



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101896202 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200880120908. 9

(22) 申请日 2008. 12. 12

(30) 优先权数据

11/957, 015 2007. 12. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/086622 2008. 12. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/079382 EN 2009. 06. 25

(71) 申请人 洛克菲勒大学

地址 美国纽约州

(72) 发明人 J·拉韦施 F·尼默雅恩 金子佳贤

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 15 页 序列表 2 页

附图 7 页

(54) 发明名称

具有增强的抗炎活性和降低的细胞毒性的多肽以及相关方法

(57) 摘要

本发明提供了包含至少一个 IgG Fc 区的多肽,其中所述至少一个 IgG Fc 区被至少一个半乳糖部分糖基化,该半乳糖部分通过 α 2,6 键连接到相应的末端唾液酸部分上,且其中所述多肽与未纯化的抗体相比具有较高的抗炎活性。

1. 一种包含至少一个 IgG Fc 区的分离的多肽,所述多肽与未纯化的抗体制剂相比具有改变的性质,其中所述分离的多肽的唾液酸化比未纯化的抗体制剂的唾液酸化高。

2. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,其中所述至少一个 IgG Fc 区被至少一个半乳糖部分糖基化,该半乳糖部分通过 α 2,6 键连接到相应的末端唾液酸部分上,且其中所述多肽与未纯化的抗体制剂相比具有较高的抗炎活性。

3. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,其中所述至少一个 IgG Fc 区被至少一个半乳糖部分糖基化,该半乳糖部分通过 α 2,6 键连接到相应的末端唾液酸部分上,且其中与未纯化的抗体制剂相比,所述多肽与选自 Fc γ RIIA、Fc γ RIIC 和 Fc γ RIIEA 的 Fc 激活受体的结合降低。

4. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,包含人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区,所述多肽与未纯化的抗体相比具有较高含量的所述通过 α 2,6 键连接到相应的末端唾液酸部分上的至少一个半乳糖部分。

5. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,来自天然存在的抗体源或重组抗体源。

6. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,其中所述未修饰的抗体包含 IVIG。

7. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,其从重组源产生且缺少 Fab 区,其中所述至少一个 IgG Fc 区被两个半乳糖部分糖基化。

8. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,由包含 SEQ ID NO :1 的核酸序列编码。

9. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,源自具有在蛋白质的多糖链中至少一种半乳糖部分和相应的末端唾液酸之间产生 α 2,6 键的增强的活性的细胞系。

10. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,通过用 α 2-6 唾液酸转移酶处理进行修饰。

11. 一种调节包含 Fc 区的多肽的性质的方法,包括改变 Fc 区的多糖链的唾液酸化。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述性质包括比未纯化的抗体更高的抗炎活性。

13. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述改变唾液酸化的步骤包括:

提供包含至少一个 Fc 区的多肽的未纯化源,所述包含至少一个 Fc 区的多肽的未纯化源包括:个包含具有多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽,所述多糖链包含通过 α 2,6 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸,和包含缺少多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽,所述多糖链包含通过 α 2,6 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸;和

提高所述包含具有多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽与所述包含缺少多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽的比,所述多糖链包含通过 α 2,6 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸。

14. 如权利要求 11 所述的方法,其中通过在表达系统中表达包含核酸序列的载体来提供所述包含至少一个 Fc 区的多肽的未纯化源,其中所述核酸序列被翻译成 IgG 抗体。

15. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述提高包含具有多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽与包含缺少多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽的比的步骤是通过去除包含缺少多糖链的至少一个 Fc 区的多肽实现的,所述多糖链包含通过 α 2,6 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述去除是通过选自 HPLC、凝集素亲和色谱、高 pH 阴离子交换色谱及其任意组合的方法实现的。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述凝集素亲和色谱是使用对半乳糖部分和末端

唾液酸之间的 $\alpha 2,6$ 键的亲合力比对 $\alpha -2,3$ 键的亲合力低的凝集素进行的。

18. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述提高包含具有多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽与包含缺少多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽的比的步骤是通过富集包含具有多糖链的至少一个 Fc 区的多肽的所述未纯化源实现的,所述多糖链包含通过 $\alpha 2,6$ 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述富集是通过选自 HPLC、凝集素亲和色谱、高 pH 阴离子交换色谱及其任意组合的方法实现的。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述凝集素亲和色谱是使用对半乳糖部分和末端唾液酸之间的 $\alpha 2,6$ 键的亲合力比对 $\alpha -2,3$ 键的亲合力高的凝集素进行的。

21. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述富集是通过使用酶进行化学反应实现的,所述酶在连接到包含至少一个 Fc 区的多肽上的糖和末端唾液酸之间建立 $\alpha 2,6$ 键。

22. 一种治疗炎性疾病的方法,所述炎性疾病选自关节炎、血小板减少症和肾炎,该方法包括向患者施用治疗有效剂量的权利要求 1 所述的多肽。

23. 一种治疗炎性疾病的方法,包括向需要治疗的受试者施用包含多个分离的多肽的治疗组合物,所述多个分离的多肽各包含至少一个 IgG Fc 区,其中

各个 Fc 区的第一部分包含具有通过 2,6 键连接到相应的末端唾液酸上的半乳糖部分的相应糖链;

所述治疗组合物的剂量小于包含多个分离的多肽的第二组合物的剂量,该多个分离的多肽各包含至少一个 IgG Fc 区,具有包含相应糖链的相应 Fc 区的第二部分,所述糖链具有通过 2,6 键连接到相应的末端唾液酸上的半乳糖部分;和或者

第一部分比第二部分大,从而所述治疗组合物的剂量和所述第二组合物的剂量抑制炎症的程度基本相同,或者

第一部分比第二部分大,从而所述治疗组合物抑制炎症的程度比相同剂量的所述第二组合物高。

24. 一种包含含有 Fc 区的糖蛋白的组合物,其中所述组合物配制成包含足以在哺乳动物中获得免疫抑制活性的量的唾液酸化糖蛋白。

25. 如权利要求 24 所述的组合物,其中所述组合物包含的唾液酸化糖蛋白的量为约 5%或更多。

26. 如权利要求 24 所述的组合物,其中所述组合物包含的唾液酸化糖蛋白的量为约 10%或更多。

27. 如权利要求 24 所述的组合物,其中所述组合物包含的唾液酸化糖蛋白的量为约 30%或更多。

28. 如权利要求 24 所述的组合物,其中所述组合物包含的唾液酸化糖蛋白的量为约 5% - 约 30%。

29. 如权利要求 24 所述的组合物,其中所述唾液酸化糖蛋白包含一个或多个末端唾液酸残基或其类似物。

30. 如权利要求 29 所述的组合物,其中所述末端唾液酸残基通过 $\alpha 2,6$ 键连接到糖蛋白上。

31. 一种 IVIG 衍生的组合物,配制成包含约 5% - 约 30%量的唾液酸化的含 Fc 的糖蛋

白,其中所述唾液酸化的糖蛋白包含通过 α 2,6 键连接到糖蛋白上的一个或多个末端唾液酸残基。

32. 一种重组 Fc 糖蛋白或其片段,包含通过 α 2,6 键连接到糖蛋白上的至少一个末端唾液酸残基或其类似物。

33. 一种重组 Fc 糖蛋白,包含在 Asn 297 处的 N 连接的糖,其中所述糖具有双触角的 GlnNac2、Man3、GlcNAc2、Gal2 结构,所述结构具有通过 α 2,6 键连接的一个或多个末端唾液酸残基。

34. 包含前述权利要求中任一项所述的含 Fc 的糖蛋白,其中所述 Fc 区是 IgG 或其亚类。

35. 一种包含权利要求 24 所述的糖蛋白的药物制剂。

36. 一种通过使用权利要求 35 所述的药物制剂治疗受试者的炎性疾病的方法。

具有增强的抗炎活性和降低的细胞毒性的多肽以及相关方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有于 2007 年 12 月 14 日提交的美国申请 11/957,015 的优先权,该专利申请是 2007 年 4 月 3 日提交的 PCT 专利申请 PCT/US 07/08396 的部分继续申请,该 PCT 专利申请要求享有于 2006 年 4 月 5 日提交的美国临时申请 60/789,384 的优先权,所有这些专利申请均通过引用方式结合在本文中。本申请也是 2007 年 7 月 3 日提交的 PCT 专利申请 PCT/US07/72771 的部分继续申请,该 PCT 专利申请要求享有于 2006 年 10 月 27 日提交的申请 PCT/US06/41791 的优先权, PCT/US06/41791 要求享有于 2005 年 11 月 7 日提交的美国临时申请 60/734,196 的优先权,所有这些申请均通过引用方式结合在本文中。

[0003] 有关联邦资助研究的声明

[0004] 导致本申请的研究受到国家卫生研究院 No. AI 034662 资助的部分支持。因此,美国政府可以享有本发明的特定权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于设计治疗炎症性疾病的治疗多肽的新方法。

背景技术

[0006] 尽管在将近 40 年之前就首次确认了免疫球蛋白的细胞受体,但是在最近的十年间才发现了它们在免疫应答中重要作用。它们在免疫应答的传入和传出期中都起到关键作用:设定 B 细胞激活和抗体产生的阈值,调节树突细胞的成熟和将抗体响应的高度特异性与效应器途径 (effector pathway) 耦联,如吞噬作用、抗体依赖性细胞的细胞毒性及炎症细胞的募集和激活。它们在将体液免疫系统与先天效应细胞相耦联中的重要作用使得它们成为受到关注的用于提高或限制抗体体内活性的免疫治疗靶标。

[0007] 抗体和抗体-抗原复合物与免疫系统细胞之间的相互作用产生多种应答,包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC)、吞噬作用、炎症介质的释放、抗体的清除和抗体的半衰期 (综述参见 Daron, Annu Rev Immunol,15, 203-234(1997); Ward 和 Ghetie, Therapeutic Immunol,2,77-94(1995); Ravetch 和 Kinet, Annu Rev Immunol,9,457-492(1991),各文献均通过引用方式结合在本文中)。

[0008] 抗体的恒定域并不直接参与抗体与抗原的结合,而是表现出各种不同的效应子功能。取决于它们重链恒定区的氨基酸序列,抗体或免疫球蛋白可以划分为不同的类。有 5 类主要的免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,这些类中的几种还可以进一步划分为亚类 (同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4; IgA1 和 IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。在各种不同的人免疫球蛋白类中,人 IgG1 和 IgG3 比 IgG2 和 IgG4 更有效地介导 ADCC。

[0009] 抗体进行木瓜蛋白酶消化产生了两个相同的抗体结合片段 (称为 Fab 片段,各片段具有单个的抗原结合位点) 以及剩余的“Fc”片段 (其名称反应了其容易结晶的能

力)。Fc 区对于抗体的效应子功能是至关重要的。人 IgG Fc 区的晶体结构已经被确定(Deisenhofer, Biochemistry, 20, 2361-2370(1981), 其通过引用方式结合在本文中)。在人 IgG 分子中, Fc 区是由木瓜蛋白酶切割 N 末端至 Cys, 226 产生的。

[0010] 一直以来, IgG 被认为通过由其 Fc 片段介导的相互作用来介导促炎活性和抗炎活性。因此, 尽管 Fc-FcγR 相互作用是造成免疫复合物和细胞毒性抗体的促炎性质的原因, 但是静脉用两种球蛋白 (IVIG) 及其 Fc 片段是抗炎的, 并且广泛地用于抑制炎症性疾病。该矛盾性质的准确机理还是未知的, 但是已经有人提出 IgG 的糖基化对于调节 IgG 的细胞毒性和炎症能力是关键。

[0011] IgG 在其两条重链的每一条上的 CH2 域中在 Asn²⁹⁷ 包含单个 N 连接的聚糖。共价连接的复合糖包含核心, 含 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和甘露糖 (man) 的双触角五聚糖。核心糖结构的进一步修饰在存在可变的岩藻糖、分支 GlcNAc、半乳糖 (gal) 和末端唾液酸 (sa) 部分的情况下在血清抗体中观察到。因此已经检测到超过 40 种不同的糖形 (glycoform) 共价连接到该单一糖基化位点上 (Fujii 等人, J. Biol. Chem. 265, 6009(1990))。已经表明 IgG 的糖基化通过维持两条重链的开放构型对于与所有 FcγR 的结合是至关重要的 (Jefferis 和 Lund, Immune. l Lett. 82, 57(2002), Sondermann 等人, J. Mol. Biol. 309, 737(2001))。IgG 糖基化对于 FcγR 结合的这一绝对必要条件解释了去糖基化的 IgG 抗体不能介导体内引发的炎症应答 (如 ADCC、吞噬作用和炎症介质的释放) 的原因 (Nimmerjahn 和 Ravetch, Immunity 24, 19(2006))。还观察到 IgG 的单个糖形可能炎症应答的调节有影响, 这已经由所报道的包含或缺少岩藻糖的 IgG 抗体对单个 FcγR 的亲和力改变以及随之它们对细胞毒性的影响所证明 (Shields 等人, J. Biol. Chem. 277, 26733(2002), Nimmerjahn and Ravetch, Science 310, 1510(2005))。在患类风湿性关节炎和几种自身免疫血管炎 (其中已经报道了 IgG 抗体的半乳糖基化和唾液酸化的降低) 的患者中已经观察到自身免疫状态与 IgG 抗体的特定糖基化模式之间的联系 (Parekh 等人, Nature 316, 452(1985), Rademacher 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6123(1994), Matsumoto 等人, 128, 621(2000), Holland 等人, Biochim. Biophys. Acta Dec 27; [Epub ahead of print] 2005)。据报道, IgG 糖形的变化也与老化相关和在免疫时出现, 尽管还未确定这些改变在体内的重要性 (Shikata 等人, Glycoconj. J. 15, 683(1998), Lastra 等人, Autoimmunity 28, 25(1998))。

[0012] 因此, 需要发展考虑到体内 IVIG 性质的完全不同现象的产生多肽的方法。

发明内容

[0013] 本发明通过提供这样的方法和分子来满足前述需要。一方面, 本发明提供了包含至少一个 IgG Fc 区的分离的多肽, 所述多肽与未纯化的抗体制剂相比具有改变的性质, 其中所述分离的多肽的唾液酸化比未纯化的抗体制剂的唾液酸化高。在一个实施方式中, 包含至少一个 IgG Fc 区的分离的多肽被至少一个 α 2,6 键连接到相应的末端唾液酸部分上的半乳糖部分糖基化, 且其中所述多肽与未纯化的抗体相比具有较高的抗炎活性。在一个实施方式中, 包含至少一个 IgG Fc 区的分离的多肽被至少一个通过 α 2,6 键连接到相应的末端唾液酸部分上的半乳糖部分糖基化, 且其中与未纯化的抗体制剂相比, 所述多肽与 Fc 激活受体的结合降低。在进一步的实施方式中, 该 Fc 激活受体选自 FcγRIIA、FcγRIIC 和 FcγRIIIA。

[0014] 一方面,分离的多肽来自重组源。

[0015] 另一方面,本发明提供了药物制剂,所述制剂包含含有至少一个 Fc 区、具有较高抗炎活性的多肽以及合适的载体或稀释剂。

[0016] 另一方面,本发明提供了调节包含 Fc 区的多肽的性质的方法,包括改变 Fc 区的多糖链的唾液酸化。

[0017] 在一个实施方式中,该方法包括:提供包含至少一个 Fc 区的多肽的未纯化源,所述包含至少一个 Fc 区的多肽的未纯化源包括:包含具有多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽,所述多糖链包含通过 α 2,6 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸,和包含缺少多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽,所述多糖链包含通过 α 2,6 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸;和提高所述包含具有多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽与所述包含缺少多糖链的至少一个 Fc 区的多个多肽的比,所述多糖链包含通过 α 2,6 键连接到半乳糖部分上的末端唾液酸。

[0018] 在再另一方面,本发明提供了治疗炎性疾病的方法,包括向需要的受试者施用包含多个分离的多肽的治疗组合物,该多个分离的多肽各包含至少一个 IgG Fc 区,其中各个 Fc 区的第一部分包含具有通过 2,6 键连接到相应的末端唾液酸上的半乳糖部分的相应糖链;所述治疗组合物的剂量小于包含多个分离的多肽的第二组合物的剂量,该多个分离的多肽各包含至少一个 IgG Fc 区,具有包含相应糖链的相应 Fc 区的第二部分,所述糖链具有通过 2,6 键连接到相应的末端唾液酸上的半乳糖部分;和或者第一部分比第二部分大,从而所述治疗组合物的剂量和所述第二组合物的剂量抑制炎症的程度基本相同,或者第一部分比第二部分大,从而所述治疗组合物抑制炎症的程度比相同剂量的所述第二组合物高。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 是显示 SNA⁺FC 连接的 MALDI-Tof 分析的示意图。

[0021] 图 2 总结了证明唾液酸和半乳糖之间 α 2,6 键的富集提高了 IVIG Fc 片段的抗炎性能的试验。

[0022] 图 3 总结了证明唾液酸和半乳糖之间 α 2,6 键的去除减弱了 IVIG Fc 片段的抗炎性能的试验。

[0023] 图 4 表明细胞毒性的降低并不依赖半乳糖和唾液酸之间的连接。

[0024] 图 5 表明 2,6 唾液酸化的 IgG Fc 的体内抗炎活性仅仅是 IgG Fc 聚糖的特性。

具体实施方式

[0025] 本发明人惊奇地发现, IgG Fc 域的细胞毒性和抗炎性反应是由 Fc 连接的核心多糖的不同唾液酸化造成的。IgG 抗体的细胞毒性在唾液酸化时降低;相反, IVIG 的抗炎活性增加。IgG 的唾液酸化表明在诱导抗原特异性的免疫应答时被调节,因此提供了一种将 IgG 从处于稳态的先天性抗炎分子转变为在抗原激发时的适应性促炎物质的新型方式。Fc-唾液酸化的 IgG 与巨噬细胞上的独特受体结合,其随之上调抑制性 Fc γ 受体 (Fc γ R), 因而防止自身抗体介导的病变。一般地参见 Ravetch 和 Nimmerjahn, J. *Experim. Medicine* 24(1): 11-15 (2007)。本发明人还进一步惊奇地发现, 抗炎性反应依赖于半乳糖和唾液酸部分之间连接的性质。IVIG 的抗炎活性取决于 Fc 上的精确聚糖结构这一观察进一步支持了本发明人之前提出的模型 (Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Science* 313, 670 (2006);

F.Nimmerjahn, J. V. Ravetch, JExp Med 204,11(2007)):特定的凝集素受体而不是标准的Fc受体参与该途径。作为本发明基础的数据支持了2,6唾液酸化的Fc与在调节性骨髓细胞群上表达的其同源凝集素受体的结合导致位于炎症位点(如发炎的关节)的效应巨噬细胞上的抑制性IgG Fc的反式上调的模型,因而提高了细胞毒性IgG结合激活FcR和引发炎症反应所需的阈值(F.Nimmerjahn, J. V. Ravetch, Science 310,1510(2005))。

[0026] 因此,本文提供了建立和选择具有理想的细胞毒性和抗炎能力的IgG的有利策略。

[0027] 定义

[0028] 在本发明的整个说明书和权利要求中,免疫球蛋白重链中残基的编号为如Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th EdPublic Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 中的EU编码,该文献通过引用方式明确地结合在本文中。“Kabat中的EU编码”是指人IgG1EU抗体的残基编号。

[0029] 术语“天然的”或“母本的”是指包含Fc氨基酸序列的未修饰的多肽。母本多肽可以包含天然序列的Fc区或具有预先存在的氨基酸序列修饰(如插入、缺失和/或取代)的Fc区。

[0030] 术语“多肽”是指包含至少一个IgG Fc区的蛋白质及其片段的任何片段,包括但不限于全长功能性蛋白质,例如,举例来说抗体(如IgG抗体)。当本发明的多肽与未纯化的抗体制剂对比时,这一制剂通常为来自哺乳动物(例如人类供体)的血液样品、血清样品和/或IVIG样品。该制剂可以是未分级的或部分分级的,但是通常仅包含约2-4%唾液酸化的含Fc的蛋白质。经富集或配制成具有免疫抑制活性的本发明的组合物通常包含至少约5%或更多(例如5-10%、10-30%、30-50%、50-100%或其范围或区间)的唾液酸化的含Fc的蛋白质。

[0031] 术语“Fc区”用于限定免疫球蛋白重链的C末端区域。“Fc区”可以是天然序列Fc区或变异Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的分界线可以发生变化,但是人IgG重链Fc区通常定义为从Cys226位或Pro230位的氨基酸残基延伸到其羧基末端。

[0032] 人IgG Fc区的“CH2域”(也称为“C_γ2”域)通常是从大约氨基酸231延伸到大约氨基酸340。CH2域是独特的,因为其不与另一域紧密配对。相反,两个N-连接的分支糖链插在完整的天然IgG分子的两个CH2域之间。据推测,糖可以提供域-域配对的替代,并有助于稳定CH2域(Burton, Mol Immunol, 22, 161-206(1985),其通过引用方式结合在本文中)。

[0033] “CH3域”包括Fc区中C末端残基到CH2域的一段(即从IgG的大约氨基酸残基341到大约氨基酸残基447)。

[0034] 术语“铰链区”通常定义为人IgG1的Glu216延伸到Pro230(Burton(1985))。其他IgG同种型的铰链区可以通过将形成重链间S-S键的第一个和最后一个半胱氨酸残基放在相同位置而与IgG1序列比对。

[0035] 术语“结合域”是指多肽结合另一分子的区域。对于FcR,结合域可以包括其多肽链(例如,其α链)负责结合Fc区的一部分。结合域的一个例子是FcR链的细胞外域。

[0036] “功能性Fc区”具有至少天然序列Fc区的部分“效应子功能”。示例性的“效应子功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒性、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等。这些效应子功能通常需要Fc区与结合域(例如抗体可变域)结合,并且可以使用例如本文公开的各种不同分析方法进行评估。该术语还包括Fc片段,只要该片段包含如本文所述的糖基化的或适合糖基化的至少一个氨基酸残基。

[0037] “天然序列Fc区”包含与天然发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。如本领域普通技术人员所理解的,“变异Fc区”由于至少一个“氨基酸的饰”而包含与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选地,变异Fc区与天然序列Fc区或母本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如天然序列Fc区中或母本多肽的Fc区中的大约1个-大约10个氨基酸取代,优选大约1个-大约5个氨基酸取代。本文的变异Fc区优选与天然序列Fc区和/或母本多肽的Fc区具有至少大约80%的同源性,更优选与其具有至少大约90%的同源性,更优选与其具有至少大约95%的同源性,再更优选与其具有至少大约99%的同源性。

[0038] 术语“改变的糖基化”是指在如上定义的多肽(天然的或修饰的)中,对糖添加到重链恒定区上进行操控以增加或减少特定的糖组分。例如,在特定细胞系(例如,举例来说,Lec2或Lec3)中制备的多肽(例如,举例来说,抗体)可能缺少糖部分(例如岩藻糖和唾液酸)的连接。

[0039] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合抗体Fc区的受体。在本发明的一个实施方式中,FcR是天然序列人FcR。在另一实施方式中,FcR(包括人FcR)结合IgG抗体(γ 受体),并包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体(包括这些受体的等位基因变异体或可选择地剪接形式)。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有相似的氨基酸序列,主要不同是其胞质域。激活受体Fc γ RIIA在其胞质域中包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质域中包含免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)(参见综述Daron,Annu Rev Immunol,15,203-234(1997);FcR的综述Ravetch和Kinet,Annu Rev Immunol,9,457-92(1991);Capel等人,Immunomethods,4,25-34(1994);和de Haas等人,J Lab Clin Med,126,330-41(1995),Nimmerjahn和Ravetch 2006,Ravetch Fc Receptors in Fundamental Immunology, edWilliam Paul 5th Ed.,所有文献均通过引用方式结合在本文中)。

[0040] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指其中表达FcR的细胞毒性细胞(例如单核细胞,如自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞)识别在目标细胞上的结合抗体,继而引起目标细胞裂解的体外或体内的细胞介导的反应。一般而言,具有激活Fc γ R的任何效应细胞可被引发以介导ADCC。一种这样的细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIII,而单核细胞(取决于其激活状态、定位或分化)可以表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Bolland,Annu Rev Immunol,(2001)中,其通过引用方式结合在本文中。

[0041] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地,该细胞表达至少一种类型的激活Fc受体(例如,举例来说,Fc γ RIII)并且执行ADCC效应功能。介导ADCC的人白细胞的例子包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞和嗜中性白细胞,PBMC和NK细胞是优选的。效应细胞可从其天然来源分离,例如如本文所述从血液或PBMC分离。

[0042] 术语“抗体”以广义含义使用,且特别地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出希望的生物学活性。

[0043] 短语抗体的“唾液酸含量”是指抗体重链的 Fc 区上唾液酸残基的总数和指未纯化抗体制剂中唾液酸化的抗体与未唾液酸化的抗体的比,除非该短语在上下文中清楚地表明是指另一含义。

[0044] 如本发明的目的所限定的,“抗体片段”包括完整抗体的一部分,通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区,或保留 FcR 结合能力的抗体 Fc 区。抗体片段的例子包括线性抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段优选保留至少铰链的部分和任选地 IgG 重链的 CH1 区。更优选地,抗体片段保留 IgG 重链的整个恒定区,并包括 IgG 轻链。

[0045] 如本文使用的术语“单克隆抗体”是指从基本同源抗体的群体获得的抗体,即构成该群体的单个抗体除了可能少量存在的可天然发生的突变以外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。此外,与常规(多克隆)抗体制剂(通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)相反,各单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”表明从基本同源的抗体群体获得的抗体的特征,并不理解为需要通过任何特定的方法来产生该抗体。例如,本发明使用的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法进行制备(该方法首先在 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256, 495-497 (1975) 中描述,其通过引用方式结合在本文中),或者可以通过重组 DNA 方法进行制备(参见例如美国专利 No. 4, 816, 567, 其通过引用方式结合在本文中)。单克隆抗体还可以通过使用例如 Clackson 等人, *Nature*, 352, 624-628 (1991) 和 Marks 等人, *J Mol Biol*, 222, 581-597 (1991) 中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离,各文献通过引用方式结合在本文中。

[0046] 在本发明的其它实施方式中,包含至少一个 IgG Fc 区的多肽可与其他蛋白质片段(包括但不限于全蛋白质)融合。本领域普通技术人员清楚地知道,许多蛋白质可以与本发明的多肽融合,包括但不限于其他免疫球蛋白,特别是缺少其相应 Fc 区的免疫球蛋白。或者,其他生物活性蛋白质或其片段也可以与本发明的多肽融合,例如美国专利 No. 6, 660, 843 中所描述的,该文献通过引用方式结合在本文中。该实施方式对于将这些生物活性蛋白质或其片段输送到表达 Fc 受体的细胞是特别有利的。此外,可以使用不同的标志物,例如,举例来说, GST 标签或者绿色荧光蛋白质或 GFP。

[0047] 本文的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类型或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而该链中的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类型或亚类的抗体及这些抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们表现出希望的生物学活性即可(参见美国专利 No. 4, 816, 567; Morrison 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 6851-6855 (1984); Neuberger 等人, *Nature*, 312, 604-608 (1984); Takeda 等人, *Nature*, 314, 452-454 (1985); 国际专利申请 No. PCT/GB85/00392, 其各通过引用方式结合在本文中)。

[0048] 非人(例如鼠科动物)抗体的“人源化”形式是包含源自非人类免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。对于绝大部分而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的超变区的残基被来自非人物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动

物)的具有希望的特异性、亲和力和能力的超变区的残基取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 被相应的非人类残基取代。此外,人源化抗体可以包含未在受体抗体或供体抗体中出现的残基。进行这些修饰来进一步优化抗体的性能。通常,人源化抗体包括至少一个且通常两个可变域的基本所有,其中所有或基本所有的超变环对应于非人类免疫球蛋白的那些超变环,并且所有或基本所有的 FR 残基是人免疫球蛋白序列的那些残基。任选地,人源化抗体还包含至少免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区 (Fc)。进一步细节可以参见 Jones 等人, *Nature*, 321, 522-525 (1986); Riechmann 等人, *Nature*, 332, 323-329 (1988); Presta, *Curr Op Struct Biol*, 2, 593-596 (1992); 美国专利 No. 5, 225, 539, 其各通过引用方式结合在本文中。

[0049] 本发明的多肽可以重组产生,例如从 cDNA (例如,举例来说, SEQID NO:1) 重组产生。不同实施方式的多肽包括 Fc 区或其功能性片段。

[0050] 包含至少一个 IgG Fc 区的多肽包括其中通过使用重组 DNA 技术改变编码重链恒定区的基因而将特定的氨基酸取代、插入或缺失引入到母本序列中的那些多肽。按照如手册 (如 *Molecular Cloning* (Sambrook and Russel, (2001))) 中描述的公知的分子生物学技术引入这些修饰。此外,具有至少一个 Fc 区的多肽包括已经过选择以包含特定的糖修饰的那些多肽,其或者通过在已知其糖基化特异性的细胞系中进行表达获得 (Stanley P. 等人, *Glycobiology*, 6, 695-9 (1996); Weikert S. 等人, *Nature Biotechnology*, 17, 1116-1121 (1999); Andresen DC 和 Krummen L., *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 117-123 (2002)), 或者通过使用特定凝集素的富集或贫化或通过酶处理获得 (Hirabayashi 等人, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 771, 67-87 (2002); Robertson 和 Kennedy, *Bioseparation*, 6, 1-15 (1996))。本领域已知抗体糖基化的质量和程度随所使用的细胞类型和培养条件而不同。例如, Patel 等人, *Biochem J*, 285, 839-845 (1992) 已经报道了如果抗体作为腹水或者在不含血清或含血清的培养基中产生,抗体连接的糖侧链中唾液酸的含量显著不同。此外, Kunkel 等人, *Biotechnol Prog*, 16, 462-470 (2000) 已经证明用于细胞生长的不同生物反应器和培养基中溶解氧的量影响抗体连接的糖部分中半乳糖和唾液酸的量。但是这些研究并没有解释唾液酸残基的不同水平是怎样影响抗体的体内活性的。

[0051] 宿主表达系统

[0052] 本发明的多肽可以在能够进行 N 连接糖基化的宿主表达系统 (即宿主细胞) 中表达。通常,这类宿主表达系统可以包括细菌、真菌、植物、脊椎动物或无脊椎动物表达系统。在一个实施方式中,宿主细胞是哺乳动物细胞,如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 (例如 CHO-K1; ATCC CCL-61)、绿猴细胞系 (COS) (例如 COS 1 (ATCC CRL-1650)、COS 7 (ATCC CRL-1651))、小鼠细胞 (例如 NS/O)、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞系 (例如, ATCC CRL-1632 或 ATCC CCL-10) 或人细胞 (例如 HEK293 (ATCC CRL-1573) 或 293T (ATCC CRL-11268)) 或任何其他合适的细胞系,例如可以从公开保藏机构 (如 American Type Culture Collection, Rockville, Md) 获得的。此外,可以使用昆虫细胞系 (如鳞翅类 (Lepidoptera) 细胞系,例如 Sf9)、植物细胞系、真菌细胞系 (如酵母,如举例来说,酿酒酵母、毕赤酵母、汉逊酵母属) 或基于杆菌 (如枯草杆菌或大肠杆菌) 的细菌表达系统。本领域普通技术人员知道,在一些情况下可能需要对宿主细胞进行修饰以确保发生 N 连接糖基化和聚糖成熟而产生通常

在人 IgG 的 Fc 域上发现的复合双触角的糖。

[0053] 治疗制剂

[0054] 可以通过混合具有理想纯度的本发明的多肽和任选的生理学可接受的载体、赋形剂或稳定剂（参见如 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）来制备冻干制剂或水溶液形式的包含含有至少一个 IgG Fc 区的多肽的治疗制剂用于储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的，且包括缓冲剂（如磷酸、柠檬酸和其他有机酸）、抗氧化剂（包括抗坏血酸和甲硫氨酸）、防腐剂（如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六烃季铵 (hexamethonium chloride)；苯扎氯铵、氯化苄乙氧铵；苯基醇、丁醇或苄醇；烷基对羟苯甲酸酯如对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间-甲酚）、低分子量（少于大约 10 个残基）多肽、蛋白质（如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白）、亲水性聚合物（如聚乙烯吡咯酮）、氨基酸（如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸）、单糖、二糖或其他糖类包括葡萄糖、甘露糖或糊精）、螯合剂（例如 EDTA）、糖（例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇）、成盐反离子（如钠）、金属螯合物（如 Zn-蛋白质螯合物）和 / 或非离子表面活性剂（如 TWEEN™, PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)）。

[0055] 本文的制剂还可以根据待治疗的特定适应症的需要包含多于一种的活性化合物，优选具有不会对彼此产生不利影响的互补活性的那些活性化合物。这类分子适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[0056] 活性成分还可以封闭在例如分别通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊（例如羟基甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊）中，在胶质药物递送系统（例如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）中或在乳剂中。这类技术公开在 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) 中。

[0057] 在优选的实施方式中，用于体内施用的制剂是无菌的。本发明的制剂可以方便地灭菌，例如通过无菌过滤膜的过滤。

[0058] 还可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适的例子包括包含修饰的抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质，该基质是以成形颗粒的形式，如薄膜或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶（如，聚(2-羟基乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸（参见例如美国专利 No. 3, 773, 919）、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙基酯的共聚物、非降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的注射微球）和聚-D-(-)-3-羟丁酸。尽管聚合物（例如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸）使得分子的释放超过 100 天，但是某些水凝胶在较短的时间内释放蛋白质。当包封的抗体在体内长时间保留时，它们可能由于在 37℃ 暴露在潮湿中而变性或聚积，从而造成生理活性的丧失或可能的免疫原性改变。取决于涉及的机理，可以设计合理的策略进行稳定。例如，如果发现聚积机理是通过硫醇-二硫化物互变形成分子间 S-S 键，则可以通过修饰巯基、从酸性溶液冻干、控制水分含量、使用合适的添加剂和开发特定的聚合物基质组成来获得稳定。

[0059] 包含至少一个 IgG Fc 区的唾液酸化多肽的产生

[0060] 本发明的多肽可以进一步纯化或修饰，从而它们与未修饰的和 / 或未纯化的抗体相比具有增加量的唾液酸。已有多种方法可以实现该目的。在一种方法中，未纯化多肽（例

如,举例来说,IVIG) 的源通过包含已知结合唾液酸的凝集素的柱子。本领域普通技术人员知道,不同的凝集素相对于半乳糖和唾液酸之间的 α -2,3 键对 α -2,6 键显示出不同的亲和力。因此,选择特定的凝集素使得能够富集在唾液酸与半乳糖之间具有希望的键类型的抗体。在一个实施方式中,从西洋接骨木 (*Sambucus nigra*) 分离凝集素。本领域普通技术人员知道,西洋接骨木凝集素 (SNA) 对通过 α (2-6) 键连接到半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺上的唾液酸是特异性的 (Shibuya 等, *J. Biol. Chem.*, 262:1596-1601 (1987))。相反,山槐 (*Maackia amurensis*) (“MAA”) 凝集素结合通过 α (2-3) 键连接到半乳糖上的唾液酸 (Wang 等, *J Biol Chem.*, 263:4576-4585 (1988))。

[0061] 因此,具有希望的半乳糖和唾液酸之间的键的包含至少一个 IgG Fc 区的多肽的部分将会保留在柱子中,而缺乏这种键的部分将会通过柱子。包含至少一个 IgG Fc 区的多肽的唾液酸化的部分可以通过具有不同严格性条件的另一冲洗步骤洗脱出来。因此,有可能获得本发明的多肽的制剂,其中唾液酸的含量与正常含量相比升高。此外,可以利用唾液酸转移酶和例如在美国专利 No. 20060030521 中描述的唾液酸供体的酶反应。

[0062] 用于本发明的方法中的唾液酸转移酶的合适的非限制性例子是 ST3Gal III (其也称为 α -(2,3) 唾液酸转移酶 (EC 2.4.99.6)) 和 α -(2,6) 唾液酸转移酶 (EC 2.4.99.1)。

[0063] α -(2,3) 唾液酸转移酶催化唾液酸转移到 Gal- β -1,3GlcNAc 或 Gal- β -1,4GlcNAc 糖苷的 Gal 上 (参见如 Wen 等人, *J. Biol. Chem.* 267:21011 (1992); Van den Eijnden 等人, *J. Biol. Chem.* 256:3159 (1991)), 并负责糖肽中天冬酰胺连接的寡糖的唾液酸化。唾液酸通过形成两个糖之间的 α -键连接到 Gal 上。糖之间的键 (连接) 是在 NeuAc 的 2-位和 Gal 的 3-位之间。可以从大鼠肝脏分离该特定的酶 (Weinstein 等人, *J. Biol. Chem.* 257:13845 (1982)); 人 cDNA (Sasaki 等人 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) *J. Biol. Chem.* 269:1394-1401) 和基因组 (Kitagawa 等人 (1996) *J. Biol. Chem.* 271:931-938) DNA 序列是已知的,从而有助于通过重组表达产生该酶。

[0064] α -(2,6) 唾液酸转移酶的活性产生 6-唾液酸化的寡糖,包括 6-唾液酸化的半乳糖。名称“ α -(2,6) 唾液酸转移酶”是指将唾液酸连接到受体多糖的第六个原子上的唾液酸转移酶家族。可以从不同组织分离得到 α -(2,6) 唾液酸转移酶的不同形式。例如该酶的一种特定形式 ST6Gal II 可以从大脑或胎儿组织中分离出来 (Krzewinski-Recchi 等人, *Eur. J. Biochem.* 270,950 (2003))。

[0065] 此外,本领域普通技术人员知道,可以控制细胞培养条件来改变唾液酸化速率。例如,为了增加唾液酸含量,降低生产率并将克分子渗透压浓度一般地维持在适于特定宿主细胞培养的下限。大约 250mOsm- 大约 450mOsm 的克分子渗透压浓度适于更高的唾液酸含量。这一细胞培养条件和其他合适的细胞培养条件描述在例如美国专利 No. 6,656,466 中。Patel 等人, *Biochem J*, 285,839-845 (1992) 已经报道了,如果抗体作为腹水或者在不含血清或含血清的培养基中产生,抗体连接的糖侧链中唾液酸的含量显著不同。此外,Kunkel 等人, *Biotechnol. Prog.*, 16,462-470 (2000) 已经表明,使用不同的生物反应器进行细胞生长和培养基中溶解氧的量影响抗体连接的糖部分中半乳糖和唾液酸的量。

[0066] 在另一实施方式中,宿主细胞 (例如,举例来说,永生化人胚胎视网膜细胞) 可以通过引入可操作地与启动子 (例如,举例来说,CMV 启动子) 连接的编码唾液酸转移酶 (例

如,举例来说, α -2,3-唾液酸转移酶或 α -2,6-唾液酸转移酶)的核酸进行修饰。 α -2,3-唾液酸转移酶可以是人 α -2,3-唾液酸转移酶,称为SIAT4C或STZ(GenBank 登录号L23767)且在如美国专利 No. 20050181359 中描述。

[0067] 编码唾液酸转移酶的核酸可以通过本领域普通技术人员已知的任何方法引入宿主细胞。引入外源核酸序列的合适的方法还在 Sambrook 和 Russel, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* (3rd Edition), ColdSpring Harbor Press, NY, 2000 中有所描述。这些方法包括但不限于物理转移技术(例如,举例来说,显微注射或电穿孔)、转染(例如,举例来说,磷酸钙转染)、使用例如脂质体的膜融合转移和病毒转移(例如,举例来说,使用 DNA 或逆转录病毒载体的转移)。

[0068] 包含至少一个 IgG Fc 区的多肽可以从培养上清液中回收,且如果需要的话,可以进行一个或多个纯化步骤,例如,举例来说,离子交换或亲和色谱。合适的纯化方法是本领域普通技术人员很清楚的。

[0069] 本领域普通技术人员可以理解,上述的唾液酸化方法的不同组合可以导致产生具有非常高唾液酸化水平的包含至少一个 IgG Fc 区的多肽。例如,可以如上所述在过表达唾液酸转移酶的宿主细胞中表达包含至少一个 IgG Fc 区的多肽,然后通过例如在酶反应中唾液酸化这些多肽、再使用含凝集素的柱子进行亲和色谱而进一步富集这些多肽的唾液酸化的部分。类似地,酶反应之后进行亲和色谱可以用于包含至少一个 IgGFc 区的多肽的 IVIG 源。

[0070] 为了检验在包含至少一个 IgG Fc 区的多肽上糖基化的程度,可以纯化这些多肽并在还原条件下在 SDS-PAGE 中进行分析。可以通过将分离的多肽与特定的凝集素反应来确定糖基化,或者可选地,如本领域普通技术人员所知道的,可以使用 HPLC 然后再使用质谱鉴别糖形(Wormald, MR 等人, *Biochem* 36 :1370(1997))。

[0071] 为了更加详细地描述本发明,下面给出几个非限制性的说明性实施例。

实施例

[0072] 实施例 1. 唾液酸含量增加的 IVIG 显示细胞毒性降低

[0073] 为了确定 IgG 的特定糖形是否参与调节抗体的效应子功能,对特定的 Asn²⁹⁷-连接的糖在介导确定的 IgG 单克隆抗体的细胞毒性中的作用进行了研究。使用质谱来分析如原先所描述的(6)在 293 细胞中表达为 IgG1、2a 或 2b 开关变异体(switch variant)的源自 6A6 杂交瘤的抗血小板抗体,从而确定它们特定的糖组成和结构。这些抗体包含最少的唾液酸残基。通过西洋接骨木凝集素亲和色谱富集含唾液酸的种类产生唾液酸含量富集了 60-80 倍的抗体。比较唾液酸化的和非唾液酸化的 6A6-IgG1 和 2b 抗体介导血小板清除的能力表明,唾液酸化和体内活性反相关。6A6IgG 抗体的唾液酸化使其生物活性降低 40-80%。

[0074] 为了确定该活性下降的机理,就各小鼠 FcYR 对这些抗体和其同源抗原进行表面等离子体共振结合。

[0075] 如 Nimmerjahn 和 Ravetch, *Science* 310,1510(2005) 中所描述的进行表面等离子体共振分析。简而言之,在其糖侧链中包含高和低水平唾液酸残基的 6A6 抗体变异体被固定在 CM5 传感器芯片的表面上。在室温下于 HBS-EP 运行缓冲液(10mM Hepes, pH 7.4, 150mM NaCl, 3.4mMEDTA 和 0.005%表面活性剂 P20)中通过流动池注入不同浓度的可溶性

Fc γ 受体,流速为 30uI/ 分钟。可溶性 Fc 受体注入 3 分钟,且到结合分子的解离观察 7 分钟。自动减去对照流动池的背景结合。进行对照试验以排除质量传输限制。通过对结合和解离相的同时拟合以及对数据组中所有的曲线的全拟合(global fitting)从传感图数据(sensorgram data)中获得亲和和常数。1 : 1 朗缪尔结合模型很好地拟合观察到的传感图数据并用于所有试验中。

[0076] 与它们的非唾液酸化形式相比,这些抗体的唾液酸化形式对它们各自的激活 Fc γ R 的结合亲和力观察到降低了 5-10 倍,而没有观察到对抗原的结合亲和力的变化。由于 IgG2b 以较高亲和力与其激活受体 Fc γ RIV 结合,当与 IgG1 结合其激活受体 Fc γ RIII 相比时,唾液酸化的作用是使 IgG2b 与其激活受体 Fc γ RIV 的结合亲和力与未唾液酸化的 IgG1 与其激活受体 Fc γ RIII 的结合亲和力相当。这一激活受体结合中的量差异的这种作用使得唾液酸化的 IgG2b 显示出与未唾液酸化的 IgG1 相当的体内活性。同样, IgG1 的唾液酸化降低了其对于激活受体 Fc γ RIII 的原已很低的结合亲和力 7 倍,因而产生了生理学失活的抗体。因此, IgG 的 Asn²⁹⁷ 连接聚糖结构的唾液酸化降低了对亚类限制性激活 Fc γ R 的结合亲和力,并因此降低了它们的体内细胞毒性。

[0077] 为了确定 IgG 的 N 连接聚糖的唾液酸化参与调节其体内炎性活性现象的普遍性,我们下一步研究了 N 连接聚糖对 IVIG 的抗炎活性的作用。当以高剂量(1-2g/kg) 静脉内施用,从 5-10,000 个供体的混合血清中获得该纯化的 IgG 部分广泛使用的治疗炎性疾病的治疗剂(Dwyer, N. Engl. J. Med. 326, 107(1992))。该抗炎活性是 Fc 片段的性质,且在 ITP、RA 和肾毒性肾炎中是保护性的(Imbach 等人, Lancet 1, 1228(1981), Samuelsson 等人, Science 291, 484(2001), Bruhns 等人, Immunity 18, 573(2003), Kaneko 等人, J. Exp. Med. 203(3) : 789-97(2006))。

[0078] 现提出该抗炎活性的共同机理包括在效应巨噬细胞上诱导抑制性 Fc γ RIIB 分子的表面表达,因此提高了细胞毒性 IgG 抗体或免疫复合物通过引发激活 Fc γ R 来诱导效应细胞反应所需的阈值(Nimmerjahn 和 Ravetch, Immunity 24, 19(2006))。

[0079] 实施例 2. IVIG 的唾液酸化降低了小鼠关节炎模型中 IVIG 的抗炎作用小鼠

[0080] C57BL/6 和 NOD 小鼠是从 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME) 购得的。Fc γ RIIB^{-/-} 小鼠在本发明人的实验室中产生,并与 C57BL/6 背景本底 12 代。C57BU6 背景(K/B) 的 KRN TCR 转基因小鼠是由 D. Mathis 和 C. Benoist(Harvard Medical School, Boston, MA) 赠送,并与 NOD 小鼠配种以产生 K/BxN 小鼠。6-10 周大的雌性小鼠用于所有的试验,并在洛克菲勒大学动物中心饲养。

[0081] 血清如原先所描述的(Bruhns 等人, Immunity 18, 573(2003)) 制备。简单地说,血清从由 K/BxN 小鼠(6-12 周大)收集的血液中分离出来。将几周收集的血清合并在一起,等分冷冻以用于本文描述的所有试验中。1. 5X 稀释的 K/BxN 血清的一次静脉注射(每克小鼠 4 μ l 合并的 K/BxN 血清)诱导关节炎。通过临床检验对关节炎进行评分。将所有四只爪子的指数相加: 0[未影响的]、1[一个关节肿胀]、2[多于一个关节肿胀]和 3[整个爪子严重肿胀]。在 K/BxN 血清注射之前一小时注射 IVIG。一些小鼠接受缺乏 6A6-IgG2b 抗体的 5 μ g 血小板,并使用 Advia 120 血液学系统(Bayer) 在处理 0、4 和 24 小时确定血小板计数。所有的试验符合联邦法律和学院指导方针的,并且由洛克菲勒大学(纽约, NY) 批准。

[0082] 抗体和可溶性 Fc 受体

[0083] 6A6 抗体开关变异体是通过瞬时转染 293T 细胞然后再如所描述的用蛋白质 G 进行纯化产生的 (Nimmerjahn 和 Ravetch, Science 310, 1510 (2005))。唾液酸富集的抗体变异体是通过使用西洋接骨木凝集素 (SNA) 琼脂糖 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 的凝集素亲和色谱从这些抗体制剂中分离出来的。唾液酸含量的富集是通过凝集素印迹确认的 (见下文)。人静脉内免疫球蛋白 (IVIG, 5% 于 10% 麦芽糖中, 色谱纯化的) 是从 Octapharma (Hemdon, VA) 购得的。按照所描述的进行人 IVIG 的消化 (Kaneko Y. 等人, Exp. Med. 203 (3) :789-97 (2006))。简而言之, IVIG 在 37°C 用 0.5mg/ml 的木瓜蛋白酶消化 1 小时, 并通过添加 2.5mg/ml 碘代乙酰胺 (iodoacetamide) 终止消化。在 HiPrep 26/60S-200HR 柱 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上将生成 Fab 和 Fc 的片段与非消化的 IVIG 分离, 然后再用蛋白质 G 柱 (GE Healthcare) 和蛋白质 L 柱 (Pierce, Rockford, IL) 纯化 Fc 和 Fab 片段。片段纯度是通过使用抗人 IgG Fab 或 Fc 特异性的抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 的免疫印迹检测的。纯度经判断大于 99%。F4/80 抗体来自 Serotec (Oxford, UK)。Ly 17.2 抗体来自 Caltag (Burlingame, CA)。绵羊抗肾小球基底膜 (GBM) 抗血清 (肾毒性血清, NTS) 是由 M. P. Madaio (宾夕法尼亚大学, 费城, PA) 赠送。包含 C 末端六组氨酸标签的可溶性 Fc 受体是通过 293T 细胞的瞬时转染产生的, 并如厂商 (Qiagen) 所建议的用 Ni-NTA 琼脂糖从细胞培养上清液中纯化。

[0084] IVIG 用神经氨酸苷酶处理, 并通过质谱分析产生的制剂的组成和结构。在神经氨酸苷酶处理之后, 没有残留可检测的含唾液酸的聚糖。然后测试这些 IgG 制剂防止通过 KxN 血清的被动转移诱导的小鼠关节炎 (IgG1 免疫复合物介导的炎症性疾病模型) 的能力。神经氨酸苷酶的去唾液酸化在 KxN 血清诱导关节炎模型中消除了 IVIG 制剂的保护效应。该活性的丧失并不是非唾液酸化 IgG 制剂的血清半衰期降低的结果, 也不是 IgG 的单体组成或结构完整性改变的结果。使用 PNGase 去除所有聚糖具有相似的效果并消除 IVIG 的体内保护效应。

[0085] 实施例 3. 具有增强的唾液酸含量的 IVIG 部分减轻了小鼠关节炎模型中的炎症

[0086] 具有增加的唾液酸含量的 IVIG 的制备

[0087] 由于唾液酸看起来是 IVIG 的抗炎活性所需要的, 因此对于该抗炎活性的高剂量需求 (1g/kg) 的基础可能是总 IVIG 制剂中唾液酸化 IgG 的限制浓度。IVIG 在 SNA-凝集素亲和柱上分级以获得唾液酸修饰的聚糖结构富集的 IgG 分子。

[0088] 测试这些唾液酸富集的部分与未分级的 IVIG 相比在 KxN 血清转移关节炎模型中的保护效果。对于 SNA 结合部分观察到保护增强 10 倍, 因而与 1g/kg 未分级的 IVIG 相比, 0.1g/kg 的 SNA 富集的 IVIG 可获得相当的保护。SNA 富集部分的血清半衰期和 IgG 亚类分布与未分级的 IVIG 相当。唾液酸化的效应对 IgG 是特异性的; 唾液酸化的 N 连接糖蛋白 (如具有类似的双触角复合糖结构的胎球蛋白或铁传递蛋白) 在 IgG 的等摩尔浓度下不具有统计学显著的抗炎活性。最后, 唾液酸化的 IVIG 制剂的保护作用机理与未分级的 IVIG 相似, 其取决于 FcγRIIB 表达, 并导致效应巨噬细胞上该抑制受体的表达增加。

[0089] 实施例 4. 具有增加的唾液酸含量的 IVIG 抗炎应答的增强是由 Fc 域上 N 连接聚糖的唾液酸化介导的

[0090] 由于 IVIG 中的多克隆 IgG 还可以包含可被唾液酸化的轻链或重链可变域上的 O

和 N 连接聚糖,我们确认 SNA 富集的 IgG 制剂的抗炎活性增加是由 Fc 上 N 连接糖基化位点的唾液酸化增加产生的。Fc 片段是从未分级的和 SNA 分级的 IVIG 产生的,并测试它们的体内活性。如对完整的 IgG 所观察到的,当与由未分级的 IVIG 产生的 Fc 片段比较时,SNA 纯化的 Fc 片段的体内保护作用提高。相反,Fab 片段在该体内测定中未显示抗炎活性。因此,IVIG 抗炎活性的高剂量要求可以归因于总制剂中存在的唾液酸化 IgG 的较小贡献。因此通过唾液酸结合凝集素色谱富集这些部分提高了抗炎活性。

[0091] 使用 IgG 抗体的被动免疫的这些结果表明,IgG 从促炎物质转换为抗炎物质的能力受 Fc 域上 N 连接聚糖的唾液酸化程度的影响。

[0092] 实施例 5. 由 IgG 唾液酸化介导的抗炎活性的增加在主动免疫反应中出现

[0093] 古德帕斯丘病 (Goodpasture's Disease) 的鼠模型

[0094] 在该模型中,小鼠首先用绵羊 IgG 和助剂一起致敏,四天后注射绵羊抗小鼠肾小球基底膜制剂(肾毒性血清,NTS)。简而言之,使用于 CFA 中的 200 μ g 绵羊 IgG (Serotec) 经腹膜内对小鼠预免疫,然后在四天后再静脉注射每克体重 2.5 μ l NTS 血清。抗 GBM 抗血清注射之后四天,从非处理的对照小鼠中收集血液,并通过蛋白质 G (GE Healthcare, Princeton, NJ) 和琼脂糖结合的绵羊 IgG 柱(通过在 NHS 活化琼脂糖柱 (GE Healthcare, Princeton, NJ) 上共价偶联绵羊 IgG 产生)的亲和色谱纯化血清 IgG。

[0095] 预致敏后用 NTS 进行处理以诱导小鼠 IgG2b 抗绵羊 IgG 抗体 (NTN 免疫的) (Kaneko Y. 等人, Exp. Med., 203 :789 (2006))。小鼠 IgG2b 抗体与 NTS 抗体一起沉积在肾小球中,并通过 IgG2b 介导的浸润巨噬细胞上 Fc γ RIV 的激活产生急性和暴发性炎症反应。没有预致敏的情况下,没有观察到炎症,表明小鼠 IgG2b 抗绵羊 IgG 抗体是炎症反应的介质。

[0096] 为了确定是否产生促炎 IgG 的主动免疫与唾液酸化的改变相关,来自预免疫和 NTS 免疫小鼠的血清 IgG 和 IgM 通过 SNA 凝集素结合对唾液酸含量进行表征。与未免疫对照相比,免疫小鼠中总 IgG 唾液酸化平均降低 40%。该效应对 IgG 是特异性的;IgM 的唾液酸化在免疫之前和之后相当。在分析来自小鼠血清的绵羊特异性 IgG 部分时,唾液酸化中的这一差别更加明确,表明与预免疫的 IgG 相比唾液酸化降低 50-60%。

[0097] 这些结果由 MALDI-TOF-MS 分析得到确认。通过 CSDGlycotechnology Core Resource (San Diego, CA) 进行单糖组成分析。糖蛋白样品用 SDS 和 2-巯基乙醇变性,并用 PNGase F 消化。释放的混合 N-聚糖通过反相 HPLC 和固相萃取进行纯化,然后 N-聚糖的暴露的羟基被甲基化。得到的衍生化糖再次通过反相 HPLC 纯化,并进行 MALDI-TOF-MS 分析。

[0098] 免疫前和免疫后 IgG 的分析确认了 N-聚糖结构的改变对末端唾液酸部分是特异性的。在肾小球中沉积的小鼠 IgG2b 抗绵羊抗体之前表明负责携带 Fc γ RIV 的浸润巨噬细胞的接入 (engagement),与预免疫的对照相比显示出降低的唾液酸含量。

[0099] 实施例 6. IVIG 中唾液酸和半乳糖之间的连接的分析

[0100] 进行 SNA⁺(西洋接骨木凝集素) IVIG Fc 连接的顺序 Maldi-Tof 分析来确定如上所述在 ITP、RA 和肾毒性肾炎模型中保护性的唾液酸化的 IgG Fc 部分的结构。对 Maldi-Tof 中产生的聚糖峰进行分离,进一步分级,并重新分析直到获得半乳糖-唾液酸结构。具有体内抗炎活性的富集半乳糖-唾液酸的结构是足迹直方图 (footprint histogram) (图 1A) 与唾液酸键标准品 α 2-3 唾液乳糖 (图 1B) 和 α 2-6 唾液乳糖 (图 1C) 的直方图相比。标

准品的特征峰由分别对应 α 2-3 (图 1B) 或 α 2-6 (图 1A 和 1C) 的箭头标明, 且与从样品获得的峰相比较。

[0101] 实施例 7. 通过体外糖基化富集 α 2-6 键的 IVIG Fc 片段提高了 IVIG 的抗炎性能。

[0102] 如图 2A 所示, IVIG Fc 片段的聚糖 Maldi-Tof MS 分析显示不以半乳糖作为末端 (峰 G0)、以一个半乳糖作为末端 (峰 G1)、以两个半乳糖作为末端 (峰 G2) 或以唾液酸作为末端 (由标明“末端唾液酸”的括弧表示) 的结构。为了确定 2,3 或 2,6 唾液酸化的 IgG Fc 的体内活性, 样品用唾液酸酶进行处理, 然后再用半乳糖转移酶将 G0 (没有半乳糖) 和 G1 (单个半乳糖) 转化成 G2 (完全半乳糖基化), 以增加潜在的唾液酸化位点。如图 2B 所示, 超半乳糖基化是通过比较通过 ECL 测量的末端半乳糖的相对带强度比和考马斯 (Coomassie) 上样对照进行确认。使用 α 2-6 唾液酸转移酶 (“ST6Gal”) 或 α 2-3 唾液酸转移酶 (“ST3Gal”) 进行体外唾液酸化 (图 2C), 并使用 SNA 对 α 2-6 键 (上部) 或使用 ECL 对 α 2-3 键 (中间) 和对考马斯 (底部) 的凝集素印迹分析来进行确认。为了评价体外唾液酸化的 Fc 抑制炎症的能力 (图 2D), 小鼠接受 0.66mg 的 α 2-6 唾液酸化 Fc (黑三角) 或 0.66mg 的 α 2-3 唾液酸化的 Fc (红三角)。一小时之后, 施用 0.2ml 的 K/BxN 血清, 并在接下来的 7 天中观察足垫肿胀 (临床评分)。观察到 2,6 唾液酸化的 IgG Fc 片段的抗炎活性, 但是没有观察到 2,3 唾液酸化分子的抗炎活性。这些结果与以上所示的数据一致, 并表明优先的 2,6 唾液酸-半乳糖键参与唾液酸化 IgG 的抗炎活性。

[0103] 实施例 8. 去除 α 2-6 而非 2,3 唾液酸键消除了 IVIG 的免疫抑制性质

[0104] 使用连接特异性的唾液酸酶 (SA) 来处理 IVIG, 并通过凝集素印迹 (图 3A) 确认消化。上图显示出 IVIG 中 α 2-6 键 (左道) 和 α 2-3SA tx IVIG (中间道) 的阳性西洋接骨木凝集素 (SNA) 染色, 但是在 α 2-3,6SA tx IVIG (右道) 中并未显示出阳性染色。中间图是 α 2-3 唾液酸键 (MAL I) 的点印迹, 仅对于胎球蛋白阳性对照显示为阳性染色; 每个点上样 100 μ g 蛋白质。下图显示考马斯上样对照。在印迹和凝胶中显示 10 μ g/道。为了检验特异性去除唾液酸部分的效应, 小鼠在施用 200 μ l K/BxN 血清之前给予 1g/kg 的 IVIG 制剂。如图 3B 所示, 在一周的时间内在施用 K/BxN 的血清的小鼠 (白圈) 中观察到脚垫肿胀, 如临床评分所测量的。IVIG 处理的小鼠显示出最小的肿胀 (黑三角), 使用 α 2-3SA tx IVIG 处理的小鼠 (白三角) 也是这样, 而接受 α 2-3,6SA tx IVIG 的小鼠 (方形) 没有受到对脚垫肿胀的保护。

[0105] 实施例 9. 细胞毒性降低不依赖于唾液酸和半乳糖之间连接的性质

[0106] 本发明人之前已经证明, 与 IgG 的 Fc 域结合的 N 连接聚糖的唾液酸化造成 FcR 结合降低, 导致 A/I 比例的降低 (Kaneko 等人, Science 313,670 (2006)), 该比例是由 IgG Fc 结合单个激活 (A) 或抑制 (I) IgG Fc 受体的亲和常数得到的值。已经表明, 该比例是特定 IgG Fc 的体内细胞毒性的指征 (F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, Science 310,1510 (2005))。因此, Fc 唾液酸化降低了 IgG 抗体在诱导的血小板减少症模型和体外 ADCC 模型中的细胞毒性 (Kaneko 等人, Science 313,670 (2006), Scallan 等人, Mol. Immunol 44,1524 (2007))。因此, 本发明人开始确定是否 FcR 结合和细胞毒性的这种降低受到唾液酸-半乳糖键的影响。原先已经证明导致血小板消耗的单克隆抗血小板 IgG2b 抗体如上所述在体外进行唾液酸化, 并测试其体内活性。在血小板减少症的体内模型中 (图 4), 体外末端 2,3 和 2,6 唾液酸化的 IgG Fc 都降低了该抗血小板抗体 6A6-IgG2b 的细胞毒性, 这与之前的研究一致

(Kaneko 等人, Science 313,670(2006), Scallan 等人, Mol. Immunol 44,1524(2007))。因此, Fc 唾液酸化对 IgG 抗体的细胞毒性的作用并不依赖于与倒数第二个半乳糖的连接的特异性。

[0107] 相反, 唾液酸化的 IgG Fc 片段的抗炎活性(本发明人已经证明依赖于标准 IgG Fc 受体的性质 (F.Nimmerjahn, J. V. Ravetch, Science 310,1510(2005) ;F.Nimmerjahn, J. V. Ravetch, J Exp Med 204,11(2007))) 对 2,6 唾液酸 - 半乳糖键显示出明显的优先性, 如图 3B 所示。

[0108] 这些结果进一步支持本发明人之前的观察, 即 IVIG 的抗炎性质是通过不参与与标准 Fc γ R 结合的独特途径介导的, 这与之前接受的模型截然相反 (Park-Min 等人, Immunity 26,67(2007) ;Siragam 等人, Nat Med12,688(2006))。

[0109] 实施例 10. 2,6 唾液酸化的 IgG Fc 的体内抗炎活性仅仅是 IgG Fc 聚糖的性质

[0110] 为了完全证明 2,6 唾液酸化的 IgG Fc 的体内抗炎活性仅仅是 IgG Fc 聚糖的性质而不是由可能在异源的 IVIG Fc 制剂中发现的其他组分产生的, 使用源自 293T 细胞中表达的 cDNA (SEQ ID NO. 1) 的同源重组人 IgG1 Fc 底物 (rFc) 来重演唾液酸化的 IVIG Fc 的抗炎活性。纯化的重组人 IgG1 Fc 片段是如上所述通过 β 1,4 半乳糖基化, 然后再进行 2,6 唾液酸化而体外工程化的聚糖 (图 5A)。该制剂进行纯化并在体内分析之前通过凝集素印迹和 MALDI-TOF 分析进行表征 (图 5A)。通过凝集素印迹对具有 ECL 的末端半乳糖 (上图)、具有 SNA 的 α 2,6 唾液酸 (中间图) 确认糖基化, 且考马斯上样对照显示于底图中。

[0111] 在 K/BxN 血清之前一小时向小鼠施用 IVIG、SNA+IVIG Fc 或唾液酸化的 rFc (2,6ST rFc), 然后在接下来的几天内监测足垫肿胀。如图 5B 所示, 2,6 唾液酸化的重组人 IgG1 Fc 片段显示出与 IVIG 衍生的唾液酸富集 Fc 片段 (SNA+IVIG Fc) 或体外 2,6 唾液酸化的 IVIG 衍生 Fc 片段 (2,6ST IVIG Fc) 相当的抗炎活性。每组 4-5 只小鼠的临床评分的平均值和标准差进行作图, * 表示通过 Kruskal-Wallis Anova, 再进行 Dunn's post hoc 确定的 $p < 0.05$ 。

[0112] 这些制剂中的各个制剂在 30mg/kg 时是有效的, 这与天然 IVIG 所需的 1,000-2,000mg/kg 形成对比 (表 1)。

[0113] 表 1. 在关节炎模型中导致相同程度的炎症抑制的含 Fc 片段的制剂的不同剂量。

[0114]

IVIG 制剂	IVIG	IVIG Fc	SNA+IVIG	SNA+IVIG Fc	2,3ST IVIG F	2,6ST IVIG Fc	2,6ST rFc
剂量	1g/kg	0.33g/kg	0.1g/kg	0.033g/kg	0.033g/kg	0.033g/kg	0.033g/kg
量 / 小鼠注射	20mg	6.66mg	2mg	0.66mg	0.66mg	0.66mg	0.66mg

[0115] 本文中引用的所有专利和非专利出版物通过引用方式结合在本文中, 就好像这些专利和非专利出版物的每篇均通过引用方式全文结合在本文中。此外, 尽管本发明根据具体实施例和实施方式进行了描述, 但是应该理解, 这些实施例和实施方式仅仅是本发明的原理和应用的说明。因此, 可以理解的是, 可以对举例说明的实施方式做出多种改变, 且可以在不偏离如下面的权利要求所限定的本发明的精神和范围的情况下采用其他的配置。

序列表

<110>The Rockefeller University

<120> 具有增强的抗炎活性和降低的细胞毒性的多肽以及相关方法

<130>70413. 00058/RU766-791

<150>New Application

<151>2008-12-12

<150>11/957, 015

<151>2007-12-12

<150>PCT/US07/08396

<151>2007-04-03

<150>60/789, 384

<151>2006-04-05

<150>PCT/US07/72771

<151>2007-07-03

<150>PCT/US06/41791

<151>2006-10-27

<150>60/734, 196

<151>2005-11-07

<160>1

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>1398

<212>DNA

<213> 人

<400>1

atgggtgaca atgacatcca ctttgccctt ctcctccacag gtgtccagtc cgaggtgaag	60
ctggatgaga ctggaggagg cttggtgcaa cctgggaggc ccatgaaact ctctgtgtt	120
gcctctggat tcacttttag tgactactgg atgaactggg tccgccagtc tccagagaaa	180
ggactggagt gggtagcaca aattagaaac aaaccttata attatgaaac atattattca	240
gattctgtga aaggcagatt caccatctca agagatgatt ccaaaagtag tgtctacctg	300
caaatgaaca acttaagagt tgaagacatg ggtatctatt actgtacggg ttcttactat	360
ggtatggact actgggggtca aggaacctca gtcaccgtga gctcagcctc caccaagggc	420
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	480
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgctcgtggaa ctcaggcgcc	540
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	600
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaate ttgtgacaaa	720
actcacacat gcccacgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc	780
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg	840
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	900
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag	1020
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccccgg atgagctgac caagaaccag	1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1260
tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1380
ctgtctccgg gtaaatga	1398

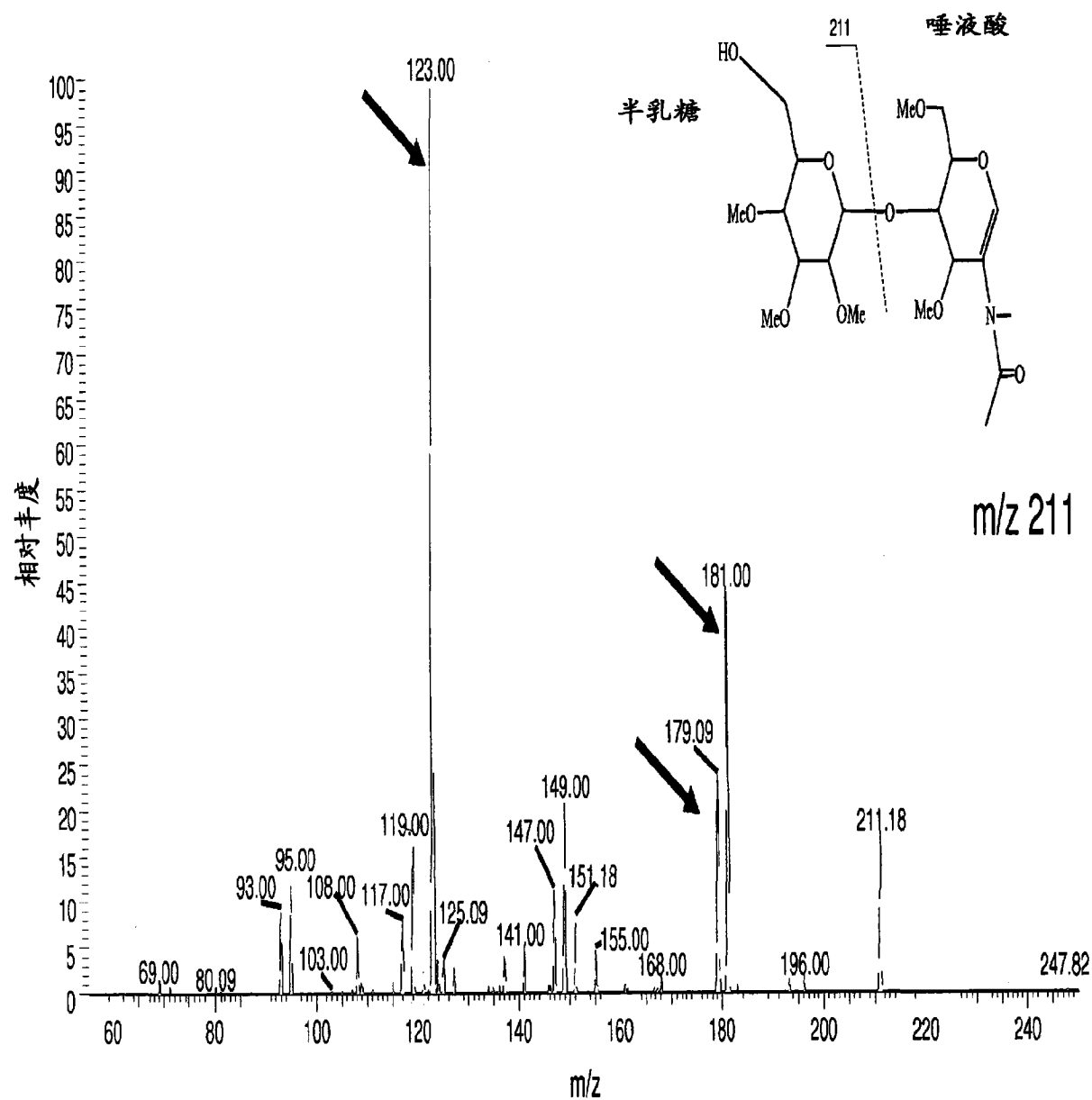


图 1A

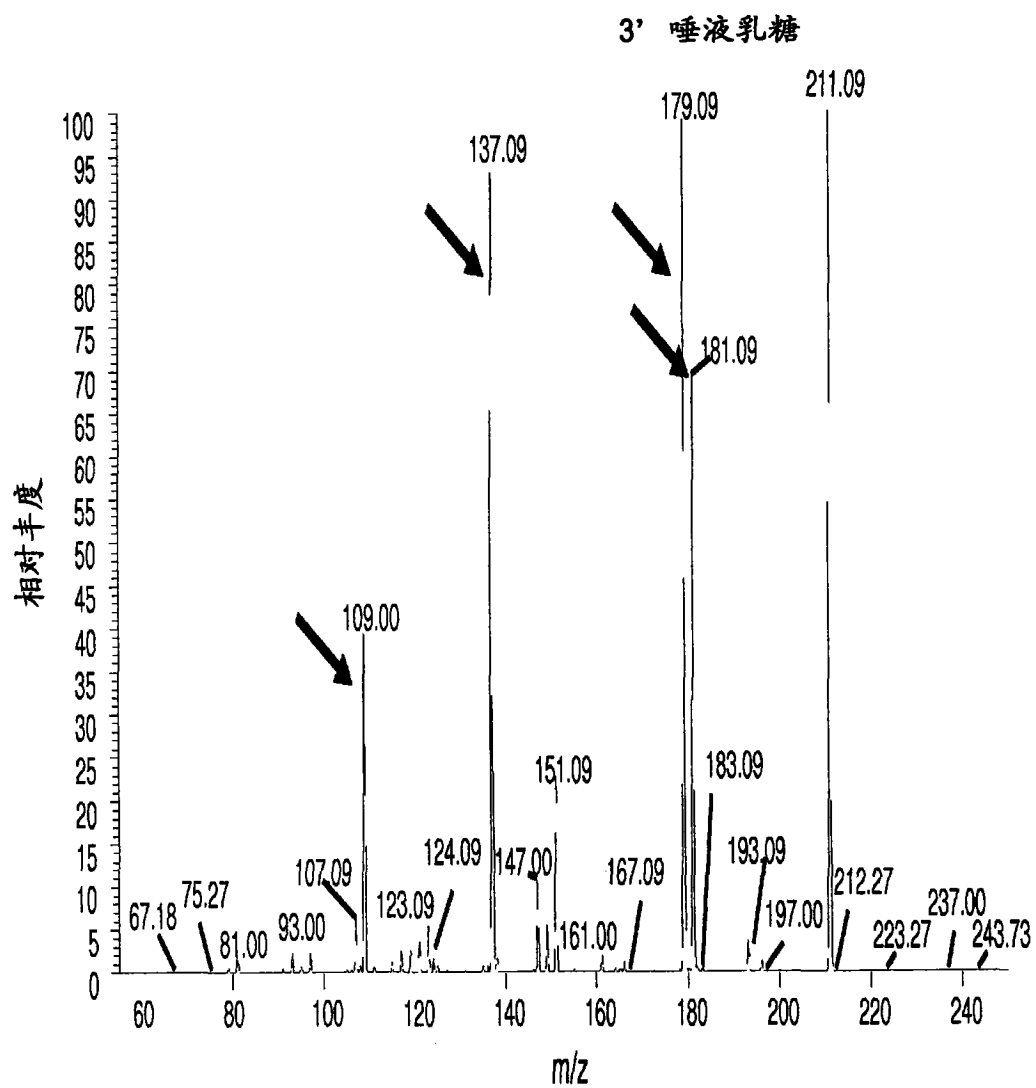


图 1B

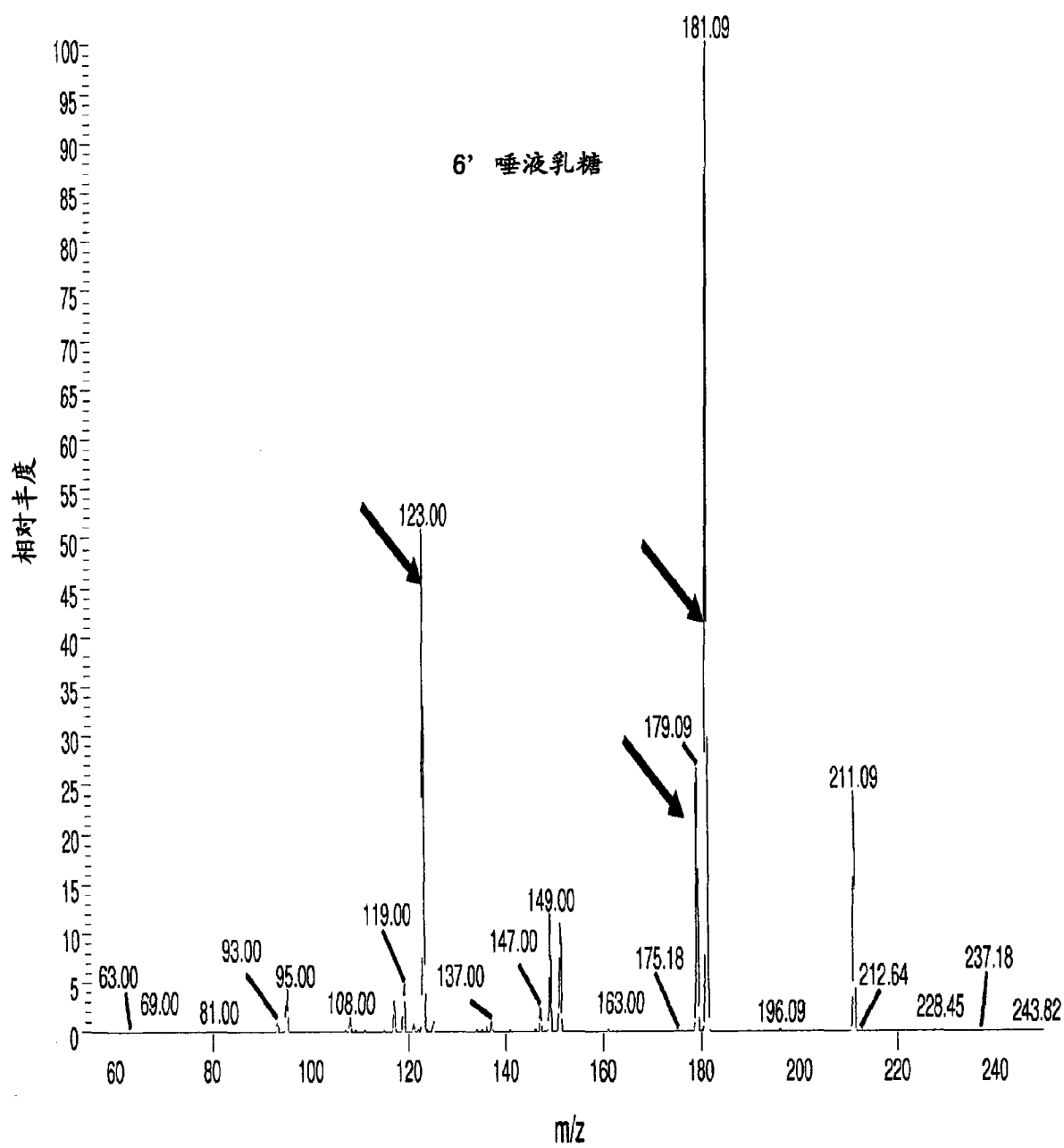


图 1C

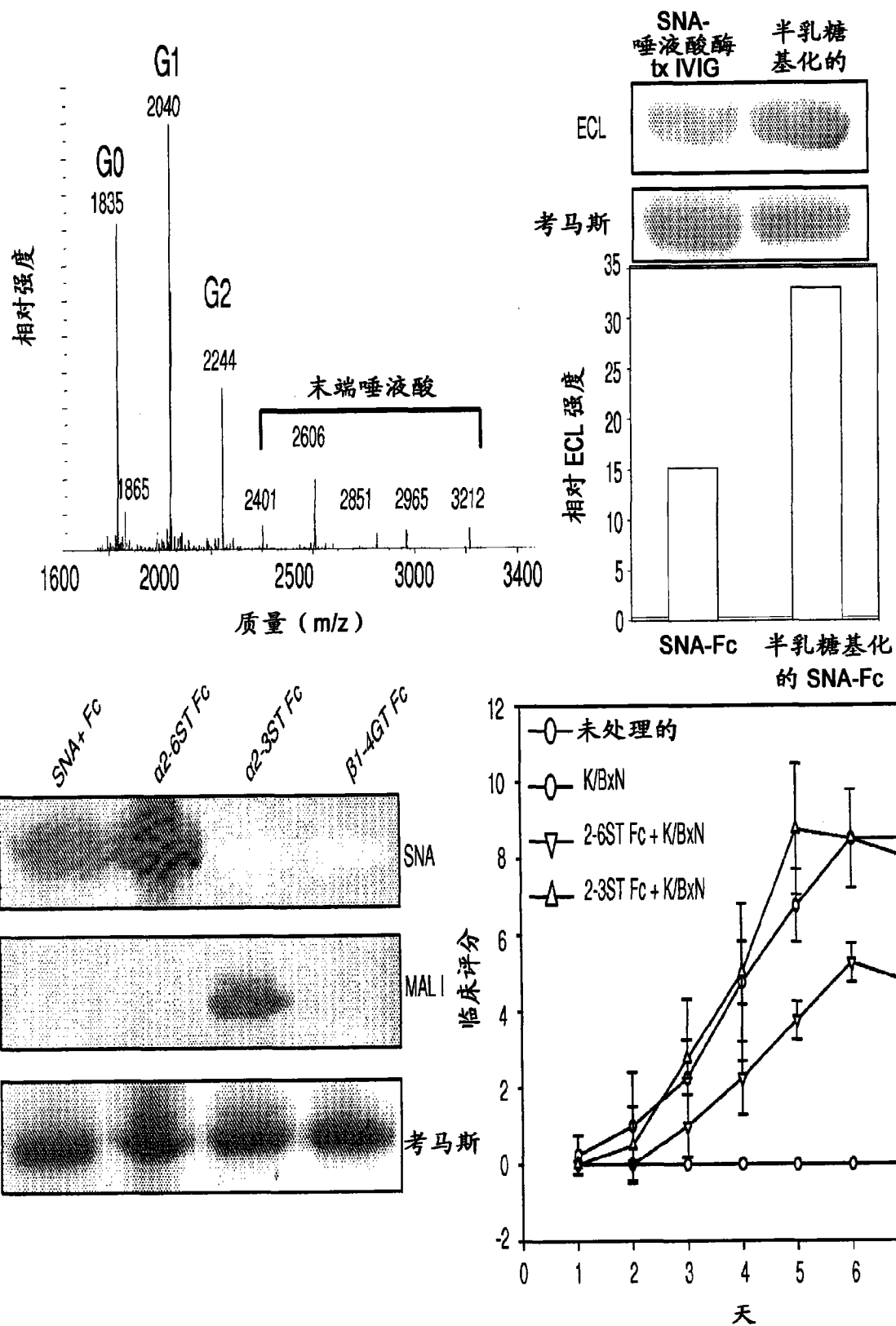


图 2

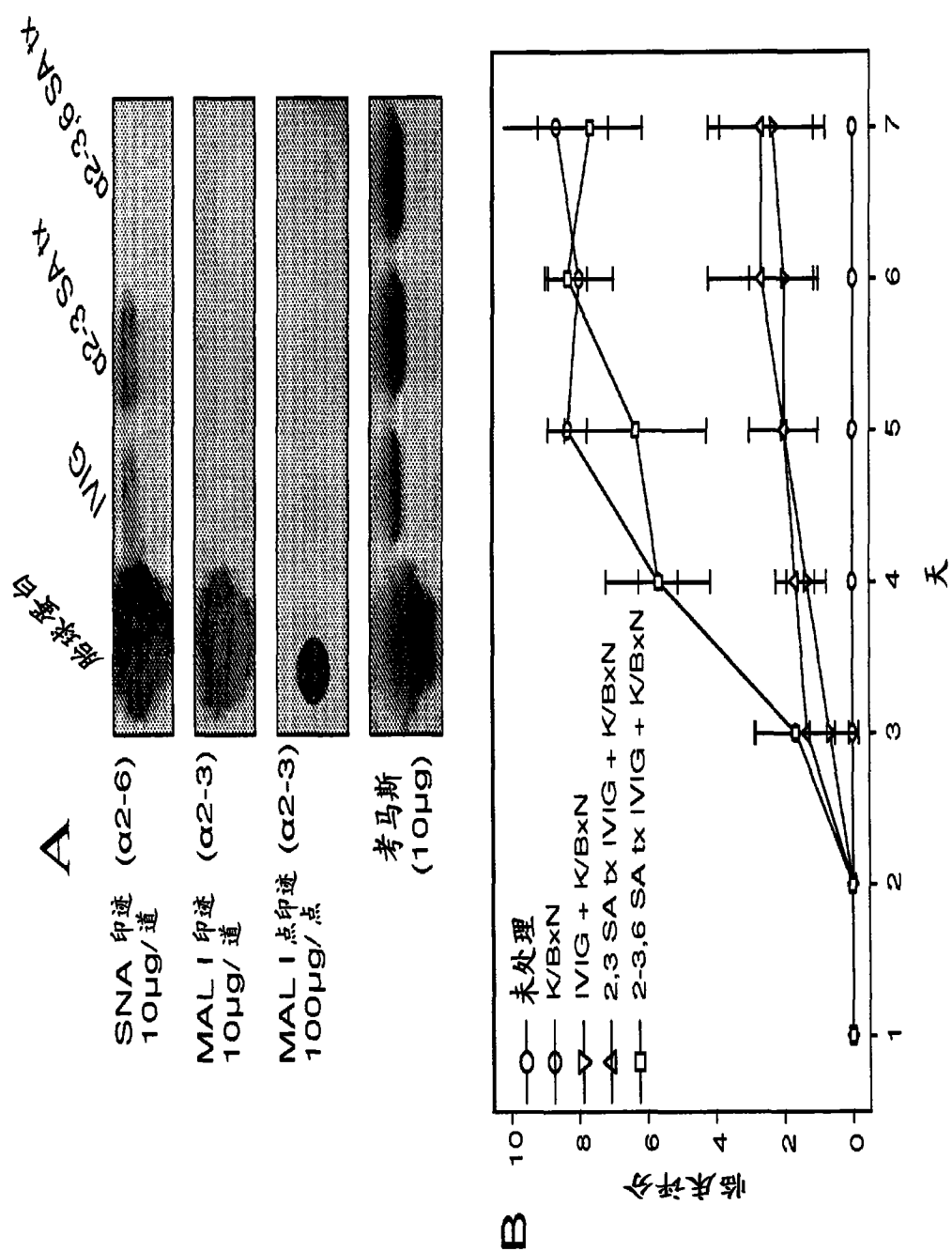


图 3

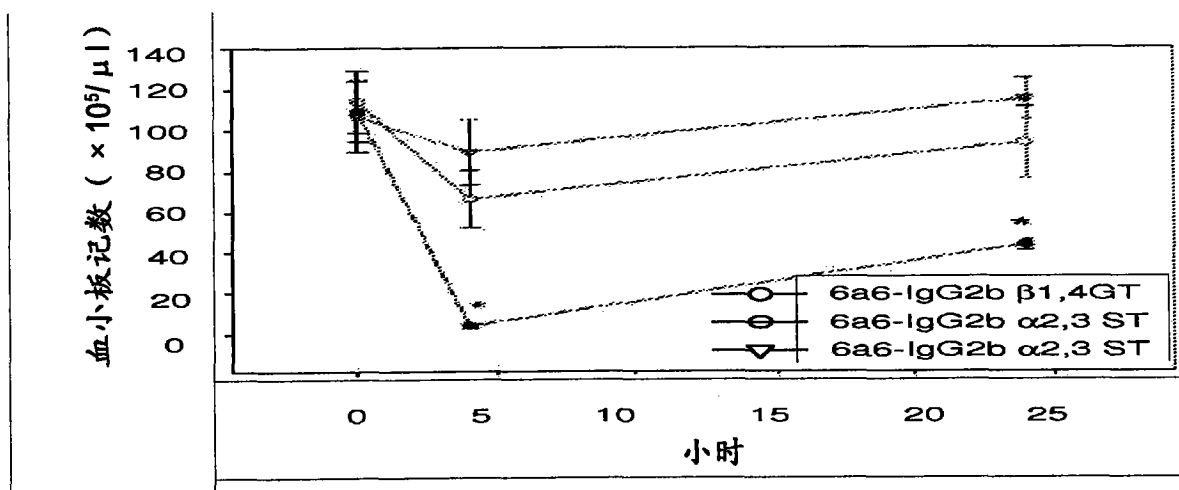


图 4

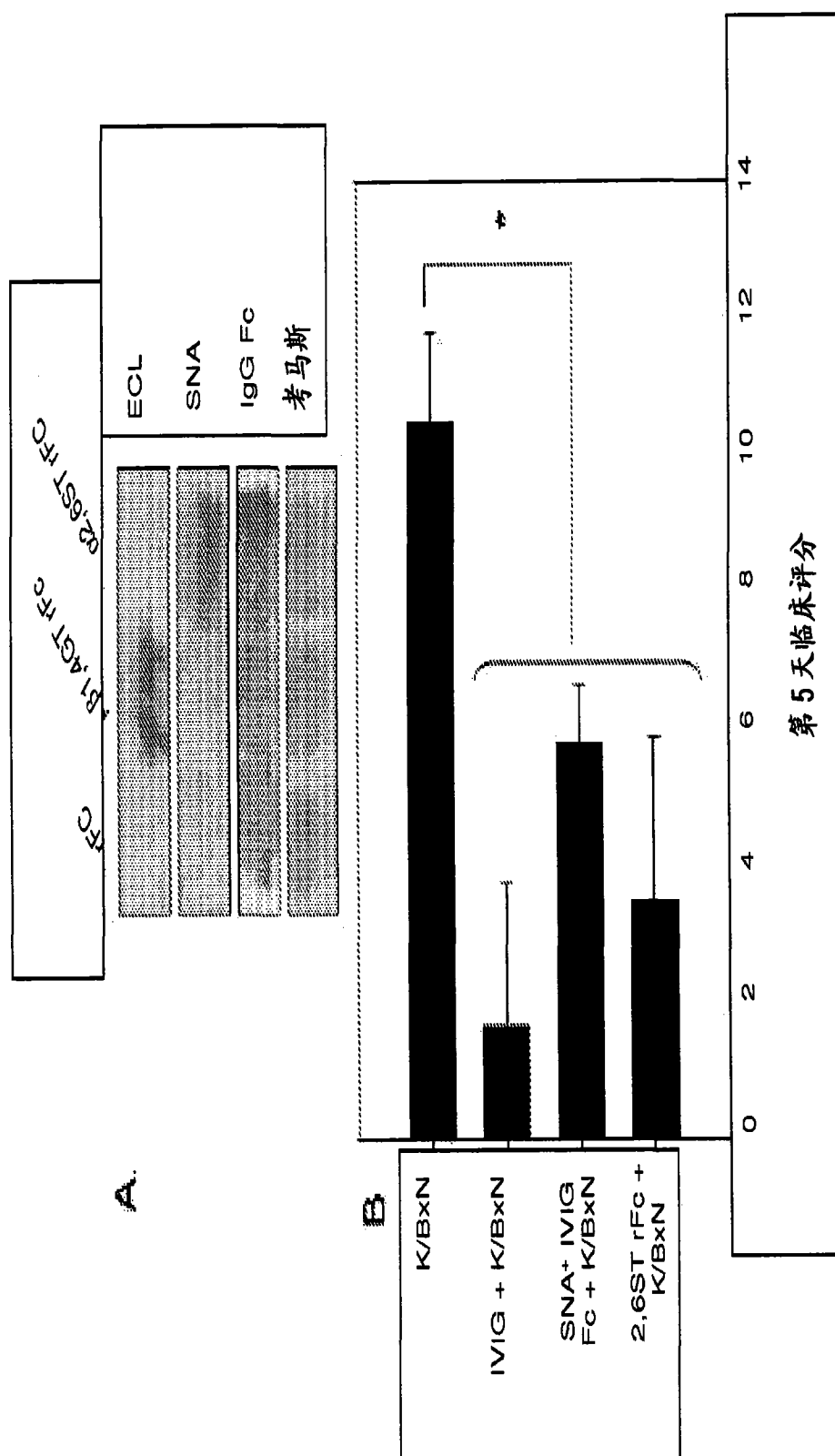


图 5