGATAC GCTTATGATCTCTCGAACGCCGGAAGTTACTTGCGTAGTAGTTGATGTCTC CCATGAAGATCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTATGTAGATGGTGTGGAAG TTCATAACGCGAAAACCAAACCACGCGAAGAACAGTATAACAGTACTTAT CGGGTTGTTTCAGTACTCACGGTGCTCCATCAAGACTGGCTTAATGGAAA GGAGTATAAATGTAAGGTAAGTAACAAGGCATTGGCGGCTCCCATCGAGA AGACAATCTCCAAAGCAAAAGGGCAACCACGGGAGCCTCAGGTGTATAC GTTGCCGCCCAGCAGAGATGAACTTACTAAGAATCAGGTGAGTCTCACTT GTCTCGTCAAGGGCTTCTATCCCAGCGATATAGCCGTAGAATGGGAGAGT AACGGTCAGCCGGAGAACAACCTACAAAACAACCCCGCCTGTTTTGGACT CCGATGGGAGTTTTTTTTCTCTACAGCAAACTCACGGTAGACAAAAGCAGG TGGCAGCAGGGCAATGTTTTCAGTTGCTCTGTTCTCCACGAAGCCCTCCA CTCCCACTATACTCAGAAGTCTCTGAGTCTCTCACCAGGGGGAGGTAGCG ATAGCTGGCAGGAGGAAGTGATCAAGTTGTGCGGGCGCGAACTCGTGCG GGCACAATTGCTATATGCGGTAAAAGTACGGGAGGTGGAGAGGAGGGT GGAGGTGAAGAAGGCGGTGGTAGACAATTGTATAGTGCGCTCGCCAACA AGTGTGTCATGTCGGGTGTACGAAACGGTCCTTGGCGCGGTTTTTGC
176	ATGGAAACTGACACACTTCTTCTGTGGGTACTCTTGTTGTGGGTTCGGG CTCAACGGGTGACAAGACACATACTTGTCCACCATGTCCCGCCCCAGAAG CTGCGGGAGGACCATCAGTTTTTTTTGTTCCCCCGAAACCGAAGGATACC CTCATGATAAGTCGAACGCCCGAAGTCACTTGCGTGGTGGTTGATGTTAG CCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTCGAA GTTCATAATGCGAAAACAAAGCCTCGCGAGGAACAGTACAACCTCTACATA CAGGGTTGTGTCTGTTTTGACAGTCTTGACCAAGATTGGCTCAACGGGA AGGAATATAAGTGTAAGGTAAGCAATAAAGCACTGGCGGCCCCGATCGAA AAAACGATATCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGAGAGCCTCAGGTATATAC TCTGCCGCCAAGCCGGGATGAACTGACTAAAAACCAGGTCTCTTTGACTT GTCTTGTCAAGGGATTTTACCCAAGTGACATTGCGGTAGAGTGGGAAAGC AACGGTCAACCAGAAAACAATTACAAGACGACACCGCCGGTACTCGACT

[0225]

	CAGATGGATCCTTTTTCTGTATAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAAGGGAACGTATTTTCATGCAGCGTGATGCATGAGGCTCTTCA CAACCATTACACACAGAAAAGTCTGTTCATTGAGCCCTGGCGGCGGGAGC GATTCTTGGAAGAAGAAGTTATAAACTTTGCGGTTCGAGAGCTGGTTTCG GGCACAAATTGCTATCTGCGGAAAATCTACAGGAGGAGGCGAGGAGGGA GGGGGCGAAGAAGGCGGGGGGAGACAGTTGTACAGTGCCTCGCTAAC AAGTGTTGCCACGTCGGTTGCACAAAGAGATCCCTGGCTCAATTCTGT
177	ATGGAGACAGATACTCTCTTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTTGGGTTCTTG AAGTACCGGTGATAAACTCACACCTGTCCCCCGTGCCCGCACCAGAA GCGGCCGGTGGTCCCTCCGTTTTTCTCTTCCCTCCTAAACCTAAGGACAC ACTTATGATTAGCAGAACTCCAGAAGTTACGTGCGTAGTCGTTGACGTTA GTCATGAAGATCCTGAGGTTAAGTTCAACTGGTACGTAGACGGAGTAGAG GTCCACAACGCCAAGACGAAACCCCGAGAAGAGCAGTATAATTCTACCT ATCGAGTTGTTTCAGTATTGACGGTGCTTACCAAGATTGGCTGAATGGC AAAGAGTATAAGTGCAAGGTAAGCAACAAAGCACTCGCGGCTCCTATCG AGAAAACCTATTTCCAAAGCTAAGGGCCAGCCTCGCGAACCACAAGTCTAT ACCCTGCCACCGAGTCGGGACGAACTACCAAGAACCAAGTGTCTCTTA CTTGCTCGTTAAAGGTTTTTATCCAGCGACATAGCCGTCGAATGGGAG TCCAATGGCCAACCTGAGAACAACCTATAAACTACCCCTCCTGTACTTGA TAGCGACGGAAGTTTTTCTCTATTCAAACTCACAGTTGATAAGTCTCG ATGGCAACAGGGCAACGTCTTCTCTTGCAGTGTGTTGCATGAAGCTCTGC ACTCTCATTACACACAGAAGAGTTTGTCTCTCAGTCCAGGTGGCGGCTCA GATAGCTGGCAGGAAGAAGTAATCAAGTTGTGCGGCAGGGAACCTGGTAA GGGCACAGATAGCCATTTGTGGAAAATCTACGGGTGGCGGTGAGGAAGG CGGCGGAGAAGAAGGGGGAGGTCTGGCAGCTGTATAGTGCCTCGCAAAC AAGTGCTGCCATGTGCGGTGCACCAAGCGATCCCTTGCCAGTTTTGC
178	ATGGAACTGATACGCTCCTCCTTTGGGTTCTTCTCCTCTGGGTACCCGGA AGCACTGGTGACAAAACGCACACCTGTCCACCGTGTCTGCTCCAGAGG CGGCCGGGGGACCGTCCGTTTTCTTTTTCTCCCAAACCTAAGGATACC CTTATGATCTCTCGCACGCCCCGAGGTACCTGTGTTGTGGTTGACGTGTCC CATGAAGACCCGGAAGTAAATTTAATTGGTACGTGGACGGGGTCGAGGT TCATAACGCAAAGACCAAGCCACGAGAGGAGCAATATAATTCCACCTATC GCGTAGTCTCCGTCCTCACCGTGCTTACCAGGATTGGCTCAACGGGAAG GAATACAAATGTAAAGTCAGTAATAAGGCTTTGGCGGCCCCCGATTGAGAA

[0226]

	GACTATAAGTAAGGCTAAGGGACAGCCACGAGAACCGCAAGTTTATACAT TGCCCCCTCTAGGGATGAGTTGACTAAGAATCAGGTGTCACTCACTTGT CTGGTAAAAGGGTTCTACCCGTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCA ATGGGCAACCTGAAAATAATTATAAGACAACCCCTCCGGTGCTTGATAGC GACGGATCATTCTTTCTCTATTCCAAGCTTACTGTAGATAAGAGTCGATGG CAACAGGGGAACGTATTCAGTTGCTCTGTTCTCCATGAGGCCCTGCATAG TCACTACACCCAAAAAAGCCTTAGTTTGAGTCCCGGGAAAGGAGGCTCC GATTCTTGGAAGAAGAGGTAATAAAGCTGTGTGGACGAGAAGTTGTCC GAGCACAATTGCGATTTGTGGCAAATCTACAGGAGGGGGAGAAGGAGG CGGCGAAGGGGGAGGCGAGGGCAGGCAGGATTATTCCGCTCTGGCGAAC AAATGTTGCCATGTTGGATGCACGAAACGAAGCCTGGCTCAGTTTTGC
179	ATGGAAACCGACACCCTCCTCCTTTGGGTACTTCTTCTCTGGGTTCGGG TAGTACAGGAGATAAAACGCATACCTGCCCACCGTGTCTGCACCTGAGG CCGCTGGAGGACCTTCCGTCTTCTCTTTCCACCAAGCCGAAAGACACA CTCATGATTAGTAGAACTCCAGAGGTCACGTGTGTTGTGGTGGACGTCAG TCACGAGGACCCTGAGGTAAAGTTCAACTGGTACGTTGATGGCGTAGAAG TCCACAATGCAAAGACCAAACCGAGAGAGGAGCAATATAACAGTACATAT AGGGTTGTTAGCGTACTTACTGTTTTGCATCAAGACTGGTTGAATGGGAA GGAATATAAATGTAAAGTCTCCAACAAGGCTCTGGCTGCACCAATAGAAA AAACTATTTCTAAGGCAAAGGGTCAGCCTAGAGAGCCTCAAGTCTATACC TTGCCACCGTCAAGAGACGAGCTCACTAAAAATCAGGTGAGCCTGACCT GTCTTGTGAAGGGCTTTTACCCGTCAGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCA AACGGTCAGCCGGAGAATAACTACAAGACGACCCACCACTACTCGATA GCGATGGGTCTTTCTTTCTGTACTCCAAGCTCACCGTGGACAAATCACGC TGGCAACAGGGCAACGTCTTTAGTTGCAGCGTACTGCACGAGGCACTGC ACAGCCACTACACACAAAAGAGTCTTTCTCTGTCTCCCGGTGGTGGCTCC GATAGTTGGCAGGAAGAAGTCATAAAGCTTTGTGGAAGAGAGCTTGAC GAGCGCAGATTGCAATCTGCGGGAAGAGCACTGGAGGAGGTGAGGGAG GGGGTGAGGGCGGGGGCGAAGGACGCCAGGACTATTCAGCACTTGCAA ACAAATGCTGCCATGTAGGGTGTACGAAGCGCTCACTGGCCCGGTTTTGC
180	ATGGAGACCGACACTTTGCTGCTTTGGGTGTTGCTGCTGTGGGTCCCCGG TAGTACGGGAGATAAAACACATACCTGCCCCCATGCCAGCCCCCGAAG CTGCAGGGGGGCCCTCTGTTTTCTTTTCCACCCAAACCTAAAGATACT CTGATGATTAGTCGGACTCCGGAAGTGACTTGCGTCGTTGTCGACGTCTC

[0227]

	TCATGAGGATCCAGAAGTTAAGTTTAACTGGTATGTCGACGGGGTTGAGG TTCATAATGCAAAAACATAACCGAGAGAAGAACAGTACAACCTCTACTTAT AGGGTTGTCAGTGTACTGACCGTCCTGCACCAGGATTGGCTTAACGGTAA GGAGTATAAGTGTAAGGTGTCCAATAAAGCCCTTGCCGCACCCATCGAGA AAACCATCTCCAAGGCAAAAGGACAGCCAAGGGAACCGCAGGTATATAC ACTTCCGCCAAGCCGAGACGAACCTTACGAAGAACCAGGTGTCTCTCACG TGTCTCGTAAAAGGGTTTTATCCCAGCGATATCGCAGTTGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCAGAGAATAATTATAAGACAACCCCTCCCGTGCTGGATT CAGACGGGAGTTTTTTTCTTTACTCTAAGCTGACCGTAGACAAAAGTCGA TGGCAGCAAGGCAACGTCTTTTCTGCTCCGTTCTCCATGAAGCACTGCA TAGCCATTATACCCAGAAGTCACTGAGCCTCTCTCCAGGGGGCGGGTCCG ATTCATGGCAGGAAGAGGTAATCAAACCTCTGTGGACGCGAACTGGTTTCG GCGCAGATAGCGATTTGCGGCAAAAGCACAGGCGGTGGGGAAGGCGGTG GCGAGGGCGGTGGTGAAGGTCGACAAGATTATTCTGCTCTCGCTAACAA GTGTTGTCATGTAGGATGTACTAAAAGGAGTCTTGCGCAGTTCTGT
181	ATGGAGACGGACACTCTTCTCCTGTGGGTTCTCCTCTTGTGGGTTCCAGG ATCTACCGGCGATAAGACGCACACATGCCCCACCCTGTCCTGCGCCTGAAG CCGCGGGGGGACCCAGCGTTTTTCTCTTCCCGCCGAAACCGAAAGACAC ACTTATGATCAGCCGGACTCCCGAGGTTACCTGCGTGGTGGTAGATGTATC TCACGAGGATCCCGAGGTCAAATTCAACTGGTACGTTGATGGGGTTGAAG TTCATAATGCCAAAACGAAGCCAAGAGAAGAGCAGTATAACTCCACATAT AGAGTTGTTTTCCGTCTTGACTGTTCTTACCAAGATTGGCTGAATGGGAA GGAGTACAAATGTAAAGTTAGCAACAAGGCACTCGCCGCTCCCATTGAA AAAACCTATAAGCAAAGCTAAGGGCCAACCGCGCGAACCACAGGTCTACA CGTTGCCGCCCTCTAGGGACGAACTCACGAAGAATCAGGTTTCCCTTACC TGCCTCGTTAAAGGATTCTACCCCTCTGACATAGCGGTTGAATGGGAGAG CAACGGTCAGCCTGAGAACAACCTACAAAACGACGCCTCCGGTGTTGGAT TCCGACGGTAGTTTTTTTCTCTATAGTAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGG TGGCAGCAAGGGAATGTATTCTCCTGTTTCACTCCTGCATGAAGCCCTCCA CTCCCATTATACACAGAAATCTCTTTCTCTGAGTCCCGGTAAAGGTGGGA GTGACTCTTGGCAGGAAGAGGTAATTAAGTTGTGTGGAAGGGAGCTGGT AAGAGCACAGATTGCCATCTGTGGCAAATCCACGGGCGGCGAAGGTGAG GGGGGTGAGGGGGAAGGGGGGTCCAGACAACCTGTATTCTGCTCTGGCGA ATAAGTGTTGCCATGTAGGGTGCACTAAACGGTCCTTGGCGCAGTTCTGT

[0228]

182	ATGGAGACTGACACACTGCTCCTCTGGGTCCTTTTGCTCTGGGTTCCGGG GTCCACCGGTGATAAACTCATACGTGCCACCTTGCCCCGCACCGGAGG CTGCTGGAGGACCCTCTGTCTTCCTGTTCCCGCCGAAGCCTAAAGACACA TTGATGATCAGTCGAACACCGGAAGTCACCTGTGTAGTGGTTGATGTGAG CCATGAGGACCCTGAAGTAAAATTTAACTGGTATGTTGATGGCGTAGAAG TACACAACGCGAAGACTAAACCAAGGGAAGAGCAATACAACCTCTACCTA TAGGGTCGTTAGCGTACTGACTGTGCTTCACCAAGACTGGCTTAACGGGA AGGAGTACAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCCCTCGCCGCGCCTATCGA GAAAACCATTTCCAAAGCCAAGGGTCAACCAAGGGAGCCTCAGGTTTAC ACCCTGCCCCCTTCAAGGGATGAGTTGACAAAAAACCAGGTAAGTCTGA CGTGTCTCGTTAAGGGATTCTACCCGTCAGATATCGCGGTAGAGTGGGAG AGCAACGGTCAGCCAGAAAATAATTACAAAACAACACCTCCAGTTTTTG ACTCTGATGGGAGTTTTTTTCTTTATTCTAAGTTGACAGTGGATAAGTCAC GCTGGCAACAGGGGAACGTATTTAGCTGCTCAGTACTTCATGAAGCGTTG CATTCTCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCTTGAGTCCCGGAGGTGGCTC TGATTCTTGGCAGGAGGAGGTAATAAACTTTGTGGTAGAGAACTGGTTC GCGCTCAGATAGCTATTTGTGGAAAATCCACTGGCGGTGAAGGTGAAGGT GGAGAAGGAGAGGGGCGGAAGCCGGCAGTTGTACTCTGCCCTGGCTAATA AGTGCTGTCACGTGGGCTGCACTAAGCGGAGCTTGGCAAGATTTTGC
183	ATGGAAACCGACACGCTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGTTGTGGGTTCCAGG CTCAACTGGCGATAAACTCATACTGTCCACCTTGTCTGCGCCTGAGG CAGCTGGAGGGCCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAACCCAAAGACAC GCTCATGATTAGCCGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTTGTTGTGGACGTAA GCCACGAAGACCCCGAAGTTAAGTTTAATTGGTACGTCGACGGTGTTGAG GTTCATAACGCGAAGACTAAGCCGAGAGAGGAGCAATATAACAGCACCT ACCGCGTAGTCTCAGTTCTTACCGTGCTCCACCAGGACTGGCTTAACGGG AAGGAATACAAATGCAAAGTTTCCAACAAAGCCTTGGCAGCCCCAATAG AGAAGACAATATCTAAGGCGAAAGGCCAACCGCGGGAACCGCAAGTTTA TACCCTCCCACCGAGCAGGGATGAGCTGACAAAAAATCAGGTTTCCCTCA CTTGTCTGGTCAAGGGATTTTATCCTTCAGACATAGCCGTTGAATGGGAG AGTAATGGGCAGCCGGAGAATAATTACAAGACCACCCCCCGGTGTTGG ACAGCGACGGTTCCTTCTTTCTCTATTCTAACTTACCGTCGACAAATCAC GGTGGCAACAAGGAAATGTATTCTCATGCAGTGTATTGCACGAAGCTCTG CACTCTCATTACACCCAAAAATCCCTCTCTCTCAGCCCTGGCGGTGGATCT

[0229]

	GATTCTTGGCAGGAAGAGGTGATTAACTGTGTGGGCGAGAGCTTGTCC GAGCTCAGATCGCTATTTGTGGCAAGAGTACCGGAGGCGAGGGTGAGGG AGGCGAAGGCGAGGGCGGAAGCCGGCAACTCTATAGCGCACTCGCTAAT AAATGTTGTCATGTCGGCTGCACGAAGCGCTCACTGGCGCAGTTCTGC
184	ATGGAGACGGACACACTGCTCTTGTGGGTACTGCTCCTTTGGGTGCCAGG AAGTACAGGAGACAAAACGCATACCTGTCCTCCATGCCCGCTCCCGAG GCTGCCGGCGGACCAAGCGTATTTCTCTTCCCCCTAAACCTAAAGACAC ATTGATGATAAGTAGGACGCCTGAAGTAACGTGTGTTGTCGTTGATGTAA GCCATGAAGATCCTGAAGTAAAGTTTAATTGGTATGTTGATGGCGTAGAA GTACATAACGCTAAGACGAAGCCACGGGAAGAGCAGTATAACTCAACTTA CCGCGTTGTAAGCGTGCTTACCGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAATGGTA AGGAATATAAGTGCAAAGTAAGCAACAAAGCATTGGCCGCACCAATAGA GAAGACGATTAGTAAAGCAAAAGGCCAGCCCAGAGAGCCGCAGGTTTAT ACACTTCCACCAAGCAGAGATGAACTTACGAAGAACCAGGTGTCTCTGA CTTGTCTGGTCAAGGGTTTCTATCCTTCCGACATTGCAGTGGAGTGGGAA AGCAATGGGCAGCCCGAAAACAATTATAAGACGACACCTCCAGTGTTGG ACTCAGACGGTTCCTTTTTCTTGTATTCCAACTTACAGTGGATAAGTCAA GGTGGCAGCAAGGCAACGTATTTTCTTGTAGTGTTTTGCACGAAGCCCTG CATTCCCCTATACTCAAAAGAGCCTCAGTCTGTCCCCAGGAAAGGGAGG GAGTGACAGTTGGCAAGAGGAGGTAATAAAATTGTGTGGCAGAGAGCTT GTGCGCGCTCAGATCGCAATATGCGGGAAATCTACTGGGGGTGAGGGTGA GGGCGGCGAGGGAGAGGGGGGCGAGTCGCCAAGATTATCCGCCCTTGCG AATAAGTGTTGTCACGTCGGATGTACTAAGAGATCATTGGCTCAGTTTTGT

[0230] 在一些实施例中,表8中所示的任何核苷酸序列在其5'和/或3'末端进一步包含额外的核苷酸序列。在一些实施例中,表8所示的任何核苷酸序列在其5'末端还包含核苷酸序列ACGGGACCGATCCAGCCTCCGACTCTAGAGCCACC (SEQ ID NO: 185) 和/或表8所示的任何核苷酸序列在其3'末端还包含核苷酸序列TGATAAACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGAC (SEQ ID NO: 186)。

[0231] 药物组合物

[0232] 本公开提供了包含本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的药物组合物。本文所描述的药物组合物与合适的载体、赋形剂和提供改善的转移、递送、耐受性等的其他试剂一起配制。许多合适的制剂可以在所有药物化学家已知的处方集中可以找到: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括例如粉剂、糊剂、软膏剂、胶冻剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(诸如L1POFECTIN™, Life Technologies, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)、DNA缀合物、无水吸收贴剂、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。还参考Powell等人, "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0233] 向患者施用的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的剂量可以根据患者的年龄和体型、目标疾病、状况、施用途径等等而变化。优选的剂量典型地根据体重或体表面积来计算。根据病情的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。施用本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的有效剂量和时间表可以凭经验确定;例如,可以通过定期评估来监测患者的进展,并相应地调整剂量。此外,可以使用本领域众所周知的方法进行剂量的种间缩放(例如,Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)。

[0234] 多种递送系统是已知的并且可以用于施用本文所公开的药物组合物,例如,封装在脂质体、微粒、微囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞中(参见例如,Wu等人,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。组合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注,通过上皮或皮肤黏膜内膜吸收(例如,口腔黏膜、直肠和肠黏膜等),并且可以与其它生物学活性试剂一起施用。施用可以是全身性的或局部的。

[0235] 本文所描述的任何药物组合物可以使用标准针和注射器皮下或静脉内递送。此外,对于皮下递送,笔式递送装置在递送本文所描述的任何药物组合物方面具有应用。此类笔式递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔式递送装置通常使用含有药物组合物的可更换药筒。一旦药筒内的所有药物组合物已被施用并且药筒是空的,空的药筒就可以容易地被丢弃并用含药物组合物的新药筒替换。然后可以重复使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,不存在可更换药筒。相反,一次性笔式递送装置预先填充有保持在装置内的储存器中的药物组合物。一旦储存器中的药物组合物排空,整个装置就被丢弃。

[0236] 在某些情况下,药物组合物可以在控释系统中递送。在一个实施例中,可以使用泵(参见,Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一实施例中,可以使用聚合材料;参见,Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编辑),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在又一实施例中,控释系统可以放置在组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见,例如Goodson,1984,在Medical Applications of Controlled Release中,同上,第2卷,第115-138页)。Langer,1990,Science249:1527-1533的综述中讨论了其他控释系统。

[0237] 可注射的制剂可以包括用于静脉注射、皮下注射、皮内注射和肌内注射、滴注等的剂型。这些注射制剂可以通过公知的方法制备。例如,例如通过将本文所描述的融合蛋白溶解、悬浮或乳化在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备注射制剂。作为注射用水性介质,例如存在生理盐水、含葡萄糖和其他助剂的等渗溶液等,它们可以与合适的增溶剂(诸如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子型表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等)组合使用。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,它们可以与增溶剂(诸如苯甲酸苄酯、苯甲醇等)组合使用。由此制备的注射剂优选填充在适当的安瓿中。

[0238] 有利地,将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适合于适合活性成分的剂量的单位剂量的剂型。此类单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿)、栓剂等。单位剂量中每个剂型所含的上述融合蛋白的量通常为约5至约500mg;尤其是注射

剂形式,优选含有约5至约100mg上述融合蛋白,对于其他剂型优选含有约10至约250mg。

[0239] 治疗性用途

[0240] 单一疗法

[0241] 本公开提供了方法,包括向有此需要的受试者施用治疗组合物,该治疗组合物包含本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体。治疗组合物可以包含本文所公开的任何融合蛋白或组分肽、以及药学上可接受的载体或稀释剂。如本文所使用的,表述“有此需要的受试者”是指表现出松弛素-2相关病症或疾病的一种或多种症状或指征的人或非人动物,或者在其他方面将受益于松弛素-2活性的增加或减少的人或非人动物。本文所描述的融合蛋白或组分肽、以及编码它们的表达载体(以及包含其的治疗组合物)尤其对治疗其中RXFP1的激活或失活有益的任何疾病或病症是有用的。

[0242] 在某些实施例中,本公开提供了用于激活细胞表面上的RXFP1的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的本文所描述的融合蛋白或组分肽或核酸分子或编码它们的表达载体,从而激活细胞表面的RXFP1。细胞表面上RXFP1的激活可以引起细胞反应,包括但不限于提升cAMP水平、血管舒张、血管生成因子(包括VEGF)的表达、MMP的表达和胶原蛋白降解。在一些实施例中,细胞选自由以下项组成的组:内皮细胞、血管平滑肌细胞、其他血管细胞、心肌细胞、其他心肌细胞和成纤维细胞。

[0243] 本公开还提供了治疗各种松弛素-2相关疾病的方法。如本文所用,术语“松弛素-2相关疾病”是由松弛素-2蛋白产生或松弛素-2蛋白活性引起、或与松弛素-2蛋白产生或松弛素-2蛋白活性相关的疾病或病症。术语“松弛素-2相关疾病”包括将受益于松弛素-2蛋白活性的增加的疾病、病症或病征。松弛素-2相关疾病的非限制性实例包括,例如肾脏疾病,包括但不限于局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、糖尿病肾病、肝肾综合征;纤维化疾病,包括但不限于硬皮病、特发性肺纤维化、肾纤维化、心脏纤维化、NASH;心血管疾病,包括扩张型心肌病、舒张性心力衰竭、肺动脉高压、慢性心力衰竭、急性心力衰竭、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、高血压、先兆子痫。关于各种疾病或病症的体征和症状的进一步细节在本文中提供并且是本领域众所周知的。

[0244] 根据本文所描述的方法施用组合物可以导致患有松弛素-2相关疾病或病症的患者中松弛素-2相关疾病或病症的严重性、体征、症状或标志物的减轻。本文中的“降低”是指该水平在统计上显著降低。降低(绝对降低或受试者中提升的水平与正常水平之间的差异的降低)可以是例如至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或低于所用测定的检测水平。

[0245] 组合疗法和制剂

[0246] 本公开还提供了组合物和治疗制剂以及包括向有此需要的受试者施用此类组合的治疗方法,其包含本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体、以及一种或多种额外的治疗活性组分。

[0247] 示例性的额外的治疗剂包括可以用于治疗本文所描述的任何松弛素-2相关病症的任何治疗剂。可以与本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体组合或组合施用的示例性额外的治疗剂包括但不限于:血管紧张素II受体阻断剂,例如阿齐沙坦、坎地沙坦、依普沙坦、氯沙坦、ACE抑制剂,例如赖诺普利、贝那普利、卡托普利、依那普利、莫昔普利、培哚普利、喹那普利、曲多普利,钙通道阻滞剂,例如氨氯地平、氨氯地平

和苯那普利、氨氯平和缬沙坦、地尔硫卓、非洛地平、依拉地平、尼卡地平、尼莫地平、奈索地平、维拉帕米,或利尿剂,例如氯噻酮、氢氯噻嗪、美托拉宗、呋达帕胺、托塞米德、呋塞米、布美他奈德、阿米洛利、氨苯蝶啶、螺内酯、依普利酮,醛固酮拮抗剂,例如螺内酯、依普利酮,地高辛,例如拉诺辛, β 受体阻滞剂,例如卡维地洛、美托洛尔、比索洛尔。

[0248] 在一些实施例中,额外的治疗剂是有效治疗纤维化的药物,包括但不限于小分子药物和抗体。示例性抗纤维化药物包括但不限于:TGF- β 抑制剂,例如,小分子,如羟尼酮、地司特泰(distiértide),或抗体,如非苏木单抗(fresolimumab),PDGF或VEGF拮抗剂,例如,小分子,如伊马替尼、尼洛替尼;或靶向参与纤维化发病机理的细胞外因子的任何药物。用于纤维化的示例性药物的描述可见于例如Li等人,“Drugs and Targets in Fibrosis, Frontiers in Pharm.”8:Article 855(2007),通过引用并入本文。

[0249] 额外的治疗活性成分可以在施用本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体之前、同时或之后不久施用。

[0250] 本公开提供了药物组合物,其中本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体与如本文别处所描述的额外的治疗活性组分共同配制。

[0251] 施用方案

[0252] 在一些实施例中,可以在限定的时间过程中向受试者施用多剂量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体。根据本公开的该方面的方法包括向受试者顺序施用多剂量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体。如本文所使用的,“顺序施用”意指在不同时间点,例如,在由预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)隔开的不同天,向受试者施用各剂量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体。本公开提供了方法,其包括向患者顺序施用单一初始剂量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体,随后施用一个或多个第二剂量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体,并且任选地随后施用一个或多个三次剂量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体。

[0253] 术语“初始剂量”、“二次剂量”和“三次剂量”是指施用本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“二次剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;且“三次剂量”是在二次剂量之后施用的剂量。初始剂量、二次剂量和三次剂量均可含有相同量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体,但通常在施用频率方面可彼此不同。然而,在某些实施例中,初始、二次和/或三次剂量中包含的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的量在治疗过程中彼此不同(例如,视情况向上或向下调节)。在某些实施例中,在治疗开始时施用两个或更多个(例如,2、3、4或5个)剂量作为“负荷剂量”,随后是较不频繁地施用的后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0254] 在一个示例性实施例中,每个二次和/或三次剂量在紧接的前一剂量之后1至26(例如,1、1^{1/2}、2、2^{1/2}、3、3^{1/2}、4、4^{1/2}、5、5^{1/2}、6、6^{1/2}、7、7^{1/2}、8、8^{1/2}、9、9^{1/2}、10、10^{1/2}、11、11^{1/2}、12、12^{1/2}、13、13^{1/2}、14、14^{1/2}、15、15^{1/2}、16、16^{1/2}、17、17^{1/2}、18、18^{1/2}、19、19^{1/2}、20、20^{1/2}、21、21^{1/2}、22、22^{1/2}、23、23^{1/2}、24、24^{1/2}、25、25^{1/2}、26、26^{1/2},或更多)周施用。本文所用的短语“紧接的前一剂量”是指在多次施用的顺序中,在施用顺序中的正下一剂量之前(没

有插入剂量)施用于患者的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的剂量。

[0255] 根据本发明该方面的方法可以包括向患者施用任何数量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的二次和/或三次剂量。例如,在某些实施例中,仅向患者施用单一二次剂量。在其它实施例中,向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多个)二次剂量。同样,在某些实施例中,仅向患者施用单一三次剂量。在其它实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多个)三次剂量。

[0256] 在涉及多个二次剂量的实施方案中,每个二次剂量可以以与其它二次剂量相同的频率施用。例如,每个二次剂量可在紧接的前一剂量后1至2周施用于患者。类似地,在涉及多个三次剂量的实施方案中,每个三次剂量可以以与其它三次剂量相同的频率施用。例如,每个三次剂量可在紧接的前一剂量之后2至4周施用于患者。或者,对患者施用二次和/或三次剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。在治疗过程中,也可以由医生根据临床检查后个体患者的需要调整施用频率。

[0257] 在一个实施例中,本文所描述的一种或多种融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体以基于体重的剂量施用于受试者。“基于体重的剂量”(例如,以mg/kg计的剂量)是根据受试者的体重而变化的蛋白质或肽的剂量。

[0258] 在另一个实施例中,本文所述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体中的一种或多种以固定剂量施用受试者。“固定剂量”(例如,以mg为单位的剂量)是指对于所有受试者使用一个剂量的本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体,而不管任何具体的受试者相关因素,如体重。在一个具体的实施例中,本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的固定剂量基于预定的体重或年龄。

[0259] 一般而言,本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的合适剂量可以在约0.001至约200.0毫克/千克接受者体重的范围内,通常在约1至50mg/千克体重的范围内。例如,本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体可以以每个剂量约0.1mg/kg,约0.2mg/kg,约0.5mg/kg,约1mg/kg,约1.5mg/kg,约2mg/kg,约3mg/kg,约5mg/kg,约10mg/kg,约15mg/kg,约20mg/kg,约25mg/kg,约30mg/kg,约40mg/kg,约50mg/kg施用。所列举值中间的值和范围也旨在成为本公开的一部分。

[0260] 在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体中的一种或多种以约10mg至约2500mg的固定剂量施用。在一些实施例中,本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体以约10mg,约15mg,约20mg,约25mg,约30mg,约50mg,约75mg,约100mg,约125mg,约150mg,约175mg,约200mg,约225mg,约250mg,约275mg,约300mg,约325mg,约350mg,约375mg,约400mg,约425mg,约450mg,约475mg,约500mg,约525mg,约550mg,约575mg,约600mg,约625mg,约650mg,约675mg,约700mg,约725mg,约750mg,约775mg,约800mg,约825mg,约850mg,约875mg,约900mg,约925mg,约950mg,约975mg,约1000mg,约1500mg,约2000mg或约2500mg的固定剂量施用。所陈述值中间的值和范围也意图是本发明的部分。

[0261] 试剂盒

[0262] 本文所描述的任何组合物都可以包括在试剂盒中。在非限制性实例中,试剂盒包

含一种或多种本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体。

[0263] 试剂盒还可以包括用于在受试者中使用本文所述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的试剂或说明书。它还可以包括一种或多种缓冲剂。

[0264] 试剂盒的组分可以在水性介质中或以冻干形式包装。试剂盒的容器装置通常将包含组分可以放置于其中并且优选地是适当等分的至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其它容器装置。当试剂盒中存在多于一种组分时(标记试剂和标记可以包装在一起),试剂盒通常还包含第二、第三或其它附加容器,附加组分可单独置于其中。试剂盒还可以包括用于容纳无菌的、药学上可接受的缓冲剂和/或其它稀释剂的第二容器装置。然而,小瓶中可以包括组分的各种组合。本公开的试剂盒通常还包括用于容纳本文所描述的融合蛋白或组分肽、或核酸分子、或编码它们的表达载体的装置,以及在用于商业销售的紧密封闭中的任何其它试剂容器。

[0265] 当试剂盒的组分以一种和/或多种液体溶液提供时,液体溶液是水性溶液,特别优选无菌水溶液。然而,试剂盒的组分可作为干粉提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供时,粉末可通过添加合适的溶剂重构。设想溶剂也可以在另一个容器装置中提供。

[0266] 实例

[0267] 本公开的实例通过说明和解释的方式来提供,并且不旨在限制本公开的范围。实例1.用于松弛素-2融合蛋白类似物的肝素色谱法

[0268] 介绍

[0269] 肝素色谱是早期候选筛选中常用的一种方法,以便更好地了解分子在给患者给药时与脉管系统元素相互作用的倾向。肝素和硫酸肝素蛋白聚糖是存在于脉管系统和组织中的带负电荷的多糖,其中带正电荷的分子可以在生理pH值(即, $pI > 7.4$)下结合。此处,采用肝素色谱法筛选肝素结合减少的候选物/变体,这预示着良好的PK特性。表9中提供了用于肝素色谱法的材料。

[0270] 表9. 材料

物质	供应商	目录号
POROS™ 肝素 2.1x30mm 色谱柱	赛默飞世尔 (Thermo Fisher)	4333411

[0272] 方法

[0273] 流动相A(结合): 20mM Tris pH 7.4

[0274] 流动相B(洗脱): 20mM Tris pH 7.4+1M NaCl

[0275] 注入: 10μg

[0276] 检测: 220nm

[0277] 1. 分析前使用流动相A以0.5mL/min平衡肝素柱10分钟。

[0278] 2. 使用20mM Tris pH 7.4将样品稀释至1mg/mL,以最大限度地降低离子强度。

[0279] 3. 在安捷伦HPLC上运行肝素色谱法,使用下表10中所示的梯度:

[0280] 表10. HPLC梯度

时间 (min)	流量 (mL/min)	%A	%B
0	0.5	100	0
1	0.5	100	0
6	0.5	50	50

6.5	0.5	50	50
7	0.5	0	100
8	0.5	0	100
8.5	0.5	100	0
10	0.5	100	0

[0282] 4. 包括阳性对照 (无肝素结合, 人IgG库) 和阴性对照 (SE301或AT1R)。

[0283] 5. 分析样品的保留时间并报告与阳性对照 (即, RT样品/RT阳性对照) 相比的相对保留时间。

[0284] 6. 使用以下计算方法计算洗脱所需的NaCl的大致浓度:

[0285] $[\text{NaCl}] = (\text{RT样品} - 1) * 100$

[0286] 结果示出在表11中。

[0287] 表11. 样品的保留时间、相对保留时间和NaCl浓度

[0288]

样品	RT	RRT	[NaCl]
阳性对照	1.5	N/A	50
阴性对照	3.5	2.3	250
样品	2.0	1.3	100

[0289] 结果

[0290] 表12显示了多种松弛素-2类似物融合蛋白的肝素色谱法结果。

[0291] 表12. 肝素色谱法

[0292]

		肝素色谱法	
样品	理论 pI	RT	洗脱时的~[NaCl] (mM)
IgG	N/A	2.0	20
先前的融合蛋白	8.5 (9.4*)	4.6	278
SEQ ID NO: 53	8.2	3.9	208
SEQ ID NO: 55	7.9	3.3	152
SEQ ID NO: 56	7.9	3.4	163
SEQ ID NO: 58	7.6	2.7	91
SEQ ID NO: 59	7.6	2.8	99
SEQ ID NO: 61	7.2	2.4	62
SEQ ID NO: 62	7.2	2.5	70
SEQ ID NO: 63	6.8	2.2	39
SEQ ID NO: 64	6.8	2.2	43
SEQ ID NO: 191	8.4	3.6	183
SEQ ID NO: 192	8.3	3.2	140

[0293] *使用成像毛细管等电聚焦实验确定。

[0294] IgG来自杰克逊免疫研究公司 (目录号#009-000-003)。“先前的融合蛋白”是LALA IgG-Re1B-接头-Re1A融合蛋白, 理论pI为8.5, 但实验确定的pI为9.4。其接头蛋白仅包含一

个酸性氨基酸。SEQ ID NO:53、56、58、59和61至64具有包含至少两个酸性氨基酸以及LALAIgG (SEQ ID NO:50或201)的接头蛋白。最后两种融合蛋白的接头蛋白仅包含一个酸性氨基酸,并且具有更高的理论pI。如上表12所示,通过肝素色谱法发现较低的pI和较低的非特异性结合之间存在相关性。

[0295] 实例2.通过亲和捕获自相互作用纳米粒子光谱 (AC-SINS) 测量的低pI松弛素-2融合蛋白类似物的自缔合倾向于减少

[0296] 介绍

[0297] 在评估开发候选者的生物物理特性时,了解分子的自缔合倾向至关重要。有多种方法可以评估分子的自缔合倾向,将分子浓缩至高浓度并通过SEC (%单体) 进行评估或测量浊度变化 (OD 340nm),使用DLS计算第二维里系数 (B_{22}) 或自相互作用系数 (k_d),或使用AC-SINS ($\Delta\lambda_{\text{最大}}$)。所有这三种方法都提供了有用的信息,但使用不同数量的材料来执行评估。AC-SINS已成为一种高通量方法,用于使用最少的材料评估自缔合,但仍然通过在金纳米粒子上使用亲和捕获来提供局部高浓度。简而言之,金纳米颗粒预先涂有抗人抗体 (Fc、Fab和H+L),当与稀释溶液中的目标抗体一起温育时,可捕获并浓缩溶液中的目标抗体。当感兴趣的固定分子相互作用时,金纳米颗粒之间的颗粒间距离减小,导致等离子激元波长增加(即,红移),可以使用UV-VIS谱进行量化。表13中提供了用于光谱的材料。

[0298] 表13.材料

物质	供应商	目录号
1M的乙酸钠pH 4.3	分子尺寸	MD2-019-PH
1x DPBS	Gibco	14190-136
帕尼单抗 (低缔合控制)	我的生物源	MBS156169
易普利姆玛 (医学缔合控制)	我的生物源	MBS156153
加尼单抗 (高缔合控制)	我的生物源	MBS156142
20nm的金纳米粒子	Ted Pella	15705
PEG甲醚硫醇 (2kDa)	Sigma	729140
山羊抗人IgG、Fc γ	杰克逊免疫研究公司	109-005-098
山羊非特异性mAb	杰克逊免疫研究公司	005-000-003
Zeba脱盐柱40K 5mL	赛默飞世尔	87770
Zeba脱盐柱40K 2mL	赛默飞世尔	87768
Zeba脱盐柱40K 0.5mL	赛默飞世尔	87766
Costar 384孔聚苯乙烯板	飞世尔科学公司	12-565-506
96孔聚丙烯板	格雷尼尔生物一号	652230P

[0300] 方法

[0301] 制备缓冲溶液

[0302] 为了制备20mM的乙酸钠pH 4.3,将2mL 1M乙酸钠pH 4.3储备液用MilliQ水稀释至100mL。pH测得为 4.3 ± 0.1 ,并将溶液无菌过滤。该溶液在室温下保持稳定1个月。

[0303] 向1g PEG甲基醚硫醇中加入10mL MilliQ水。将其短暂涡旋以悬浮固体,制成50mM的溶液。为了制备用于最终稀释的10 μ M的溶液,遵循以下稀释方案:

[0304] a.将50mM的原液稀释至1mM (20 μ L 50mM原液+980 μ L MilliQ水)

- [0305] b. 将1mM逐步稀释至100 μ M(10 μ L 1mM原液+90 μ L MilliQ水)
- [0306] c. 将100 μ M逐步稀释至10 μ M(100 μ L 100 μ M原液+900 μ L MilliQ水)
- [0307] d. 可以根据要分析的样品数量调整体积
- [0308] e. 剩余的50mM的原液应等分并保存在-20 $^{\circ}$ C直至需要
- [0309] 制备金纳米颗粒溶液
- [0310] 将山羊抗人Fc IgG抗体(捕获)和山羊IgG抗体(非捕获)缓冲液更换为20mM的乙酸钠,pH 4.3。更换缓冲液后,两种抗体的浓度均标准化为0.4mg/mL。
- [0311] 捕获(抗Fc):非捕获(山羊IgG)溶液的体积比为4:1的混合物被制备成80%捕获能力的涂层溶液,用于温育金纳米颗粒(AuNP)。
- [0312] 制备体积比为9:1的AuNP:涂层溶液。将溶液在室温下在黑暗中温育过夜。
- [0313] 温育后,从经稀释的10 μ M的原液中添加硫醇化PEG至0.1 μ M的最终浓度,以封闭AuNP上的空位点(即,5mL的AuNP溶液,添加50 μ L 10 μ M原液),并在黑暗在RT下温育一小时。
- [0314] 制备AuNP溶液
- [0315] 将2mL包被的AuNP溶液以20,000x g离心15分钟以沉淀AuNP,并使用1mL的移液器小心地除去1800 μ L上清液。使用200 μ L移液器轻轻地重悬沉淀的AuNP,以生成10x浓缩的包被AuNP储备液。
- [0316] 制备目标抗体溶液(任一方法均遵循此)
- [0317] 对于分析的每个样品,将10 μ L的AuNP浓缩物与100 μ L的抗体测试溶液(标准化为0.05mg/mL)在96孔聚丙烯板中室温避光温育2小时。使用浓缩至100 μ L PBS的10 μ L 10x AuNP制备两种空白溶液,用于空白测定并确定添加测试抗体后的波长偏移。加尼单抗作为阳性对照(高缔合,红移),且帕尼单抗作为阴性对照(无缔合,无UV偏移)。每个样品均制备一式两份以供分析。
- [0318] 温育2小时后,将100 μ L所得溶液转移至UV透明聚苯乙烯板(384孔格式)。转移两个空白溶液以正确评估波长偏移,然后添加重复的标准品和样品进行分析。然后将板以1000x g离心1分钟,以使孔中的溶液水平。
- [0319] 以2nm为步长收集510至570nm的吸光度数据,以确定每个样品相对于单独的AuNP的波长偏移。
- [0320] 结果
- [0321] 来自ASCINS的结果示出在下表14中。
- [0322] 表14. pI变体降低了自缔合倾向

[0323]

样品	等电点(计算的)	$\Delta\lambda_{\text{最大}}$
先前的融合蛋白(对照)	8.5	15.2
先前的融合蛋白(LALA)	8.5	15.9
SEQ ID NO:53	8.2	7.5
SEQ ID NO:54	7.9	1.2
SEQ ID NO:55	7.9	7.0
SEQ ID NO:56	7.9	6.7
SEQ ID NO:58	7.6	1.8

SEQ ID NO:59	7.6	1.9
SEQ ID NO:61	7.2	-0.6
SEQ ID NO:62	7.2	-0.4
SEQ ID NO:63	6.8	0.4
SEQ ID NO:64	6.8	0.4
SEQ ID NO:191	8.4	10.1
SEQ ID NO:192	8.3	6.1

[0324] 如上表14所示,具有低pI的融合蛋白也具有表现出低自聚集的倾向。

[0325] 实例3. 松弛素-2融合蛋白类似物在RXFP1转染细胞中诱导cAMP反应

[0326] 方法

[0327] 将HEK293细胞接种到96孔组织培养板中,然后与人RXFP1和pGloSensor-22F质粒瞬时共转染。转染的细胞被松弛素-2或其融合蛋白类似物刺激,诱导Gs介导的cAMP信号传导。cAMP使用GloSensor生物传感器的活性进行测定,该生物传感器是一种与cAMP结合域融合的突变荧光素酶,在其底物荧光素存在的情况下产生光。相对发光单位(RLU)的读数用于代表cAMP响应。

[0328] 试剂

[0329] ■96孔组织培养处理板。白色,底部透明。(Corning#3610)

[0330] ■HEK293细胞(ATCC CRL-1573)

[0331] ■聚-D-赖氨酸(Gibco A3890401)

[0332] ■DPBS(无钙、无镁;Gibco 14190250)

[0333] ■DMEM(高葡萄糖,L-谷氨酰胺和丙酮酸钠;Gibco 11995065)

[0334] ■TrypLE Express(Gibco 12605010)

[0335] ■FBS(HyClone™,澳大利亚原产地;Cytiva SH30084)

[0336] ■青霉素-链霉素(Gibco 15140122)

[0337] ■不依赖CO₂的培养基(Gibco 18045088)

[0338] ■Opti-MEM™I低血清培养基(Gibco 31985062)

[0339] ■pGloSensor™-22F cAMP质粒(Promega目录#E2301)

[0340] ■D-荧光素、钾盐(GoldBio LUCK-1G)

[0341] ■FuGENE HD转染试剂(Promega#E2311)

[0342] ■储液罐(Corning/Axygen RES-V-25-SI)

[0343] ■松弛素-2(R&D Biosystems 6586-RN-025)

[0344] ■含有RXFP1的质粒(pcDNA5/FRT/TO-人RXFP1,全长)

[0345] ■毛喉素(Sigma F6886)

[0346] ■能够读取发光的读板器(CLARIOstar Plus)

[0347] 试剂制备

[0348] D-荧光素,钾盐:

[0349] D-荧光素在10mM HEPES(pH 7.5)中以25mg/mL重构(78.5mM;MW=318.4)。将其等分到无菌微量离心管中约200-500μL的一次性等分试样中,并储存在-80℃下。

[0350] 松弛素-2肽:

[0351] 将松弛素-2肽或松弛素-2融合蛋白类似物在无菌DPBS ($MW=5,986\text{Da}$, $\epsilon=12,865\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 中以 0.1mg/mL 的浓度重建,并在 A_{280} 下测量以确定最终浓度。等分试样储存在 -20°C 下。

[0352] 毛喉素:

[0353] 毛喉素在100% DMSO中以 5mM 重构(2.05mg/mL , $MW=410.5$)。等分试样储存在 -20°C 下。

[0354] cAMP测定介质:

[0355] 使用珠浴将不依赖 CO_2 的培养基预热至 37°C 。将单份D-荧光素解冻并以5%终浓度添加(例如, 4.75mL cAMP测定介质+ $250\mu\text{L}$ 的D-荧光素原液;给出 1.25mg/mL 或 3.93mM 的最终D-荧光素)。当天使用或丢弃。

[0356] 细胞培养和维护

[0357] HEK293细胞(ATCC CRL-1573)在DMEM+10% FBS、1% (1X或 10U/mL) Pen-Strep中于 37°C 、5% CO_2 的加湿 CO_2 培养箱中培养,直至80-100%汇合。细胞通常按1:6分割3天,并保存在无菌T-75组织培养瓶中。

[0358] cAMP信号转导检测方案

[0359] 该方案改编自Promega的GloSensor cAMP测定。

[0360] 使用MARS数据分析软件将原始数据导出到Excel,该软件在CLARIOstar读板机上运行后打开。这些值以RLU或相对发光单位测量。

[0361] 如表15所示,所有低pI松弛素-2融合蛋白类似物都能够在RXFP1转染的细胞中诱导cAMP反应。

[0362] 表15. RXFP1转染的HEK293细胞中的cAMP反应

激动剂	pEC_{50}	EC_{50} (nM)
松弛素	10.38	0.042
先前的融合蛋白(对照)	9.51	0.31
先前的融合蛋白(LALA)	9.49	0.33
SEQ ID NO:53	8.66	2.17
SEQ ID NO:54	8.10	7.87
SEQ ID NO:55	8.62	2.41
SEQ ID NO:56	8.72	1.90
SEQ ID NO:58	7.83	14.7
SEQ ID NO:59	7.75	17.7
SEQ ID NO:61	7.25	56.7
SEQ ID NO:62	7.18	65.8
SEQ ID NO:63	6.76	173.3
SEQ ID NO:64	7.02	96.2
SEQ ID NO:191	9.37	0.42
SEQ ID NO:192	8.84	1.46

[0364] 实例4. 松弛素-2融合蛋白类似物的体外特性

[0365] 方法

[0366] 肝素色谱法:

[0367] 进行肝素层析是为了了解松弛素-2融合蛋白类似物在向患者施用与脉管系统元件相互作用和/或快速分布到组织中的倾向。发现与肝素结合较弱的类似物可能预示着良好的药代动力学特性。简而言之,在分析前使用流动相A (20mM Tris pH 7.4) 以0.5mL/min平衡肝素柱10分钟。每个样品使用10 μ g肝素色谱法,在安捷伦HPLC上使用280nm检测,使用下表16中所示的梯度(流动相B:20mM Tris pH 7.4、1M NaCl):

[0368] 表16.HPLC梯度

时间 (min)	流量 (mL/min)	%A	%B
0	0.5	100	0
6	0.5	50	50
7	0.5	0	100
8	0.5	0	100
8.5	0.5	100	0
10	0.5	100	0

[0370] 包括阳性对照(无肝素结合,派姆单抗)和阴性对照(轻度肝素结合,阿达木单抗),并分析样品与阳性对照(即,RT样品/RT阳性对照)相比的保留时间和相对保留时间。洗脱所需的NaCl的近似浓度通过以下计算得到:

[0371] $[NaCl] = (RT_{\text{样品}}) * 100$

[0372] 结果示出在表17中:

[0373] 表17.样品的保留时间和NaCl浓度

样品	RT	[NaCl]
阳性对照	1.5	150
阴性对照	3.5	350
样品	2.0	200

[0375] 毛细管等电聚焦(cIEF)

[0376] 成像毛细管等电聚焦(cIEF)用于利用两性电解质溶液中的电泳迁移率来分离带不同电荷的分子(即,松弛素-2融合蛋白类似物),以确定其等电点(pI)。将分子加载到毛细管中,并通过允许分子沿着电场迁移直到分子达到与其pI相对应的pH值来根据其pI进行分离。在整个分离过程中测量整个毛细管的UV吸收,从而可以进行实时观察和最终定量。

[0377] 杆状病毒颗粒(BVP)ELISA

[0378] 采用BVP ELISA来了解松弛素-2融合蛋白类似物发生非特异性或非靶标相互作用的倾向。BVP是没有病毒基因组的空病毒衣壳,但在生产过程中,从细胞膜上出芽,使它们能够带走细胞膜的成分。因此,BVP具有高度多样化的细胞表面,存在许多部分,模拟感兴趣的分子(即,松弛素-2融合蛋白类似物)在体内可能遇到的情况。简而言之,通过向每个孔中添加25 μ L的BVP溶液,将BVP包被在平板上。BVP溶液是通过稀释BVP原液(Medna Scientific; 目录号E3001)至1x10⁶PFU/mL,使用0.1M碳酸盐缓冲液,pH 9.6。5 $^{\circ}$ C温育过夜后,从孔中吸出BVP溶液,并用PBST洗涤孔三次。用100 μ L/孔的1x BSA的PBS封闭缓冲液(Cepharm Life Sciences; 目录号10615)。将板在板摇床上于25 $^{\circ}$ C温育1小时。将封闭液从孔中吸干并用PBST洗涤孔三次。样品(即,松弛素-2融合蛋白类似物)一式两份制备,覆盖3 μ M至0.1nM的稀

释范围,并添加到板中。将板在25°C温育1小时,之后将孔吸干并用PBST洗涤三次。25 μ L/孔 1:10,000稀释的检测单克隆抗体(过氧化物酶亲和纯山羊抗人IgG,Fc γ 片段特异性;杰克逊免疫研究公司;目录号50-194-1564),并将板在25°C温育1小时,之后将孔吸干并用PBST洗涤三次。随后添加了1-StepTMUltra TMB-ELISA底物溶液(Life Technologies;目录号34029)。约2分钟后,加入25 μ L 2N HCl以猝灭反应,并使用读板器在450nm处分析板,并在570nm处校正。

[0379] 效力测定

[0380] 基本上如实施例3中所述进行瞬时hRXFP1测定。

[0381] 亲和捕获自相互作用纳米粒子光谱(AC-SINS)

[0382] 进行AC-SINS是为了了解分子(即,松弛素-2融合蛋白类似物)自缔合的倾向。所执行的方法类似于实例2中描述的方法。AuNP溶液的制备如下:将1.5mL包被的AuNP溶液以20,000xg离心5分钟以沉淀AuNP,并使用1mL移液器小心取出1,350 μ L。使用200 μ L移液器轻轻地重悬沉淀的AuNP,以生成10x浓缩的包被AuNP储备液。对于每个分析的样品,将5 μ L的AuNP浓缩物与45 μ L的抗体测试溶液(标准化为0.05mg/mL)在384孔聚丙烯板中室温避光温育2小时。温育2小时后,以1nm为步长从450nm到650nm收集吸光度数据,以确定每个样品相对于单独的AuNP的波长偏移。

[0383] 纳米级差示扫描荧光测定法(NanoDSF)

[0384] 使用NanoTemper Prometheus Panta进行NanoDSF,以研究松弛素-2蛋白融合类似物的构象稳定性。构象稳定性是通过对含有感兴趣分子的溶液施加热斜坡,测量本征荧光,后向散射,并使用动态光散射(DLS)提供各种热稳定性参数来测量的。

[0385] 结果

[0386] 结果示出在下表18中:

[0387] 表18. 松弛素-2融合蛋白类似物的体外特性

[0388]

样品	肝素结合		cIEF	BVP ELISA	效力测 定	AC- SINS	NanoDSF	
	RT	[NaCl] (mM)	等 电 点 (pI)	标 准 化 分 数	EC50 (nM)	$\Delta\lambda$ 最 大	T _{起始} (°C)	T _{m1} (°C)
松弛素-2	ND	ND	9.4	N/A	0.1	N/A	N/A	N/A
先 前 融 合 (SEQ ID NO: 224)	ND	ND	9.0	28	0.3	7	61.4	68.9
SEQ ID NO: 204	3.88	330	8.9	2	2.5	8	60.5	70.4
SEQ ID NO: 205	NT	NT	ND	ND	12.3	1	63.3	70.7
SEQ ID NO: 206	3.32	280	8.5	1	2.9	7	62.8	70.6
SEQ ID NO: 57	3.43	290	8.5	1	2.5	7	61.6	70.6
SEQ ID NO: 207	2.71	230	7.9	1	16.0	2	62.9	70.9
SEQ ID NO: 60	2.79	240	7.9	1	15.8	2	63.0	71.0
SEQ ID NO: 208	2.42	210	7.5	1	60.3	0	63.9	71.1
SEQ ID NO: 209	2.5	210	7.1	1	62.8	0	63.6	71.2
SEQ ID NO: 210	2.19	190	7.1	1	140.0	0	62.4	71.0
SEQ ID NO: 211	2.23	190	ND	1	101.2	0	62.8	70.8
SEQ ID NO: 212	3.63	310	ND	1	0.5	10	62.9	70.8
SEQ ID NO: 213	3.2	270	ND	1	1.8	6	63.0	71.2
SEQ ID NO:	2.7	230	8.0	1	4.2	5	63.0	69.9

[0389]

66								
SEQ ID NO: 68	3	250	8.0	1	3.3	11	61.9	69.3
SEQ ID NO: 70	2.5	210	7.5	1	8.0	7	61.9	69.7
SEQ ID NO: 72	3.1	260	8.0	1	5.8	4	62.6	69.6
SEQ ID NO: 74	2.6	220	7.4	1	10.2	3	62.3	69.9
SEQ ID NO: 76	3	250	7.4	ND	ND	ND	ND	ND
SEQ ID NO: 78	2.3	200	7.1	1	23.4	4	60.9	69.9
SEQ ID NO: 79	2.3	200	7.5	1	117.0	0	61.9	70.0
SEQ ID NO: 80	2.6	220	7.4	1	162.0	0	62.6	69.8
SEQ ID NO: 81	2	170	7.1	1	426.0	0	62.8	70.2
SEQ ID NO: 82	2.6	220	7.5	1	18.9	4	62.3	70.1
SEQ ID NO: 83	2.8	240	7.5	ND	9.3	7	60.9	69.2
SEQ ID NO: 84	2.3	200	7.1	1	41.9	5	61.4	69.9
SEQ ID NO: 85	2.1	180	7.2	1	54.4	0	62.8	70.2

[0390] ***

[0391] 本发明不限于本文所述的具体实施例的范围。实际上,除了所描述的那些之外,根据前面的描述和附图,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0392] 本文引用的所有参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)通过引用以其全文并出于所有目的并入本文,其程度如同每个单独的参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)被具体地和单独地指出通过引用以其全文并入用于所有目的。

[0393] 其他实施例在以下权利要求范围内。