



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118652350 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 17

(21) 申请号 202410618028.5

(22) 申请日 2018.09.27

(30) 优先权数据
62/564,145 2017.09.27 US

(62) 分案原申请数据
201880075263.5 2018.09.27

(71) 申请人 埃皮辛特瑞柯斯公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 克里斯托弗·拉森
托尼·R·雷德
布莱恩·T·奥兰斯基

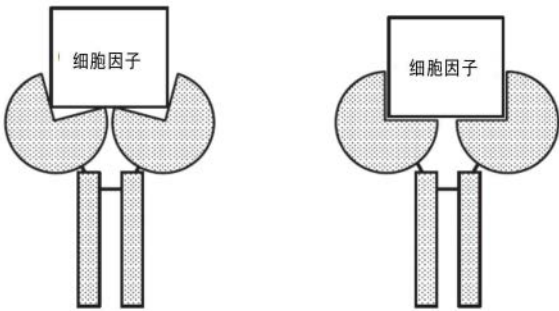
(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所
11330
专利代理师 杨剑

(51) Int.Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 47/65 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书31页
序列表（电子公布） 附图3页

(54) 发明名称
免疫调节性融合蛋白

(57) 摘要
提供了一种融合蛋白例如细胞因子受体融合蛋白如IL-10捕获蛋白 (IL-10trap), 其具有新的连接物序列, 以允许所述融合蛋白在功能上最优, 例如允许细胞因子受体融合蛋白的细胞因子受体部分最优地结合到它的靶细胞因子。所述融合蛋白或编码所述融合蛋白的表达载体可用于治疗细胞增殖性疾病和病变, 包括某些形式的癌症和炎症病变。



1. 一种分离的融合蛋白, 其以N-端到C-端的方向包含:
 - (i) IL-10受体的细胞外结构域的可溶性部分, 其中所述IL-10受体的细胞外结构域的可溶性部分与SEQ ID NO:12的第22至229位氨基酸残基具有大于95%的序列同一性;
 - (ii) 氨基酸连接物;
 - (iii) 免疫球蛋白(Ig) 铰链区; 和
 - (iv) 免疫球蛋白(Ig) Fc结构域;其中所述连接物由15至40个氨基酸残基构成;
其中所述Ig铰链区与所述Ig Fc结构域共同包含与SEQ ID NO:13-21中的一个具有大于95%的序列同一性的氨基酸序列; 并且
其中所述连接物包含源自于人类免疫球蛋白(Ig) C_H1结构域的C-端部分的序列。
2. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述连接物包含15至30个氨基酸残基。
3. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述连接物包含15至20个氨基酸残基。
4. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述Ig C_H1结构域选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM C_H1结构域。
5. 根据权利要求4所述的分离的融合蛋白, 其中所述连接物包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:57的氨基酸序列。
6. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述Ig C_H1结构域是IgG1 C_H1结构域。
7. 根据权利要求6所述的分离的融合蛋白, 其中所述连接物包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:57的氨基酸序列。
8. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述连接物包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列。
9. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述IL-10受体的细胞外结构域的可溶性部分包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。
10. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述IL-10受体的细胞外结构域的可溶性部分包含SEQ ID NO:12的第22至229位氨基酸残基。
11. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述Ig Fc结构域和铰链区选自人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM Fc结构域和铰链区。
12. 根据权利要求11所述的分离的融合蛋白, 其中所述Ig Fc结构域和铰链区包含选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列。
13. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述Ig Fc结构域和铰链区是人类IgG1 Fc结构域和铰链区。
14. 根据权利要求13所述的分离的融合蛋白, 其中所述Ig Fc结构域和铰链区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。
15. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述Ig Fc、Ig铰链区和Ig C_H1结构域源自于单一免疫球蛋白。
16. 根据权利要求1所述的分离的融合蛋白, 其中所述融合蛋白由选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:

28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:58的氨基酸序列构成。

17.根据权利要求16所述的分离的融合蛋白,其中所述融合蛋白由选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:58的氨基酸序列构成。

18.一种IL-10结合蛋白,其包含两个权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白,其中两个所述融合蛋白被共价连接在一起,并且其中所述IL-10受体的细胞外结构域的两个可溶性部分一起定义了用于结合IL-10的结合位点。

19.一种分离的核酸,其包含编码权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列。

20.一种表达载体,其包含权利要求19所述的核酸。

21.一种宿主细胞,其包含权利要求20所述的表达载体。

22.一种生产融合蛋白的方法,所述方法包括:

- (a) 将权利要求21所述的宿主细胞在一定条件下生长以表达所述融合蛋白;和
- (b) 纯化所述融合蛋白。

23.一种药物组合物,其包含:(i) 权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白或包含编码权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列的表达载体;和(ii) 至少一种可药用载体或稀释剂。

24.一种在靶细胞中表达融合蛋白的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于有效量的权利要求20所述的表达载体,以表达所述融合蛋白。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述融合蛋白在翻译后被切割成两条多肽链。

26.权利要求18所述的IL-10结合蛋白在制备用于抑制肿瘤细胞的增殖的药物中的应用。

27.权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白在制备用于抑制肿瘤细胞的增殖的药物中的应用。

28.权利要求18所述的IL-10结合蛋白在制备用于抑制肿瘤的生长的药物中的应用。

29.权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白在制备用于抑制肿瘤的生长的药物中的应用。

30.权利要求18所述的IL-10结合蛋白在制备用于在需要的受试者中治疗癌症的药物中的应用。

31.权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白或包含编码权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列的表达载体在制备用于在需要的受试者中治疗癌症的药物中的应用。

32.权利要求18所述的IL-10结合蛋白在制备用于降低IL-10活性的药物中的应用。

33.权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白在制备用于降低IL-10活性的药物中的应用。

34.权利要求18所述的IL-10结合蛋白在制备用于在需要的受试者中治疗炎症病症的药物中的应用。

35.权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白在制备用于在需要的受试者中治疗炎症病症的药物中的应用。

36. 权利要求20所述的表达载体在制备用于抑制肿瘤细胞的增殖的药物中的应用。
37. 权利要求20所述的表达载体在制备用于抑制肿瘤的生长的药物中的应用。
38. 权利要求20所述的表达载体在制备用于在需要的受试者中治疗癌症的药物中的应用。
39. 权利要求20所述的表达载体在制备用于降低IL-10活性的药物中的应用。
40. 权利要求20所述的表达载体在制备用于在需要的受试者中治疗炎症病症的药物中的应用。
41. 权利要求20所述的表达载体在制备用于在需要的受试者中治疗感染的药物中的应用。
42. 根据权利要求31所述的应用,其中所述癌症选自黑素瘤、皮肤的鳞状细胞癌、基底细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肛门癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、小细胞肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、胃食管癌、结肠直肠癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、肝癌、肝细胞癌、胆管癌、脑和中枢神经系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、子宫内膜癌、神经内分泌癌、淋巴瘤、白血病、梅克尔细胞癌、胃肠道间质肿瘤、多发性骨髓瘤、子宫癌、肉瘤、肾癌、眼癌、胰腺癌和生殖细胞癌。
43. 根据权利要求31所述的应用,其中所述癌症选自白血病、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、脑癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌和白血病。
44. 根据权利要求43所述的应用,其中所述癌症选自皮肤癌、头颈癌和肺癌。
45. 根据权利要求31所述的应用,其中所述融合蛋白或表达载体与选自手术、放射线、化疗、免疫疗法、激素疗法和病毒疗法的一种或多种疗法相组合施用到所述受试者。
46. 根据权利要求31所述的应用,其中所述融合蛋白或表达载体与淋巴细胞相组合施用到所述受试者。
47. 根据权利要求46所述的应用,其中所述淋巴细胞是T-细胞。
48. 根据权利要求47所述的应用,其中所述T-细胞是嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-cell)。
49. 根据权利要求31所述的应用,其中所述受试者是人类或动物。
50. 根据权利要求49所述的应用,其中所述受试者是人类幼儿。

免疫调节性融合蛋白

[0001] 本申请是申请号为201880075263.5、申请日为2018年9月27日、发明名称为“免疫调节性融合蛋白”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年9月27日提交的美国临时专利申请系列号62/564,145的利益和优先权,所述临时申请整体通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本发明的领域是分子生物学,具体来说免疫学和融合蛋白,例如细胞因子受体融合蛋白。

背景技术

[0005] 细胞因子是一种小型、分泌的细胞信号蛋白,其具有广泛的活性,包括细胞生长和分化的调控和免疫功能的调节。细胞因子、细胞因子受体和某些其他免疫调节蛋白已被用作治疗剂来治疗各种不同的医学病症。然而,这些蛋白的施用例如通过皮下或血管途径的给药,可能引起不适当的细胞和细胞外定位,由此限制了治疗活性和/或提高了毒性风险。

[0006] IL-10是一种具有免疫调控性质的同二聚体细胞因子,由包括活化的Th2细胞、B细胞、角化细胞、单核细胞和巨噬细胞在内的多种细胞产生(Moore等,(1993) ANNU.REV.IMMUNOL.11:165)。IL-10抑制包括T细胞、单核细胞和巨噬细胞在内的各种不同细胞的活化和效应功能。具体来说,IL-10抑制细胞因子被例如Th1细胞、自然杀伤细胞、单核细胞和巨噬细胞的多种细胞的合成,包括IL-1、IFN- γ 和TNF的合成(Fiorentino等,(1989) J.EXP.MED.170:2081-2095;Fiorentino等,(1991) J.IMMUNOL.146:3444;Hsu等,(1992) INT.IMMUNOL.4:563;Hsu等,(1992) INT.IMMUNOL.4:563;D'Andrea等,(1993) J.EXP.MED.178:1041;de Waal Malefyt等,(1991) J.EXP.MED.174:915;Fiorentino等,(1991) J.IMMUNOL.147:3815)。多种病原体,包括细胞内病原体,都会诱发IL-10的产生,使得所述病原体被免疫系统的有效去除速度被减缓或拖延(Moore等,(1993) 同上)。

[0007] 尽管到目前为止在治疗IL-10介导的障碍中已取得进步,但对治疗这些障碍的改进的疗法仍存在需求。

发明内容

[0008] 本发明部分是基于改进了融合蛋白的功能的连接物序列的发现,所述融合蛋白例如细胞因子受体融合蛋白,例如IL-10受体(IL-10R)融合蛋白,例如IL-10受体亚基 α (IL-10RA)融合蛋白如IL-10捕获蛋白(Trap)。所述连接物序列可以允许融合蛋白(例如细胞因子受体)的配体结合部分最优地结合到配体(例如细胞因子),提供融合蛋白的两个或更多个组分(例如二聚体细胞因子的两个亚基)的时空共定位,优化从表达载体(例如病毒载体)的表达,降低免疫原性,或提供切割位点以允许释放所述融合蛋白的组分。例如,所述连接物序列可以提供足够的柔性,以允许细胞因子受体的配体结合结构域在融合蛋白的背景中

采取天然构象,并最小化所述融合蛋白作为治疗剂使用的潜在免疫原性。

[0009] 一方面,本发明提供了一种分离的融合蛋白,其以N-端到C-端的方向包含例如:细胞因子、细胞因子受体或免疫调节蛋白的细胞外结构域、跨膜结构域或细胞内结构域的第一部分;氨基酸连接物;以及下述至少一者:细胞因子、细胞因子受体或免疫调节蛋白的细胞外结构域、跨膜结构域或细胞内结构域的第二部分;免疫球蛋白(Ig)铰链区;和免疫球蛋白(Ig)Fc结构域。在某些实施方式中,所述连接物包含约5至约40个氨基酸残基。在某些实施方式中,所述融合蛋白包含IL-10受体例如人类IL-10受体例如IL-10RA的一部分。

[0010] 另一方面,本发明提供了一种分离的融合蛋白,其以N-端到C-端的方向包含:细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分;氨基酸连接物;免疫球蛋白(Ig)铰链区;和免疫球蛋白(Ig)Fc结构域;其中所述连接物包含约5至约40个氨基酸残基。在某些实施方式中,所述细胞因子受体是IL-10受体例如人类IL-10受体例如IL-10RA。

[0011] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中,所述氨基酸连接物可以包含例如约5至约15个、约5至约20个、约5至约30个、约10至约15个、约10至约20个、约10至约30个、约10至约40个、约15至约20个、约15至约30个或约15至约40个氨基酸残基。

[0012] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中,所述氨基酸连接物序列源自于内源人类蛋白,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM、白蛋白或酪蛋白。在某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含免疫球蛋白(Ig)CH1结构域例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM CH1结构域的C-端部分。在某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含IgG1 CH1结构域的C-端部分,例如所述氨基酸连接物包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:57的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

[0013] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含源自于细胞因子、信号分子、免疫调节蛋白或肽或生物活性肽的序列。

[0014] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含切割位点例如蛋白水解切割位点,例如被存在于真核细胞的内质网或高尔基体中的蛋白酶切割的蛋白水解切割位点。在某些实施方式中,所述蛋白水解切割位点是弗林蛋白酶切割位点例如包含序列RX₁X₂R (SEQ ID NO:50)的弗林蛋白酶切割位点,其中X₁是任何氨基酸并且X₂是Lys或Arg,例如包含序列RAKR (SEQ ID NO:51)的弗林蛋白酶切割位点。在任何上述融合蛋白的某些实施方式中,所述氨基酸连接物在哺乳动物或植物中是蛋白水解稳定的。

[0015] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中,所述细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分是人类IL-10R例如IL-10RA的细胞外结构域的可溶性部分。例如,在某些实施方式中,所述细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或SEQ ID NO:12的第22-229位氨基酸残基。

[0016] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中,所述融合蛋白包含下述一者或多者:IL-10, TGF- β , TGF β 受体例如TGF β II型受体(T β RII), CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL27A/p28, IL-27B/EBI3, IL-15, CD154, CD70, TNF- α , CD86, CD137, CD137L, BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, GM-CSF, MAGE, NY-

ESO-1, 血管抑素, 内皮抑素, 乙酰胆碱, 干扰素- γ , DKK1/Wnt, p53, O₄40L, GM-CSF, IL-15受体融合蛋白, GITRL, CD40L, CD70, 分泌的鞭毛蛋白, IL-12, 胸苷激酶, 抗PD-1抗体重链或轻链, 抗PD-L1抗体重链或轻链和抗CTLA-4抗体重链或轻链, 或其功能性片段。

[0017] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中, 所述Ig铰链区选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM铰链区, 并且所述Ig Fc结构域选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM Fc结构域。在某些实施方式中, 所述Ig铰链区和Fc结构域一起包含选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述IgFc、Ig铰链区和Ig CH1结构域源自于单一免疫球蛋白。

[0018] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中, 所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述融合蛋白包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0019] 在任何上述融合蛋白的某些实施方式中, 所述融合蛋白包含与选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58的序列具有高于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0020] 另一方面, 本发明提供了一种二聚体细胞因子结合蛋白, 其包含共价连接在一起的任何上述融合蛋白中的两个, 其中每个融合蛋白包含细胞因子受体的细胞外结构域, 并且其中所述两个细胞外结构域一起定义了用于细胞因子的结合位点。

[0021] 另一方面, 本发明提供了一种核酸, 其包含编码任何上述融合蛋白的核苷酸序列。

[0022] 另一方面, 本发明提供了一种表达载体, 其包含任何上述核酸。

[0023] 另一方面, 本发明提供了一种宿主细胞, 其包含任何上述表达载体。另一方面, 本发明提供了一种生产融合蛋白的方法, 所述方法包括将宿主细胞在一定条件下生长以表达所述融合蛋白, 和纯化所述融合蛋白。另一方面, 本发明提供了一种在靶细胞中表达融合蛋白的方法, 所述方法包括将所述细胞暴露于有效量的任何上述表达载体。在某些实施方式中, 所述融合蛋白在翻译后被切割成两条多肽链。

[0024] 另一方面, 任何上述融合蛋白或表达载体可用于例如在受试者中降低细胞因子活性, 由此治疗由细胞因子例如IL-10介导的各种不同的医学指征。另一方面, 任何上述融合蛋白或表达载体可用于在体外和/或体内抑制肿瘤细胞的增殖, 在需要的受试者中抑制肿瘤生长, 或在需要的受试者中治疗癌症。所述受试者可以是例如动物例如哺乳动物, 例如人类如人类幼儿。例如, 当施用给患有癌症的人类受试者时, 所述融合蛋白或表达载体在所述受试者中抑制或减少肿瘤生长或减轻肿瘤负荷。

[0025] 在某些实施方式中, 所述癌症可以选自黑素瘤、皮肤的鳞状细胞癌、基底细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肛门癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、小细胞肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、胃食管癌、结肠直肠癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、肝癌、肝细胞癌、胆管癌、脑和中枢神经系

统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌(例如甲状旁腺上皮癌)、子宫内膜癌、神经内分泌癌、淋巴瘤(例如霍奇金和非霍奇金)、白血病、梅克尔细胞癌、胃肠道间质肿瘤、多发性骨髓瘤、子宫癌、肉瘤、肾癌、眼癌、胰腺癌和生殖细胞癌(例如卵巢生殖细胞癌)。在某些实施方式中,所述癌症可以选自白血病、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、脑癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌和白血病。

[0026] 在某些实施方式中,所述融合蛋白或表达载体与选自手术、放射线、化疗、免疫疗法、激素疗法和病毒疗法的一种或多种疗法相组合施用。在某些实施方式中,所述融合蛋白或表达载体与淋巴细胞例如T-细胞如CAR T-细胞相组合施用。

[0027] 任何上述融合蛋白或表达载体也可用于在需要的受试者中治疗炎症病症或感染。

[0028] 本发明的这些和其他方面和优点通过下面的附图、详细描述和权利要求书进行说明。

附图说明

[0029] 参考下述附图,本发明可以被更充分地理解。

[0030] 图1A描绘了细胞表面上的二聚体细胞因子受体(左)、抗体(中)和最优地结合靶细胞因子的受体-Fc融合体(右)的示意图。图1B描绘了受体-Fc融合体例如细胞因子捕获蛋白,其被空间约束而不能最优地结合到靶细胞因子(左)或采取最优结合构型(右)。

[0031] 图2描绘了人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM CH1结构域(上)和CH2结构域(下)的氨基酸序列的序列比对。

[0032] 图3描绘了在按照指示用IL-10和/或IL-10RA融合蛋白IL-10R-IgG和IL-10R-Fc处理报告细胞后磷酸化的Stat3的Western印迹。总Stat3被用作内参。与IL-10R-Fc相比,IL-10活性被IL-10R-IgG显著降低。

详细描述

[0034] 本发明提供了一种重组融合蛋白,其用于在受试者中治疗各种不同的医学病症,例如用于抑制肿瘤细胞的增殖、抑制肿瘤生长、治疗癌症、治疗炎症病症或治疗感染。示例性的融合蛋白包含:细胞因子、细胞因子受体或免疫调节蛋白的细胞外结构域、跨膜结构域或细胞内结构域的第一部分;氨基酸连接物;以及下述至少一者:细胞因子、细胞因子受体或免疫调节蛋白的细胞外结构域、跨膜结构域或细胞内结构域的第二部分;免疫球蛋白(Ig)铰链区;或免疫球蛋白(Ig)Fc结构域。设想了所述第一和第二部分可以是相同蛋白的部分或不同蛋白的部分,并且即使是相同蛋白,所述第一和第二部分也可以是所述相同蛋白的不同部分。在某些实施方式中,所述连接物包含约5至约40个氨基酸残基。本发明的示例性融合蛋白包括细胞因子捕获蛋白。

[0035] 细胞因子捕获蛋白例如IL-10捕获蛋白是一种含有细胞因子受体例如IL-10受体(IL-10R)例如IL-10受体 α 亚基(IL-10RA)的细胞外结构域的可溶性部分的分子,其被设计用于结合或以其他方式螯合靶细胞因子。在细胞因子捕获蛋白中,可以将细胞因子受体的细胞外结构域融合到免疫球蛋白(Ig)铰链区和免疫球蛋白(Ig)Fc结构域,这可以允许例如提高稳定性、Fc效应功能和/或多聚体化例如二聚体化。由融合到Ig铰链区和Ig Fc结构域产生的二聚化对于作为二聚体受体复合物存在于细胞表面上的细胞因子受体例如T β RII来

说是特别有利的。

[0036] 常规的细胞因子捕获蛋白例如IL-10捕获蛋白包含两条多肽链,每条多肽链包含融合到Ig铰链区和Ig Fc结构域的细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分。所述细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分通常被直接融合到Ig铰链区,没有任何居间序列。所述两条多肽链通过每个所述Ig铰链区中的半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。每条多肽链提供细胞因子受体例如IL-10R例如IL-10RA的细胞外结构域的可溶性部分,并且所述两个细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分一起定义了用于细胞因子的结合位点。图1A中描绘了二聚体细胞因子受体、免疫球蛋白(抗体)分子和包含两个共价连接的融合蛋白的二聚体蛋白的示意图,每个所述融合蛋白包含融合到Ig铰链区和Ig Fc结构域的细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分。

[0037] 本发明部分是基于下述发现,即包含细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分与Ig铰链区和Ig Fc结构域的融合蛋白的常规的细胞因子捕获蛋白例如IL-10捕获蛋白,不最优地结合它们的靶细胞因子。例如,常规的IL-10捕获蛋白不在两个IL-10配体结合结构域之间提供足够的柔性以允许所述两个IL-10配体结合结构域一起集成定义IL-10结合位点的最优构型。

[0038] 因此,一方面,本发明提供了一种分离的融合蛋白,其以N-端到C-端的方向包含:细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分;氨基酸连接物;免疫球蛋白(Ig)铰链区;和免疫球蛋白(Ig)Fc结构域;其中所述连接物包含约5至约40个氨基酸残基。所述连接物序列允许例如所述细胞因子受体的细胞外结构域的结合结构域最优地结合到它的靶细胞因子。当细胞因子结合蛋白是由上述两种融合蛋白组成的二聚体时,这一点尤为重要,这些融合蛋白共同定义了结合位点以结合所述靶细胞因子。没有所述连接物时,所述两个结合结构域可能在空间上受到约束而不能形成最优结合位点(图1B)。本发明的各种不同特点和方面将在下文中更详细讨论。

[0039] I. 融合蛋白

[0040] 示例性的融合蛋白可以包含:细胞因子、细胞因子受体或免疫调节蛋白的细胞外结构域、跨膜结构域或细胞内结构域的第一部分;氨基酸连接物;以及下述至少一者:细胞因子、细胞因子受体或免疫调节蛋白的细胞外结构域、跨膜结构域或细胞内结构域的第二部分;免疫球蛋白(Ig)铰链区;和免疫球蛋白(Ig)Fc结构域。例如,所公开的融合蛋白可以以N-端到C-端的方向包含:细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分;氨基酸连接物;免疫球蛋白(Ig)铰链区;和免疫球蛋白(Ig)Fc结构域;其中所述连接物包含约5至约40个氨基酸残基。

[0041] 示例性的细胞因子包括IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-3、IL-5、GM-CSF、IL-6、IL-11、G-CSF、IL-12、LIF、OSM、IL-10、IL-20、IL-14、IL-16、IL-17、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、CD154、LT- β 、TNF- α 、TNF- β 、4-1BBL、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK、TRANCE、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、Epo、Tpo、Flt-3L、SCF、M-CSF和MSP。

[0042] 当在本文中使用时,“免疫调节”蛋白是指调节对象的免疫系统的功能的蛋白质。免疫调节蛋白可以例如调节例如B-细胞、T细胞的功能和/或抗体的生产。示例性的免疫调节蛋白包括检查点抑制剂。示例性的免疫调节蛋白可以包括例如CTLA-4、CD70、IL-2、

CD40L、OX40L、IL-12、IL-7、PD-1或PD-L1或调节其活性的任何蛋白质。其他示例性的免疫调节蛋白可以包括抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0043] 当在本文中使用时,“细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分”是指细胞因子受体的任何细胞外结构域或细胞因子受体的细胞外结构域的片段,其能够结合到靶细胞因子。应该理解,细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分也设想了所述细胞外结构域的包含结合结构域的部分,所述结合结构域单独地或与第二个结合结构域(例如在二聚体融合蛋白的情况下)相组合能够结合到靶细胞因子。

[0044] 示例性的细胞因子受体包括I型细胞因子受体(例如GM-CSF受体、G-CSF受体、I型IL受体、Epo受体、LIF受体、CNTF受体或TPO受体)、II型细胞因子受体(例如IL-10受体、IFN- α 受体(例如IFNAR1或IFNAR2)、IFN- β 受体、IFN- γ 受体(例如IFNGR1或IFNGR2)、趋化因子受体(例如CC趋化因子受体、CXC趋化因子受体、CX3C趋化因子受体或XC趋化因子受体)、肿瘤坏死因子超家族受体(TNFR;例如TNFRSF5/CD40、TNFRSF8/CD30、TNFRSF7/CD27、TNFRSF1A/TNFR1/CD120a或TNFRSF1B/TNFR2/CD120b)、TGF β 超家族受体(例如TGF β I型受体或TGF β II型受体)或免疫球蛋白(Ig)超家族受体(例如白介素-1受体、CSF-1R、PDGFR(例如PDGFRA或PDGFRB)或SCFR)。优选的细胞因子受体包括二聚体细胞因子受体例如TGF β 超家族受体例如人类TGF β II型受体(T β RII)。在某些实施方式中,所述细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分是人类IL-10R例如人类IL-10RA的细胞外结构域的可溶性部分,例如包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有高于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列,和/或其包含结合到IL-10的结合结构域的片段。

[0045] 所述细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分保留了它结合其天然配体的能力。在某些实施方式中,所述细胞外结构域的可溶性部分当与全长细胞因子受体相比时,保留了至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的对其天然配体的结合能力。

[0046] 在某些实施方式中,所述融合蛋白可以包含例如下述一者或多者:T β RII, TGF- β , CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, IL-15, CD154, CD70, TNF- α , CD86, CD137, CD137L, BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, GM-CSF, MAGE, NY-ESO-1, 血管抑素, 内皮抑素, 乙酰胆碱, 干扰素- γ , DKK1/Wnt, p53, OX40L, GM-CSF, IL-15受体融合蛋白, GITRL, CD40L, CD70, 分泌的鞭毛蛋白, IL-12, 胸苷激酶, 抗PD-1抗体重链或轻链, 抗PD-L1抗体重链或轻链和抗CTLA-4抗体重链或轻链, 或其功能性片段。

[0047] 当在本文中使用时,术语“免疫球蛋白(Ig)铰链区”是指通常连接免疫球蛋白重链恒定区的CH1和CH2结构域的氨基酸序列。Ig铰链区可能包括例如能够与另一个蛋白链中的半胱氨酸残基形成二硫键的一个或多个半胱氨酸残基。当在本文中使用时,术语“免疫球蛋白(Ig)Fc结构域”是指免疫球蛋白重链恒定区的能够结合到Fc受体的片段。Ig Fc结构域可能包括例如免疫球蛋白(Ig)CH2和CH3结构域。Ig CH1、CH2和CH3结构域之间的边界在本领域中是公知的,并且可以在例如PROSITE数据库(可以在万维网上prosite.expasy.org网站处获得)中找到。为清楚起见,在图2中提供了人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM CH1和CH2结构域的氨基酸序列的比对。

[0048] 在某些实施方式中,所述Ig铰链区选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和IgM铰链区,并且所述Ig Fc结构域选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE和

IgM Fc结构域。在某些实施方式中,所述Ig铰链区和Fc结构域一起包含选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述Ig铰链区和Fc结构域一起包含与选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的序列具有大于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0049] 所述氨基酸连接物可以允许融合蛋白的配体结合部分(例如细胞因子受体)最优地结合到配体(例如细胞因子),提供融合蛋白的两种或更多种组分(例如二聚体细胞因子的两个亚基)的时空共定位,优化从表达载体(例如病毒载体)的表达,降低免疫原性,或提供切割位点以允许释放出所述融合蛋白的组分。

[0050] 所述氨基酸连接物可以包含例如约5至约15个、约5至约20个、约5至约25个、约5至约30个、约5至约35个、约5至约40个、约10至约15个、约10至约20个、约10至约25个、约10至约30个、约10至约35个、约10至约40个、约15至约20个、约15至约25个、约15至约30个、约15至约35个或约15至约40个氨基酸残基。所述连接物中的氨基酸可以是天然存在的氨基酸或修饰的氨基酸。

[0051] 在某些实施方式中,所述氨基酸连接物序列源自于内源人类蛋白例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM、白蛋白或酪蛋白。在某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含免疫球蛋白(Ig)CH1结构域例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM CH1结构域的C-端部分,例如约5至约40个氨基酸。在某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述氨基酸连接物包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有高于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的序列。

[0052] 蛋白质或多肽如果包含与参比蛋白质或多肽的野生型氨基酸序列的全部或相应部分基本上相似的氨基酸序列,则“源自于”所述参比蛋白质或多肽。在某些实施方式中,源自于野生型蛋白质或多肽的蛋白质或多肽相对于所述野生型蛋白质或多肽可能具有一个或多个氨基酸替换。例如,设想了源自于野生型蛋白质或多肽的蛋白质或多肽可能与所述野生型蛋白质或多肽具有高于70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。此外,设想了源自于野生型蛋白质或多肽的蛋白质或多肽相对于所述野生型蛋白质或多肽可能含有一个或多个保守替换。当在本文中使用时,术语“保守替换”是指结构相似的氨基酸的替换。例如,保守替换可以包括在下述组内的替换:Ser和Cys;Leu、Ile和Val;Glu和Asp;Lys和Arg;Phe、Tyr和Trp;和Gln、Asn、Glu、Asp和His。保守替换也可以通过BLAST(基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool))算法、BLOSUM替换矩阵(例如BLOSUM 62矩阵)或PAM替换:p矩阵(例如PAM 250矩阵)来确定。

[0053] 在某些实施方式中,所述氨基酸连接物序列源自于细胞因子、信号分子、免疫调节蛋白或肽或生物活性肽。

[0054] 进一步考虑的连接物序列包括富含甘氨酸和丝氨酸的连接物例如 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:49)。其他示例性的连接物序列描述在例如George等,(2003)PROTEIN ENGINEERING 15: 871-879和美国专利5,482,858和5,525,491中。

[0055] 在某些实施方式中,所述氨基酸连接物可以包含切割位点例如蛋白水解或非蛋白水解切割位点。在某些实施方式中,所述蛋白水解切割位点被存在于特定组织、细胞器或细胞内区室中的蛋白酶切割。在某些实施方式中,所述连接物包含蛋白水解切割位点和两个半胱氨酸残基,其在蛋白水解切割后产生二硫键连接。在某些实施方式中,所述蛋白水解切割位点被选自基质金属蛋白酶(MMP)、弗林蛋白酶、PC1、PC2、PC3、组织蛋白酶B、蛋白酶3和半胱天冬酶3的蛋白酶切割。在某些实施方式中,所述切割位点是被存在于真核细胞的内质网或高尔基体中的蛋白酶切割的蛋白水解切割位点。在某些实施方式中,所述蛋白水解切割位点是弗林蛋白酶切割位点。弗林蛋白酶是一种广泛表达并集中在高尔基体的蛋白酶,它识别共有序列 RX_1X_2R (SEQ ID NO:50),其中 X_1 是任何氨基酸并且 X_2 是Lys或Arg,并在最后一个Arg之后切割。弗林蛋白酶在切割通过高尔基体运输的蛋白质的前肽中发挥生物学作用。因此,在某些实施方式中,所述蛋白水解切割位点是包含序列 RX_1X_2R (SEQ ID NO:50)的弗林蛋白酶切割位点,其中 X_1 是任何氨基酸并且 X_2 是Lys或Arg,例如包含序列RAKR (SEQ ID NO:51)的弗林蛋白酶切割位点。

[0056] 在某些实施方式中,所述Ig Fc、Ig铰链区和Ig CH1结构域源自于单一免疫球蛋白。

[0057] 在某些实施方式中,所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在某些实施方式中,所公开的融合蛋白包含与选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58的序列具有高于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0058] 序列同一性可以以本领域技术范围之内的各种不同方式来确定,例如使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。使用被程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx利用的算法的BLAST (基本局部比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool)) 分析 (Karlin等,(1990) PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 87:2264-2268;Altschul,(1993) J.MOL.EVOL.36,290-300; Altschul等,(1997) NUCLEIC ACIDS RES.25:3389-3402,通过参考并入),被定制用于序列相似性搜索。对于搜索序列数据库中的基本问题的讨论,参见Altschul等,(1994) NATURE GENETICS 6:119-129,其全部通过参考并入。本领域技术人员可以为测量比对,包括为了在待比较的序列的全长上获得最大对齐所需的任何算法,确定适合的参数。用于直方图、描述、比对、期望值 (即用于针对数据库序列报告匹配的统计学显著性阈值)、截止值、矩阵和筛选器的搜索参数在缺省设置处。blastp、blastx、tblastn和tblastx使用的缺省评分矩阵

是BLOSUM62矩阵 (Henikoff等, (1992) PROC.NATL.ACAD.SC_I.USA 89:10915-10919,全部通过参考并入)。四个blastn参数可以如下调整:Q=10(空隙生成罚分);R=10(空隙扩展罚分);wink=1(在沿着查询的每个wink.sup.th位置处产生词命中率);和gapw=16(设置在其中产生带有空隙的比对的窗口宽度)。等效的Blastp参数设置可以是Q=9;R=2;wink=1;和gapw=32。搜索也可以使用NCBI(National Center for Biotechnology Information)BLAST高级选项参数来进行(例如:-G,开启空隙的成本[Integer]:default=5(对于核苷酸来说)/11(对于蛋白质来说);-E,扩展空隙的成本[Integer]:default=2(对于核苷酸来说)/1(对于蛋白质来说);-q,核苷酸错配的罚分[Integer]:default=-3;-r,核苷酸匹配的奖励[Integer]:default=1;-e,期望值[Real]:default=10;-W,词长[Integer]:default=11(对于核苷酸来说)/28(对于megablast来说)/3(对于蛋白质来说);-y,以比特为单位的blast延长的衰减(X):default=20(对于blastn来说)/7(对于其他来说);-X,带有空隙的比对(以比特为单位)的X衰减值:default=15(对于所有程序来说),不适用于blastn;和-Z,带有空隙的比对(以比特为单位)的最终X衰减值:50(对于blastn来说),25(对于其他来说))。也可以使用用于成对蛋白质比对的ClustalW(缺省参数可以包括例如Blosom62矩阵和空隙开启罚分=10和空隙扩展罚分=0.1)。可以在GCG软件包10.0版中获得的序列之间的Bestfit比较使用DNA参数GAP=50(空隙生成罚分)和LEN=3(空隙扩展罚分),并且在蛋白质比较中的等效设置是GAP=8和LEN=2。

[0059] 一方面,本发明提供了一种包含两个融合蛋白的细胞因子结合蛋白,其中每个融合蛋白以N-端到C-端的方向包含:细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分;氨基酸连接物;免疫球蛋白(Ig)铰链区;和免疫球蛋白(Ig)Fc结构域;其中所述连接物包含约5至约40个氨基酸残基,其中所述两个融合蛋白共价连接在一起,并且其中所述两个细胞外结构域一起定义用于细胞因子的结合位点。

[0060] 所述细胞因子结合蛋白可以包含共价连接在一起的两个上述融合蛋白,其中每个融合蛋白包含细胞因子受体的细胞外结构域,并且其中所述两个细胞外结构域一起定义用于细胞因子的结合位点。所述融合蛋白可以例如通过每个融合蛋白的Ig铰链区中的半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。在某些实施方式中,所述单体或多聚体(例如二聚体)融合蛋白与天然的全长细胞因子受体相比,保留了至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的靶配体结合能力。

[0061] 在某些实施方式中,本发明的细胞因子结合蛋白以200nM、100nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、50pM、25pM或更低的 K_D 结合细胞因子。在某些实施方式中,本发明的细胞因子结合蛋白以200nM至100nM、200nM至20nM、200nM至10nM、200nM至5nM、200nM至1nM、200nM至50pM、200nM至25pM、100nM至20nM、100nM至10nM、100nM至5nM、100nM至1nM、100nM至50pM、100nM至25pM、20nM至10nM、20nM至5nM、20nM至1nM、20nM至50pM、20nM至25pM、10nM至5nM、10nM至1nM、10nM至50pM、10nM至25pM、5nM至1nM、5nM至50pM、5nM至25pM、1nM至50pM、1nM至25pM或50pM至25pM的 K_D 结合细胞因子。在某些实施方式中,本发明的细胞因子结合蛋白以200nM、100nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、50pM、25pM或更低的 K_D 结合IL-10。在某些实施方式中,本发明的细胞因子结合蛋白以200nM至100nM、200nM至20nM、200nM至10nM、200nM至5nM、200nM至1nM、200nM至50pM、200nM至25pM、100nM至20nM、100nM至10nM、100nM至5nM、100nM至1nM、100nM至50pM、

100nM至25pM、20nM至10nM、20nM至5nM、20nM至1nM、20nM至50pM、20nM至25pM、10nM至5nM、10nM至1nM、10nM至50pM、10nM至25pM、5nM至1nM、5nM至50pM、5nM至25pM、1nM至50pM、1nM至25pM或50pM至25pM的 K_D 结合IL-10。 K_D 值可以通过本领域中公知的方法包括表面等离子体共振或生物层干涉测量方法来确定。

[0062] 本发明的示例性融合蛋白包括包含选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58的氨基酸序列的蛋白。为清楚起见,这些蛋白质的各个元件的序列和所述各个元件包括细胞因子受体的细胞外结构域的可溶性部分、氨基酸连接物、Ig铰链区和Ig Fc结构域的序列所源自的蛋白质,阐述在表1中。

[0063] 表1

[0064]

| 蛋白质 | 受体来源 受体SEQ ID | 连接物来源 连接物SEQ ID | Ig铰链/ Ig Fc来源 Ig铰链/ Ig Fc SEQ ID |
|---------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| SEQ ID NO: 22 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgG1 CH1 结构域 SEQ ID NO: 1 | IgG1 SEQ ID NO: 13 |
| SEQ ID NO: 55 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgG1 CH1 结构域 SEQ ID NO: 53 | IgG1 SEQ ID NO: 13 |
| SEQ ID NO: 56 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgG1 CH1 结构域 SEQ ID NO: 54 | IgG1 SEQ ID NO: 13 |
| SEQ ID NO: 58 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgG1 CH1 结构域 SEQ ID NO: 57 | IgG1 SEQ ID NO: 13 |
| SEQ ID NO: 23 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgG2 CH1 结构域 SEQ ID NO: 2 | IgG2 SEQ ID NO: 14 |
| SEQ ID NO: 24 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgG3 CH1 结构域 SEQ ID NO: 3 | IgG3 SEQ ID NO: 15 |
| SEQ ID NO: 25 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgG4 CH1 结构域 SEQ ID NO: 4 | IgG4 SEQ ID NO: 16 |
| SEQ ID NO: 26 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgA1 CH1 结构域 SEQ ID NO: 5 | IgA1 SEQ ID NO: 17 |
| SEQ ID NO: 27 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgA2 CH1 结构域 SEQ ID NO: 6 | IgA2 SEQ ID NO: 18 |
| SEQ ID NO: 28 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgD CH1 结构域 SEQ ID NO: 7 | IgD SEQ ID NO: 19 |
| SEQ ID NO: 29 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgE CH1 结构域 SEQ ID NO: 8 | IgE SEQ ID NO: 20 |
| SEQ ID NO: 30 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | IgM CH1 结构域 SEQ ID NO: 9 | IgM SEQ ID NO: 21 |
| SEQ ID NO: 31 | IL-10RA | 白蛋白 | IgG1 |

[0065]

| 蛋白质 | 受体来源 受体SEQ ID | 连接物来源 连接物SEQ ID | Ig 铰链/ Ig Fc来源 Ig 铰链/ Ig Fc SEQ ID |
|---------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 13 |
| SEQ ID NO: 32 | IL-10RA SEQ ID NO: 12 | 酪蛋白 SEQ ID NO: 11 | IgG1 SEQ ID NO: 13 |
| SEQ ID NO: 33 | mIL-10RA SEQ ID NO: 34 | mIgG1 CH1结构域 SEQ ID NO: 35 | mIgG1 SEQ ID NO: 36 |

[0066] 表2

[0067]

| 蛋白质序列 | 核酸序列 |
|--------------|--------------|
| SEQ ID NO:22 | SEQ ID NO:37 |
| SEQ ID NO:23 | SEQ ID NO:38 |
| SEQ ID NO:24 | SEQ ID NO:39 |
| SEQ ID NO:25 | SEQ ID NO:40 |
| SEQ ID NO:26 | SEQ ID NO:41 |
| SEQ ID NO:27 | SEQ ID NO:42 |
| SEQ ID NO:28 | SEQ ID NO:43 |
| SEQ ID NO:29 | SEQ ID NO:44 |
| SEQ ID NO:30 | SEQ ID NO:45 |
| SEQ ID NO:31 | SEQ ID NO:46 |
| SEQ ID NO:32 | SEQ ID NO:47 |

[0068] II. 融合蛋白生产

[0069] 用于生产本发明的融合蛋白的方法在本领域中是已知的。例如,编码所公开的融合蛋白的DNA分子可以使用本文中提供的序列信息化学合成。合成的DNA分子可以被连接到其他适合的核苷酸序列,包括例如表达控制序列,以产生编码所需融合蛋白的常规基因表达构建体。生产定义的基因构建体在本领域的常规技术范围之内。编码SEQ ID NO:22-32的融合蛋白的示例性核酸序列SEQ ID NO:37-47,可以在表2中找到。

[0070] 编码所需融合蛋白的核酸可以被并入(连接)到表达载体中,其可以通过常规的转染或转化技术引入到宿主细胞中。示例性的宿主细胞是大肠杆菌细胞、中华仓鼠卵(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人类肝细胞癌细胞(例如Hep G2)和骨髓瘤细胞。转化的宿主细胞可以在允许所述宿主细胞表达编码所需融合蛋白的基因的条件下生长。

[0071] 具体的表达和纯化条件将随着所使用的表达系统而变。例如,如果基因将在大肠杆菌中表达,首先通过将所述工程化的基因放置在适合的细菌启动子例如Trp或Tac和原核信号序列的下游,将它克隆在表达载体中。所述表达的分泌蛋白积累在折射或包含体中,并且可以在通过弗氏压碎器或超声处理破碎细胞后收获。然后通过本领域中已知的方法将所述折射体溶解,并将蛋白质重新折叠并切开。

[0072] 如果所述工程化基因将在真核宿主细胞例如CHO细胞中表达,首先将它插入到含

有适合的真核启动子、分泌信号、多聚A序列和终止密码子的表达载体中,并且任选地可以含有增强子和各种不同的内含子。所述基因构建体可以使用常规技术引入到真核宿主细胞中。

[0073] 包含所公开的融合蛋白的多肽可以通过将用编码这些蛋白的表达载体转染的宿主细胞在允许所述多肽表达的条件下生长(培养)来生产。在表达后,所述多肽可以使用本领域中已知的技术收获并纯化或分离,例如亲和和标签如蛋白A、蛋白G、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和组氨酸标签。

[0074] III. 表达载体

[0075] 通过将编码感兴趣的融合蛋白的基因并入到适合的表达载体中,可以将所述感兴趣的融合蛋白在感兴趣的细胞中表达。当在本文中使用时,“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述多核苷酸包含可操作连接到待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含用于表达的足够的顺式作用元件,用于表达的其他元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域中已知的所有表达载体,例如并入有感兴趣的重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如裸露的或包含在脂质体中)、反转录转座子(例如piggyBac、“睡美人”)和病毒(例如慢病毒、反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0076] 在某些实施方式中,所公开的表达载体是病毒载体。术语“病毒载体”和“病毒”在本文中可互换使用,是指没有蛋白质合成或能量产生机制的任何专性细胞内寄生物。病毒基因组可以是RNA或DNA。可用于本发明的实践的病毒包括重组修饰的有包膜或无包膜DNA和RNA病毒,优选地选自杆状病毒科、细小病毒科、小核糖核酸病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科或腺病毒科。所述病毒可以通过重组DNA技术修饰以包含外源转入基因的表达,并且可以被工程化改造成复制缺陷型、条件复制型或复制型。利用每个亲本载体性质的有利要素的嵌合病毒载体(参见例如Feng等,(1997)NATURE BIOTECHNOLOGY 15:866-870)也可能在本发明的实践中有用。尽管利用来自于待治疗物种的病毒通常是有利的,但在某些情况下使用源自于具有有利的病原学特征的不同物种的载体可能是有利的。例如,用于人类基因疗法的马疱疹病毒载体描述在PCT公开号W0 98/27216中。所述载体被描述为可用于治疗人类,因为所述马病毒对于人类不致病。同样地,绵羊腺病毒载体可用于人类基因疗法,因为它们据宣称避免了针对人类腺病毒载体的抗体。这些载体描述在PCT公开号W0 97/06826中。

[0077] 在某些实施方式中,所述病毒载体是腺病毒。腺病毒是中等大小(90-100nm)、无包膜(裸露)、二十面体病毒,由核衣壳和双链线性DNA基因组构成。腺病毒在哺乳动物细胞的核中利用宿主的复制机制来复制。术语“腺病毒”是指腺病毒属中的任何病毒,包括但不限于人类、牛、绵羊、马、狗、猪、鼠和猿猴腺病毒亚属。具体来说,人类腺病毒包括A-F亚属及其个体血清型,所述个体血清型和A-F亚属包括但不限于人类腺病毒1、2、3、4、4a、5、6、7、8、9、10、11(Ad11a和Ad11p)、12、13、14、15、16、17、18、19、19a、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、34a、35、35p、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48和91型。优选的是源自于人类腺病毒2和5型的载体。除非另有陈述,否则所有腺病毒5型的核苷酸编号是相对于在本文中在SEQ ID NO:52中描绘的NCBI参比序列AC_000008.1。

[0078] 腺病毒复制周期具有两个阶段:早期阶段,在此期间4个转录单位(E1、E2、E3和E4)表达;以及晚期阶段,其在病毒DNA合成开始之后发生,并且在此期间晚期转录本主要从主

要晚期启动子 (MLP) 表达。所述晚期信息编码大多数病毒的结构蛋白。E1、E2和E4的基因产物负责转录激活、细胞转化、病毒DNA复制以及其他病毒功能,并且是病毒生长必需的。

[0079] 术语“可操作连接”是指多核苷酸元件以有功能的关系连接。当核酸序列处于与另一个核酸序列功能上相关时,它是“可操作连接”的。例如,如果启动子或增强子影响基因的转录,则它被可操作连接到所述基因。可操作连接的核苷酸序列通常是毗连的。然而,由于增强子通常在与启动子相隔几千碱基时起作用并且内含子序列可能具有可变的长度,因此某些多核苷酸元件可能是可操作连接的但不直接位于侧翼,并且甚至可能从不同的等位基因或染色体反式起作用。

[0080] IV. 融合蛋白修饰

[0081] 当用作治疗剂时,融合蛋白可以被优化(例如亲和力成熟)以改善生物化学特性包括亲和性和/或特异性,改善生物物理性质包括聚集、稳定性、沉淀和/或非特异性相互作用,和/或降低免疫原性。亲和力成熟程序在本领域的常规技术范围之内。例如,可以通过DNA改组、链改组、CDR改组、随机突变和/或定点突变,将多样性引入到所公开的融合蛋白中。

[0082] 通常,优化的融合蛋白具有与它所源自的未优化的(或亲本)融合蛋白至少相同或基本上相同(例如至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)的对配体的亲和性。优选地,优化的融合蛋白与亲本融合蛋白相比时具有更高的对配体的亲和性。

[0083] 融合蛋白(例如亲本和优化的变体)可以被工程化改造以含有某些具有特定效应功能(例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC))的恒定(即Fc)区。人类恒定区在本领域中是已知的。

[0084] 此外,如果所述融合蛋白被用作治疗剂,可以使用标准的体外偶联化学方法将它缀合到效应剂例如小分子毒素或放射性核素。如果所述效应剂是多肽,则所述抗体可以被化学缀合到所述效应物或作为融合蛋白联结到所述效应物。融合蛋白的构建在本领域的常规技术范围之内。

[0085] V. 治疗方法

[0086] 上述融合蛋白或表达载体可用于治疗各种不同的医学指征。在某些实施方式中,上述融合蛋白或表达载体可用于治疗由细胞因子例如IL-10介导的医学指征。例如,所述融合蛋白和表达载体可用于治疗各种不同的癌症或炎症疾病。

[0087] 当在本文中使用时,“治疗”意味着在对象中,例如在哺乳动物中,例如在人类中治疗疾病。这包括:(a)抑制所述疾病,即制止它的发展;和(b)减轻所述疾病,即引起所述疾病状态的减退。当在本文中使用时,术语“受试者”和“患者”是指将被通过本文描述的方法和组合物治疗的生物体。这些生物体优选地包括但不限于哺乳动物(例如鼠类、猿猴、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等),更优选地包括人类。

[0088] 在某些实施方式中,本文中公开的融合蛋白和表达载体可用于治疗各种不同的癌症。将癌细胞暴露于治疗有效量的所述融合蛋白或表达载体,以便抑制或减少所述癌细胞的增殖。在某些实施方式中,向癌细胞施用治疗有效量的融合蛋白或表达载体,将所述细胞中的IL-10活性降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。IL-10活性可以通过实施例2中所描述的Western印迹来测定。在某些实施方式中,所公开的融合蛋白或表达载体可用于在受试者(例如人类患者,也被称为人类受试

者)中抑制肿瘤生长,这可以通过向所述受试者施用有效量的所述融合蛋白或表达载体来实现。在某些实施方式中,向受试者施用有效量的融合蛋白或表达载体将该对象中的肿瘤负荷降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0089] 癌症的实例包括实体肿瘤、软组织肿瘤、造血系肿瘤和转移病变。造血系肿瘤的实例包括白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、B-细胞、T-细胞或FAB ALL、急性髓性白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)例如转化的CLL、弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓增生异常综合征(MDS)、淋巴瘤、霍奇金病、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤或莱特尔综合征(莱特尔转化)。实体肿瘤的实例包括各种不同器官系统的恶性肿瘤例如肉瘤、腺癌和上皮癌,例如影响头颈部(包括咽)、甲状腺、肺(小细胞或非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺、淋巴、胃肠(例如口腔、食道、胃、肝、胰腺、小肠、结肠和直肠、肛管)、生殖器和泌尿生殖道(例如肾、尿道上皮、膀胱、卵巢、子宫、宫颈、子宫内膜、前列腺、睾丸)、CNS(例如神经或神经胶质细胞例如成神经细胞瘤或神经胶质瘤)或皮肤(例如黑素瘤)的恶性肿瘤。

[0090] 在某些实施方式中,所述癌症选自黑素瘤、皮肤的鳞状细胞癌、基底细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肛门癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、小细胞肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、胃食管癌、结肠直肠癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、肝癌、肝细胞癌、胆管癌、脑和中枢神经系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌(例如甲状旁腺上皮癌)、子宫内膜癌、神经内分泌癌、淋巴瘤(例如霍奇金和非霍奇金)、白血病、梅克尔细胞癌、胃肠道间质肿瘤、多发性骨髓瘤、子宫癌、肉瘤、肾癌、眼癌、胰腺癌和生殖细胞癌(例如卵巢生殖细胞癌)。在某些实施方式中,所述癌症可以选自白血病、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、脑癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌和白血病。在某些实施方式中,所述癌症选自白血病、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、头颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌。

[0091] 在某些实施方式中,本公开的融合蛋白或表达载体在需要的受试者(例如具有炎性病症的受试者)中施用以降低一种或多种细胞因子的水平。在某些实施方式中,所公开的融合蛋白或表达载体可用于在受试者(例如人类受试者)中治疗炎性病症,这可以通过向所述受试者施用有效量的所述融合蛋白或表达载体来实现。

[0092] 当在本文中使用时,炎性病症是完全或部分地以患者中的炎症或炎性反应为特征的疾病或病症。可以使用本发明的融合蛋白或表达载体治疗的炎性病症可以例如根据受影响的原发组织、所述病症隐含的作用机制或免疫系统的调控错误或过度活跃的部分来表征。在某些实施方式中,可以治疗的炎性病症的实例包括肺的炎症(例如哮喘、成人呼吸窘迫综合征、支气管炎、肺部炎症、肺纤维化和囊性纤维化)、关节的炎症(例如类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风性关节炎和其他关节炎病症)、结缔组织的炎症、眼的炎症(例如葡萄膜炎(包括虹膜炎)、结膜炎、巩膜炎和干燥性角膜结膜炎)、鼻的炎症、肠的炎症(例如克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、炎性肠综合征和远端直肠炎)、肾的炎症(例如肾小球肾炎、间质性肾炎、狼疮性肾炎、韦格纳氏病继发的肾炎、急性肾炎继发的急性肾衰竭、肺出血肾炎综合征、阻塞后综合征和肾小管缺血)、肝的炎症(例如肝炎(由病毒感染、自体免疫反应、药物治疗、毒素、环境因子引起或作为原发性障碍的继发结果)、肥胖症、胆道闭锁、原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎)、皮肤的炎症(例如银屑病、湿疹和皮炎例如湿疹性皮炎、特应性和脂溢性皮炎、过敏性或刺激性接

触性皮炎、干裂性湿疹、光过敏性皮炎、光毒性皮炎、植物日光性皮炎、放射性皮炎、和瘀滞性皮炎)、中枢神经系统的炎症(例如多发性硬化症和神经变性疾病例如阿兹海默氏病、帕金森氏症或与HIV感染相关的痴呆症)、血管系统的炎症(例如冠状动脉梗塞损伤、外周血管疾病、心肌炎、脉管炎、狭窄血管再生、动脉粥样硬化和与II型糖尿病相关的血管疾病)、内分泌系统的炎症(例如自体免疫性甲状腺炎(桥本病)、I型糖尿病、与II型糖尿病相关的肝脏和脂肪组织中的炎症和肾上腺皮质的急性和慢性炎症)、心脏的炎症或脂肪组织的炎症。本公开设想了某些炎性病症涉及多种组织中的炎症。此外,本公开设想了某些炎性病症可能落于多个类别中。在某些实施方式中,所述炎性病症是自体免疫疾病。示例性的自体免疫疾病包括但不限于类风湿性关节炎、银屑病(包括斑块型银屑病)、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、多发性硬化症、狼疮、秃头症、自体免疫性胰腺炎、乳糜泻、白塞病、库欣综合征和格雷夫病。在某些实施方式中,所述炎性病症是类风湿性障碍。示例性的类风湿性障碍包括但不限于类风湿性关节炎、青少年关节炎、粘液囊炎、脊椎炎、痛风、硬皮病、斯提耳氏病和脉管炎。应该指出,病症的某些类别交叠。例如,类风湿性关节炎是炎性类风湿性障碍、炎性关节障碍和自体免疫障碍。

[0093] 当在本文中使用时,术语“有效量”是指足以实现有益或所需结果的活性组分的量(例如本发明的融合蛋白或表达载体的量)。有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用,并且不打算限于特定配方或施用途径。

[0094] 在某些实施方式中,融合蛋白的治疗有效量在0.1mg/kg至100mg/kg的范围内,例如1mg/kg至100mg/kg、1mg/kg至10mg/kg、1mg/kg至5mg/kg、10mg/kg、7.5mg/kg、5mg/kg或2.5mg/kg。在某些实施方式中,表达载体例如重组病毒的治疗有效量在 10^2 至 10^{15} 噬斑形成单位(pfu)的范围内,例如 10^2 至 10^{10} 、 10^2 至 10^5 、 10^5 至 10^{15} 、 10^5 至 10^{10} 或 10^{10} 至 10^{15} 噬斑形成单位。施用的量取决于多种变量,例如待治疗的疾病或指征的类型和程度、患者的总体健康、所述融合蛋白或表达载体的体内效能、药物配方和施用途径。初始剂量可以提高到超过上限水平,以便快速获得所需的血液水平或组织水平。或者,初始剂量可以低于最适值,并且可以在治疗过程中逐步提高每日剂量。人类剂量可以例如在被设计从0.5mg/kg运行到20mg/kg的常规I期剂量递增研究中进行优化。给药频率可以随着多种因素而变,例如施用途径、剂量、抗体的血清半衰期和待治疗的疾病。示例性的给药频率是每日一次、每周一次和每两周一次。优选的施用途径是肠胃外,例如静脉内输注。基于融合蛋白或表达载体的药物的配制在本领域的常规技术范围之内。在某些实施方式中,将融合蛋白或表达载体冷冻干燥,然后在施用时在缓冲盐水中重构。

[0095] 对于治疗使用来说,优选地将融合蛋白或表达载体与可药用载体组合。当在本文中使用时,“可药用载体”意味着适合与人类和动物的组织相接触使用而没有过量毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的缓冲剂、载体和赋形剂。所述载体在与配方的其他成分相容并且对接受者无害的意义上是“可接受的”。可药用载体包括与药物施用相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、包衣、等渗和吸收延迟剂等。这些介质和药剂用于制药活性物质的用途,在本领域中是已知的。

[0096] 含有本文公开的融合蛋白或表达载体的药物组合物可以以剂量单元形式存在,并且可以通过任何适合的方法制备。药物组合物应该被配制与它计划的施用途径相容。施用途径的实例是静脉内(IV)、真皮内、吸入、眼内、鼻内、透皮、表面、透粘膜和直肠施用。

[0097] 融合蛋白的优选施用途径是IV输注。可以通过制药领域中已知的方法来制备本发明的制剂。例如参见《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版(Mack Publishing Company,1990)。适合于肠胃外施用的配方组分包括无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂,抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯,抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠,螯合剂例如EDTA,缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及张度调节剂例如氯化钠或右旋糖。

[0098] 对于静脉内施用,适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。所述载体应该在制造和储存的条件下稳定,并且应该被防腐以对抗微生物。所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其适合的混合物。

[0099] 药物配方优选是无菌的。灭菌可以通过任何适合的方法来实现,例如通过无菌过滤膜过滤。在所述组合物被冷冻干燥的情况下,过滤除菌可以在冷冻干燥和重构之前或之后进行。在某些实施方式中,本发明的递送介质(例如重组病毒)和/或治疗剂与检查点抑制剂例如抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体相组合施用。示例性的抗PD-1抗体包括例如纳武单抗(**Opdivo**®, Bristol-Myers Squibb Co.)、派姆单抗(**Keytruda**®, Merck Sharp&Dohme Corp.)、PDR001(Novartis Pharmaceuticals)和匹迪珠单抗(CT-011, Cure Tech)。示例性的抗PD-L1抗体包括例如阿特珠单抗(**Tecentriq**®, Genentech)、德瓦鲁单抗(AstraZeneca)、MEDI4736、阿维鲁单抗(**Bavencio**®, EMD Serono)和BMS 936559(Bristol Myers Squibb Co.)。

[0100] 当在本文中使用时,术语“相组合”施用被理解为意味着在受试者被所述障碍困扰的过程中将两种(或更多种)不同治疗递送到所述受试者,使得在某个时间点所述治疗对所述受试者的效果重叠。在某些实施方式中,一种治疗的递送在第二种治疗的递送开始时仍在进行,使得在施用方面存在交叠。这在本文中有时被称为“同时”或“并行递送”。在其他实施方式中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的某些实施方式中,治疗由于组合施用而更加有效。例如,所述第二种治疗更加有效,例如使用更少的第二种治疗观察到等同的效果,或者与第二种治疗在不存在第一种治疗的情况下施用的情形中看到的相比,所述第二种治疗以更大的程度减轻症状,或者在使用所述第一种治疗时观察到类似的情况。在某些实施方式中,递送使得症状或与所述障碍相关的其他参数的降低超过在递送一种治疗而不存在另一种治疗的情况下所观察到的。所述两种治疗的效果可以是部分累加、完全累加或高于累加的。所述递送可以使得当第二种治疗被递送时所递送的第一种治疗的效果仍然可检测。

[0101] 在整个本说明书中,在组合物、装置和系统被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,或者在过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤的情况下,设想了此外还存在基本上由所叙述的组分构成或由所叙述的组分构成的本发明的组合物、装置和系统,并且存在基本上由所叙述的过程步骤构成或由所叙述的过程步骤构成的符合本发明的过程和方法。

[0102] 在本申请中,在要素或组分被称为是包含在所叙述的要素或组分的名单中和/或选自所述名单的情况下,应该理解所述要素或组分可以是所叙述的要素或组分中的任一

者,或者所述要素或组分可以选自所叙述的要素或组分中的两者或更多者。

[0103] 此外,应该理解,本文中描述的组合物或方法的要素和/或特点可以以各种不同的方式组合而不背离本发明的精神和范围,不论在本文中是明确说明还是暗示的。例如,在指称特定病毒的情况下,该病毒可用于本发明的组合物的各种不同实施方式和/或本发明的方法中,除非从上下文另有理解。换句话说,在本申请中,实施方式以能够书写并绘制出清楚且简明的申请的方式进行描述和描绘,但计划并且应该认识到实施方式可以进行各种不同的组合或拆分,而不背离本文的教授和发明。例如,应该认识到本文描述和描绘的所有特点可以适用于本文描述和描绘的本发明的所有方面。

[0104] 应该理解,表述“中的至少一者”各个地包括在所述表述后叙述的每个物体和所叙述的物体中的两者或更多者的各种不同组合,除非从上下文和使用中另有理解。与三个或更多个叙述物体相结合的表述“和/或”应该被理解为具有相同的意义,除非从上下文另有理解。

[0105] 术语“包括”、“具有”或“含有”、包括其语法等同语的使用,通常应该被理解为开放式和非限制性的,例如不排除另外的未叙述的要素或步骤,除非从上下文另有具体陈述或理解。

[0106] 当在数量值之前使用术语“约”时,本发明还包括所述特定数量值本身,除非另有具体陈述。当在本文中使用时,术语“约”是指距标称值 $\pm 10\%$ 的变动,除非另有指示或推断。

[0107] 应该理解,步骤的顺序或执行某些行动的顺序是不重要的,只要本发明仍然可行即可。此外,两个或更多个步骤或行动可以同时进行。

[0108] 本文中的任何和所有实例或示例性语言如“例如”或“包括”的使用,仅仅旨在更好地说明本发明,并且除非声明,否则不对本发明的范围构成限制。本说明书中的所有语言都不应该被解释为指示任何未提出权利要求的要素对于本发明的实践来说是必不可少的。

实施例

[0109] 下面的实施例仅仅是说明性的,并且不打算以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0110] 实施例1:IL-10RA融合蛋白质粒构建

[0111] 本实施例描述了编码IL-10RA融合蛋白的质粒和病毒表达载体的产生。

[0112] 编码一系列人类IL-10RA融合蛋白的核苷酸序列被生成。第一种融合蛋白hIL-10R-IgG1 (SEQ ID NO:58) 包括人类IL-10RA的第1-229位核苷酸残基(结束于SLTRQ),随后紧跟人类IgG1序列的第84-330位残基(始于NVNHK)。第二种融合蛋白hIL-10R-Fc (SEQ ID NO:48) 包括人类IL-10RA的第1-235位残基(结束于FTVTN),随后紧跟人类IgG1的第104-324位残基(始于DKTHT)。所述融合蛋白的详细情况示出在表3中。

[0113] 表3

[0114]

| 融合蛋白 | hIL-10RA 残基 | hIgG1 残基 | hIL-10RA-hIgG1接合部 |
|--------------|----------------|-------------|--------------------------------|
| hIL-10R-IgG1 | 1-229 | 84-330 | SLTRQ-NVNHKPSNTKVVDKRVDPKSCDKT |
| hIL-10R-Fc | 1-235 | 104-324 | SLTRQYFTVTN-DKTHT |

[0115] 视情况而定将编码所述融合蛋白的核苷酸序列克隆到质粒中,用于下游应用。具体来说,产生了不表达转入基因、表达hIL-10R-IgG1或hIL-10RA-Fc的重组腺病毒载体。

[0116] 实施例2:IL-10R融合蛋白活性

[0117] 将A549细胞(人类肺癌细胞)用实施例1中所述不表达转入基因、表达hIL-10R-IgG1或hIL-10RA-Fc的病毒载体以10MOI感染并培养四天。收集来自于所述细胞培养的调制培养基,并将THP-1细胞(人类白血病单核细胞)以 5×10^6 个细胞/ml悬浮在所述调制培养基中。将细胞用50ng/ml的人类IL-10在37℃下处理30分钟,或保持原样作为对照。为了测定IL-10活性,将来自于THP-1细胞的提取的细胞内蛋白通过Western印迹探测磷酸化的Stat3。使用总Stat3作为内参。

[0118] 在来自于用不表达转入基因或表达hIL-10RA-Fc的病毒载体感染的细胞的调制培养基中培养的THP-1细胞中,IL-10诱导Stat3磷酸化。

[0119] 然而,在来自于用表达hIL10R-IgG的病毒感染的细胞的调制培养基中

[0120] 培养的THP-1细胞中,IL-10不诱导Stat3磷酸化。这些结果证实了hIL-

[0121] 10R-IgG1融合蛋白阻断IL-10活化Stat3信号传导级联。

[0122] 通过参考并入

[0123] 本文中提高的每个专利文献和科学论文的全部公开内容,为所有

[0124] 目的通过参考并入本文。

[0125] 等同性

[0126] 本发明可以以其他特定形式体现而不背离其精神或本质特征。因

[0127] 此,上述实施方式在所有情况下被认为是对本文描述的发明的说明而

[0128] 不是限制。因此,本发明的范围由随附的权利要求书而不是上述描述来

[0129] 指明,并且打算将进入权利要求书的意义和等同性范围之内的所有改

[0130] 变都涵盖在其中。

[0131] SEQ ID NO:52

[0132] catcatcaataatataccttatttttgattgaagccaatatgataatgaggggtggagtttgtgacg
tggcgcggggctgggaacggggcggtgacgtagtagtggtggcggaagtgtgatgttgcaagtgtggcggaacac
atgtaagcgacggatgtggcaaaagtacgttttttggtgtgcccgggtgtacacaggaagtgacaattttcgcgcg
gttttaggcggatgttgtagtaattttgggcgtaaccgagtaagattttggccattttcgcgggaaaactgaataag
aggaagtgaatctgaataattttgtgttactcatagcgcgtaatatgtttagggccgcggggactttgaccgt
ttacgtggagactcgcccaggtgtttttctcaggtgttttccgcgttccgggtcaaagttggcggtttattattat
agtcagctgacgtgtagtgatattataccgggtgagttcctcaagaggccactcttgagtgccagcgagtagagtt
ttctcctccgagccgctccgacaccgggactgaaaatgagacatattatctgccacggaggtgttattaccgaaga
aatggccgccagtccttttgaccagctgatcgaagaggtactggctgataatcttcacctcctagccattttgaa

ccacctacccttcacgaactgtatgatttagacgtgacggccccgaagatcccaacgaggaggcggtttcgcaga
tttttcccgactctgtaatgttggcggtgcaggaagggttgacttactcacttttccgcccggcgcccggttctcc
ggagccgcctcacctttcccgagcccagcagccggagcagagagccttgggtccggtttctatgccaaacctt
gtaccggaggtgatcgatcttacctgccacgaggctggctttccaccagtgacgacgaggatgaagagggtgagg
agtttgtgttagattatgtggagcaccgccggcacggttgcaggtcttgtcattatcacggaggaatacggggga
cccagatattatgtgttcgctttgctatatgaggacctgtggcatgtttgtctacagtaagtgaataattatgggca
gtgggtgatagagtgggtgggtttgggtgtgtaatttttttaatttttacagttttgtggtttaagaattttg
tattgtgatttttttaaaaggtcctgtgtctgaacctgagcctgagcccgagccagaaccggagcctgcaagacct
accgcccgtcctaaaatggcgctgtatcctgagacgcccagacatcacctgtgtctagagaatgcaatagtagta
cggatagctgtgactccggtccttctaacacacctcctgagatacacccgggtgggtcccgctgtgccccattaaacc
agttgccgtgagagttgggtggcgctgccaggctgtggaatgtatcgaggacttgcttaacgagcctgggcaacct
ttggacttgagctgtaaacgccccaggccataagggtgtaaacctgtgattgcgtgtgtggttaacgcctttgtttg
ctgaatgagttgatgtaagtttaataaagggtgagataatgtttaacttgcattggcgtgttaaatggggcggggt
taaagggtatataatgcgccgtgggctaactttggttacatctgacctcatggaggcttgggagtgtttggaagat
ttttctgctgtgcgtaacttgcgtgaacagagctctaacagtacctcttgggttttgagggtttctgtggggtctat
cccaggcaaagttagctctgcagaattaaggaggattacaagtgggaatttgaagagcttttgaaatcctgtggtga
gctgtttgattctttgaatctgggtcaccaggcgcttttccaagagaaggctcatcaagactttggatttttccaca
ccggggcgcgctgcggctgctgttgccttttttagattttataaaggataaatggagcgaagaaacctatctgagcg
gggggtacctgctggattttctggccatgcatctgtggagagcggttgtgagacacaagaatcgccctgctactgtt
gtcttccgtccgcccggcgataataccgacggaggagcagcagcagcagcaggaggaagccaggcgggcgggcgag
gagcagagcccatggaaccgagagccggcctggacctcggggaatgaatgttgtacaggtggctgaactgtatcc
agaactgagacgcattttgacaattacagaggatgggcaggggttaaaggggtaaagaggagcggggggcttgt
gaggctacagaggaggctaggaatctagcttttagcttaatgaccagacaccgtcctgagtgtattacttttcaac
agatcaaggataattgcgctaattgagcttgatctgctggcgagaagtattccatagagcagctgaccacttactg
gctgcagccaggggatgattttgaggaggctattagggtatatgcaaagggtggcacttaggccagattgcaagtac
aagatcagcaaacttgtaaataatcaggaattgttgcctacatttctgggaacggggccgaggtggagatagatacgg
aggatagggtggccttttagatgtagcatgataaatatgtggccgggggtgcttggcatggacgggggtggttattat
gaatgtaagggtttactggcccaatttttagcggtacggttttctggccaataccaaccttatcctacacgggtgta
agcttctatgggtttaacaataacctgtgtggaagcctggaccgatgtaagggttcggggctgtgccttttactgct
gctggaagggggtggtgtgtcgcccaaaagcagggttcaattaagaaatgcctctttgaaagggtgtaccttggg
tatcctgtctgagggttaactccagggtgcgccacaatgtggcctccgactgtggttgcctcatgctagtgtgaaaagc
gtggctgtgattaagcataacatggtatgtggcaactgcgaggacagggcctctcagatgctgacctgctcgagc
gcaactgtcacctgctgaagaccattcacgtagccagccactctcgcaaggcctggccagtgtttgagcataacat
actgaccgcgtgttccttgcatttgggttaacaggaggggggtgttcctaccttaccatgaattttgagtcacact
aagatattgcttgagcccgagagcatgtccaagggtgaacctgaacgggggtgtttgacatgacctgaagatctgga
agggtgctgaggtagatgagaccgcaccagggtgcagacctgcgagtggtggcggtaaacataattaggaaccagcc
tgtgatgctggatgtgaccgaggagctgaggcccgatcacttgggtgctggcctgcaccgcgctgagtttggtct
agcgatgaagatacagattgaggtactgaaatgtgtggcggtggccttaagggtgggaaagaatatataagggtgggg
gtcttatgtagttttgtatctgttttgcagcagccgcccgcgccatgagcaccaactcgtttgatggaagcattgt

gagctcatatTTTGACAACGCGCATGCCCCCATGGGCCGGGGTGCgtcagaatgtgatgggctccagcattgatggt
cgccccgtcctgcccGAAACTCTACTACCTTGACCTACGAGACCGTGTCTGGAACGCCGTTGGAGACTGCAGCCT
ccgccgcgcgttcagccgctgcagccaccgcccgcgggattgtgactgactttgctttcctgagccccgttgcaag
cagtgcagcttcccgttcatccgcccgcgatgacaagttgacggctcttttggcacaattggattctttgaccgg
gaacttaatgtcgtttctcagcagctgttgatctgcgccagcaggtttctgccctgaaggcttccctccctccca
atgcggttttaaacaataaaaaaccagactctgtttggatttgatcaagcaagtgtcttgctgtctttatTT
aggggTTTTGCGCGCGGtaggccccggaccagcggctctcggtcggttgagggtcctgtgtatTTTTccaggacg
tggtaaaggTgactctggatgttcagatacatgggcataagccccgtctctggggtggaggtagcaccactgcagag
cttcatgctgcggggtggtgtttagatgatccagtcgtagcaggagcgctgggcgtggtgcctaaaaatgtcttt
cagtagcaagctgattgccaggggcaggcccttgggtgtaagtgtttacaaagcggttaagctgggatgggtgcata
cgtggggatatgagatgcatcttggactgtatTTTTaggttggtatgttccagccatatccctccggggattca
tgttTgtcagaaccaccagcacagtgtatccggtgcacttgggaaattTgtcatgtagcttagaaggaaatgcgtg
gaagaacttgagacgccctTgtgacctccaagatTTTccatgcattcgTccataatgatggcaatgggcccacgg
gcggcgccctgggcgaagatatTTTctgggatcactaacgtcatagtTgtgttccaggatgagatcgTcataggcca
TTTTTacaaagcgcgggcggagggtgccagactgcggtataatggTtccatccggcccaggggcgtagttaccctc
acagattTgcatttcccacgctttgagttcagatggggggatcatgtctacctgcggggcgatgaagaaaacggtt
tccggggtaggggagatcagctgggaagaaagcaggttccTgagcagctgcgacttaccgcagccggtgggcccgt
aaatcacacctattaccgggtgcaactggtagttaagagagctgcagctgccgtcatccctgagcagggggccac
ttcgTtaagcatgtccctgactcgcatgttttccctgaccaaatccgccagaaggcgctcgcccccagcgatagc
agttctTgcaaggaagcaaagTTTTcaacggtttgagaccgtccgccgtaggcatgcttttgagcgTTtgaccaa
gcagttccaggcggtcccacagctcggtcacctgctctacggcatctcgatccagcatactctctcgTTtcgcggg
ttggggcggtttcgctgtacggcagtagtcggtgctcgTccagacgggccagggtcatgtctttccacgggcgca
gggtcctcgTcagcgtagctctgggtcacggtgaagggtgcgctccgggctgcgcgtggccagggtgcgcttgag
gctggtcctgctgggtgctgaagcgctgccggtcttcgccctgcgcgtcggccaggtagcatttgacctggtgtca
tagtccagccccctccgcggcgTggcccttggcgcgcagcttgcccttggaggaggcgccgcagaggggcagtgca
gactTTTtagggcgtagagcttgggcgcgagaaataccgattccggggagtaggcatccgcgccgaggccccgca
gacggtctcgcatccacagagccaggTgagctctggccgttccgggtcaaaaaccaggtttcccccattgctTTTg
atgcgtttcttacctctggtttccatgagccggtgtccacgctcggtgacgaaaaggctgtccgtgtccccgtata
cagacttgagaggcctgtcctcgagcgggtgttccgcggtcctcctcgTatagaaactcggaccactctgagacaaa
ggctcgcgTccaggccagcacgaaggaggctaagtgggaggggtagcggtcgTtgtccactaggggtccactcg
tccagggtgtgaagacacatgtcgccctcttcggcatcaaggaaggTgattggtttgtaggtgtagggcacgtgac
cggtgttccTgaaggggggtataaaaggggggtgggggcgcttcgTcctcactctcttccgcatcgctgtctgc
gagggccagctgttggggtagtactccctctgaaaagcgggcatgacttctgcgctaagattgtcagtttccaaa
aacgaggaggatttgatatccactggccccgcggtgatgcctttgagggtggccgcatccatctggtcagaaaaga
caatctTTTTgttgtcaagcttggTggcaaacgaccgtagagggcgttgacagcaacttggcgatggagcgcag
ggtttggTTTTgtcgcatcggcgcgctccttggccgcgatgttttagctgcacgtattcgcgcgcaacgcaccgc
cattcgggaaagacggTggtgcgctcgTcgggcaccaggTgcacgcgccaaccgcggttgtgcagggtgacaaggt
caacgctggtggctacctctccgcgtaggcgctcgTtggTccagcagaggcgccgcccttgcgcgagcagaatgg
cggtaggggggtctagctgcgtctcgTccgggggtctgcgtccacggTaaagaccccgggcagcaggcgcgctgc

aagtagtctatcttgcaccccttgcaagtctagcgcctgctgccatgcgcggcggaagcgcgcgctcgtatgggt
tgagtgggggaccccatggcatggggtgggtgagcgcggagcgctacatgccgcaaagtctgtaaactagagggg
ctctctgagtattccaagatatgtagggtagcatcttccaccgcggatgctggcgcgcacgtaatcgtatagttcg
tgcgagggagcggagggtcgggaccgaggttgctacgggcgggctgctctgctcggaagactatctgcctgaaga
tggcatgtgagttggatgatattggttgacgctggaagacgttgaagctggcgtctgtgagacctaccgcgtcacg
cacgaaggaggcgtaggagtcgcgcagcttggtgaccagctcggcggtgacctgcacgtctagggcgagtagtcc
agggtttccttgatgatgtcacttactctgtccctttttttccacagctcgcggttgaggacaaactcttcgc
ggtctttccagtactcttggtcggaaaccgctcggcctccgaacggtaagagcctagcatgtagaactggttgac
ggcctggtaggcgcagcatcccttttctacgggtagcgcgtatgcctgcgcggccttccggagcgaggtgtgggtg
agcgcaaagggtgtccctgacctgactttgaggtactggtatttgaagtcagtgctgcacccgctgtccc
agagcaaaaagtcgctgcgctttttggaacgcggatttggcagggcgaaggtagacatcgttgaagagtatctttcc
cgcgcgaggcataaaagttgcgtgtgatgcggaagggtcccggcacctcggaacggttgtaattacctgggcggcg
agcacgatctcgtcaaagccgttgatgttggtggcccacaatgtaaagttccaagaagcgcgggatgcccttgatgg
aaggcaattttttaagttcctcgtaggtgagctcttcaggggagctgagcccgtgctctgaaagggccagctctgc
aagatgagggttggaagcgacgaatgagctccacaggtcacgggccattagcatttgcaggtggtcgcgaaaggtc
ctaaactggcgacctatggccatttttctggggtgatgcagtagaaggtaagcgggtcttgttcccagcggtccc
atccaaggttcgcggctaggtctcgcgcggcagtcactagaggctcatctccgccgaacttcatgaccagcatgaa
gggcacgagctgcttcccaaaggcccccatccaagtataggtctctacatcgtaggtgacaaagagacgctcgggtg
cgaggatgcgagccgatcggaagaactggatctcccgccaccaattggaggagtggctattgatgtggtgaaagt
agaagtccttgcgacgggcccgaacactcgtgctggcttttgtaaaaacgtgcgcagtagtggcagcggtgcacggg
ctgtacatcctgcacgaggttgacctgacgaccgcgcacaaggaagcagagtgggaatttgagccctcgcctggc
gggtttggctgggtggtcttctacttcggctgcttgtccttgaccgtctggctgctcgaggggagttacggtggatc
ggaccaccacgccgcgcgagcccaaagtccagatgtccgcgcgcggcggtcgagccttgatgacaacatcgcgag
atgggagctgtccatggtctggagctcccgcggcgctcaggtcaggcgggagctcctgcaggtttacctcgcataga
cgggtcagggcgcgggctagatccaggtgatacctaatttccaggggctggttggtggcggcgctcgatggcttgca
agaggccgcacccccgcggcgcgactacggtaccgcgcggcgggcggtggccgcgggggtgtccttgatgatgc
atctaaaagcgggtgacgcgggcgagccccggaggtagggggggctccggacccgcgggagagggggcaggggca
cgctcggcgccgcgcgcgggcaggagctggtgctgcgcgcgtaggttgctggcgaacgcgacgacgcggcggttgat
ctcctgaatctggcgctctgctgaagacgacgggccccgggtgagcttgagcctgaaagagagttcgacagaatca
atttcggtgtcgttgacggcggttggtgcaaaaatctcctgcacgtctcctgagttgtcttgataggcgatctcgg
ccatgaactgctcgatctcttctcctggagatctccgcgtccggctcgtccacggtggcggcgaggtcggttgga
aatgcgggcatgagctgcgagaaggcgttgaggcctccctcgttccagacgcggctgtagaccacgcccccttcg
gcatcgcgggcgcgcacgacctgcgcgagattgagctccacgtgccgggcgaagacggcgtagtttcgcaggc
gctgaaagaggttagttgagggtggtggcggtgtgttctgccacgaagaagtacataaccagcgtcgcaacgtgga
ttcgttgatatccccaaggcctcaaggcgtccatggcctcgtagaagtccacggcgaagttgaaaaactgggag
ttgcgcgccgacacgggttaactcctcctccagaagacggatgagctcggcgacagtgctgcgcacctcgcgtcaa
aggctacaggggcctcttcttcttcttcaatctcctcttccataagggcctcccccttcttcttcttggcgggcg
tggggggaggggggacacggcggcgacgacggcgccacgggagggcggtcgacaaaagcgtcgtatcatctccccgcgg
cgacggcgcatggtctcggtgacggcgcgccgttctcgcgggggcgcagttggaagacgccgcccgtcatgtccc

27

ggtgctggcgatcgtaaacgcgctggccgaaaacagggccatccggcccgacgaggccggcctggtctacgacgcg
ctgcttcagcgcgtggctcgttacaacagcggcaacgtgcagaccaacctggaccggctggtgggggatgtgcgcg
aggccgtggcgagcgtgagcgcgcgcagcagcagggaacctgggctccatgggtgactaaacgccttcctgag
tacacagcccgccaacgtgccgcggggacaggaggactacaccaactttgtgagcgcactgaggtaatggtgact
gagacaccgcaaagttaggtgtaccagtctgggacagactatTTTTTccagaccagtagacaaggcctgcagaccg
taaacctgagccaggctttcaaaaacttgacaggggctgtggggggtgagggtcccacaggcgaccgcgcgaccgt
gtctagcttgtgacgcccactcgcgccgtgttgcgtgctgctaatagcgcccttcacggacagtggcagcgtgtcc
cgggacacataccttaggtcacttgcgtgacactgtaccgcgaggccataggtcaggcgcatgtggacgagcatactt
tccaggagattacaagtgtcagccgcgcgctggggcaggaggacacgggcagcctggaggcaaccctaaactacct
gctgaccaaccggcggcagaagatccctcgttgcacagtttaaacagcagaggaggagcgcatTTTTgcgctacgtg
cagcagagcgtgagccttaacctgatgcgcgacggggtaacgcccgagcgtggcgctggacatgaccgcgcgcaaca
tggaaccgggcatgtatgcctcaaaccggcgctttatcaaccgcctaattggactacttgcacgcggcgccgcgt
gaaccccgagtatTTTcaccaatgccatcttgaaccgcactggctaccgccccctggTTTTtacaccgggggatTC
gaggtgcccagggtaacgatggattcctctgggacgacatagacgacagcgtgtttcccgcaaccgcagaccc
tgctagagttgcaacagcgcgagcaggcagaggcgcgctgcgaaaggaaagcttccgcaggccaagcagcttgtc
cgatctaggcgctgaggccccgcggtcagatgctagtagccatttccaagcttgatagggtctcttaccagcact
cgcaccacccgcccgcgctgctgggcgaggaggagtacctaaacaactcgtgctgcagccgcagcgcgaaaaaa
acctgcctccggcatttcccaacaacgggatagagagcctagtggacaagatgagtagatggaagacgtacgcgca
ggagcacaggacgtgccaggccccgcgccccccaccgctcgtcaaaggcacgaccgtcagcggggtctggtgtgg
gaggacgatgactcggcagacgacagcagcgtcctggatttgggaggagtggaaccctttgcgcaccttcgcc
ccaggctggggagaatgttttaaaaaaaaaaagcatgatgcaaaataaaaaactcaccaaggccatggcaccgag
cgttggTTTTcttgtattcccttagtatgcggcgcgcgcgatgtatgaggaaggctcctcctcctcctacgaga
gtgtggtgagcgcggcgccagtgaggcgggcgctgggttctcccttcgatgctcccctggaccgcgcttgtgcc
tccgcggtacctgcggcctaccggggggagaaacagcatccgttactctgagttggcacccctattcgacaccacc
cgtgtgtacctggtggacaacaagtcaacggatgtggcatccctgaactaccagaacgaccacagcaactttctga
ccacgggtcattcaaaacaatgactacagccgggggaggcaagcacacagaccatcaatcttgacgaccggtcgca
ctggggcgggcgacctgaaaacctcctgcataccaacatgccaaatgtgaacgagttcatgtttaccaataagttt
aaggcgcggtgatggtgtcgcgttgcctactaaggacaatcaggtggagctgaaatacagtggtggagtcca
cgctgcccaggggcaactactccgagaccatgaccatagaccttatgaacaacgcgatcgtggagcactacttgaa
agtgggcagacagaacggggttctggaaagcgacatcggggtaaaagtttgacaccgcgaacttcagactggggttt
gaccccgctactggtcttgcctgctggggtatatacaaacgaagccttccatccagacatcattttgctgccag
gatgagggtggacttcacccacagccgctgagcaacttgttgggcatccgcaagcggcaacccttcaggaggg
ctttaggatcacctacgatgatctggagggtggtaacattcccgcactgttggtggtgacgcctaccaggcgagc
ttgaaagatgacaccgaacaggcggggggtggcgagggcgagcaacagcagtggcagcgcgcggaagagaact
ccaacgcggcagccgcggcaatgcagccggtggaggacatgaacgatcatgccattcgggcgacacctttgccac
acgggctgaggagaagcgcgctgaggccgaagcagcgccgaagctgcgcccccgctgcgcaaccgcaggtcgag
aagcctcagaagaaaccggtgatcaaacccctgacagaggacagcaagaaacgcagttacaacctaaatgaatg
acagcaccttcacccagtagcgcgctggtaccttgcatataactacggcgaccctcagaccggaatccgctcatg
gacctgctttgactcctgacgtaacctgcggctcggagcaggtctactggctggtgccagacatgatgaagac

cccgtgaccttccgctccacgcgccagatcagcaactttccggtggtggcgccgagctgttgcccgtgactcca
agagcttctacaacgaccaggccgtctactcccaactcatccgccagtttacctctctgaccacgtgttcaatcg
ctttcccagaaaccagattttggcgcgccccgccagccccaccatcaccaccgtcagtgaacacgttccctgctctc
acagatcacgggacgctaccgctgcgcaacagcatcggaggagtccagcgagtgaccattactgacgccagacgcc
gcacctgcccctacgtttacaaggccctgggcatagtctcgccgcgcgtcctatcgagccgcactttttgagcaag
catgtccatccttatatcgcccagcaataacacaggctggggcctgcgcttcccaagcaagatgtttggcggggcc
aagaagcgctccgaccaacacccagtgcgcggtgcgcgggcactaccgcgcgcccctggggcgcgcacaaacgcggcc
gcactggggcgaccaccgctcgatgacgccatcgacgcgggtggtggaggaggcgcgcaactacacgcccacgcccgc
accagtgtccacagtggacgcggccattcagaccgtggtgcgcgaggccccggcgctatgctaaaatgaagagacgg
cggaggcgcgtagcacgtcgccaccgcccgcgaccggcactgcccggccaacgcgcggcgggcgccctgcttaacc
gcgcacgtcgccaccggccgacggggcgcccatgccccgcgctcgaaggctggccgcgggtattgtcactgtgcccc
caggtccaggcgacgagcgggccgcccgcagcagccgcggccattagtgtatgactcagggtcgaggggcaacgtg
tattgggtgcgcgactcggttagcgccctgcgcggtgcccgtgcgcaaccgcccccgcgcaactagattgcaagaa
aaaactacttagactcgactgttgtatgtatccagcggcgggcgcgcgcaacgaagctatgtccaagcgcaaaat
caaagaagagatgctccaggtcatcgcgccggagatctatggcccccggaagaaggaagagcaggattacaagccc
cgaaagctaaagcgggtcaaaaagaaaaagaaagatgatgatgaacttgacgacgaggtggaactgctgcacg
ctaccgcgcccaggcgacgggtacagtggaaaggctgacgcgtaaaacgtgttttgcgaccggcaccaccgtagt
ctttacgcccgggtgagcgctccaccgcacctacaagcgcggtgtatgatgaggtgtacggcgacgaggacctgctt
gagcaggccaacgagcgccctcggggagtttgccctacggaaagcggcataaggacatgctggcggttgccgctggacg
agggcaacccaacacctagcctaaagcccgtaacactgcagcaggtgctgcccgcgcttgccacctccgaagaaaa
gcgcggcctaaagcgcgagctggtgacttggcaccaccgtgcagctgatggtaccgaagcgccagcgactggaa
gatgtcttggaaaaaatgaccgtggaacctgggctggagcccaggtccgcgtgcgccaatcaagcaggtggcg
cgggactggcggtgcagaccgtggacgttcagataccactaccagtagcaccagtattgccaccggccacagaggg
catggagacacaaacgtccccggttgccctcagcggtggcggtatgccgcggtgcaggcggtcgctgcggccgcgtcc
aagacctctacggaggtgcaaacggaccctggatgtttcgcggttcagcccccgggcgcccgcggttcgagga
agtacggcgccgcccagcgcgctactgcccgaatatgccctacatccttccattgcgccctacccccggctatcgtagg
ctacacctaccgccccagaagacgagcaactaccgcagccgaaccaccactggaaccggcgccgcccgtcgccgt
cgccagcccgtgctgccccgatttccgtgcgcgagggtggctcgcgaaaggaggcaggacctggtgctgccaacag
cgcgctaccaccccagcatcgtttaaaagccggtctttgtggttcttgcagatatggccctcacctgccgcctccg
tttcccggtgcccggattccgaggaagaatgcaccgtaggagggcatggccggccacggcctgacggggcgcatg
cgctcgcgccaccaccggcgggcgcgcgctgcaccgtgcagtcgcgcgggtatcctgccccctcttattccac
tgatcgcccgggcgattggcgccgtgcccgggaattgcatccgtggccttgaggcgagagacactgattaaaaac
aagttgcatgtggaaaaatcaaaataaaaagtctggactctcacgctcgcttggtcctgtaactatttttagaat
ggaagacatcaactttgctctctggccccgcgacacggctcgcgcccgttcattgggaaactggcaagatatcggc
accagcaatatgagcggtggcgcccttcagctggggctcgctgtggagcggcattaaaaatttcggttccaccgtta
agaactatggcagcaaggcctggaacagcagcacaggccagatgctgagggataagttgaaagagcaaaatttcca
acaaaagggtggtagatggcctggcctctggcattagcgggggtggtggacctggccaaccaggcagtgcaaaataag
attaacagtaagcttgatccccgcctcccgtagaggagcctccaccggccgtggagacagtgtctccagaggggc
gtggcgaaaagcgctccgcgccccgacagggaagaaactctggtgacgcaaatagacgagcctccctcgtagagga

ggcactaaagcaaggcctgcccaccacccgtcccatcgcgcccatggctaccggagtgtgtggccagcacacacc
gtaacgctggacctgcctcccccgccgacaccagcagaaacctgtgtgtgccaggccccgaccgccgttgtttaa
cccgctcctagccgcgctccctgcgcccgcgcccagcggctccgcgatcggttgcggcccgtagccagtggcaactg
gcaaagcacactgaacagcatcgtgggtctgggggtgcaatccctgaagcggcgacgatgcttctgaatagctaac
gtgtcgtatgtgtgtcatgtatgcgtccatgtcgccgcccagaggagctgtgagccgcccgcgcccgcgtttccaa
gatggctaccccttcgatgatgccgcagtgggtcttacatgcacatctcgggccaggacgcctcggagtacctgagc
cccgggctgggtgcagtttgcggcgccaccgagacgtacttcagcctgaataacaagttagaaaccccacgggtg
cgcctacgcacgacgtgaccacagaccgggtcccagcggttgacgctgcggttcatccctgtggaccgtgaggatac
tgcgctactcgtacaaggcgcggttcaccctagctgtgggtgataaccgtgtgtgtggacatggcttccacgtacttt
gacatccgcggcgctgtggacagggggccctacttttaagccctactctggcactgcctacaacgccttggtccca
agggtgccccaaatccttgcaatgggatgaagctgctactgctcttgaaataaacctagaagaaggagcagatga
caacgaagacgaagtagacgagcaagctgagcagcaaaaaactcacgtatttgggcaggcgccttattctggtata
aatattacaaaggagggtattcaaatagggtgtcgaaaggtcaaacacctaataatgcccataaaacatttcaacctg
aacctcaaataggagaatctcagtggtagcaaaactgaaattaatcatgcagctgggagagtccttaaaaagactac
cccaatgaaacatgttacggttcatatgcaaaaccacaaatgaaaatggagggcaaggcattcttgtaaagcaa
caaatggaaagctagaaagtcaagtggaaatgcaatTTTTTctcaactactgaggcgaccgcaggcaatggtgata
acttgactcctaaagtggattgtacagtgaagatgtagatatagaaaccccagacactcatatttcttacatgcc
cactattaaggaaggtaactcacgagaactaatgggccaacaatctatgcccacaggcctaattacattgctttt
agggacaattttatttggtcctaattgtattacaacagcacgggtaatatgggtgttctggcgggccaagcatcgcagt
tgaatgctgtttagatttgcaagacagaaacacagagctttcataccagcttttgcttgattccattggtgatag
aaccaggtacttttctatgtggaatcaggctgttgacagctatgatccagatgttagaattattgaaatcatgga
actgaagatgaacttccaaattactgctttccactgggaggtgtgattaatacagagactcttaccaaggtaaaac
ctaaaacaggctcaggaaaatggatgggaaaaagatgctacagaatTTTtcagataaaaaatgaaataagagtggaaa
taattttgccatggaaatcaatctaaatgccaacctgtggagaaatttctgtactccaacatagcgtgtatttg
ccgcacaagctaaagtacagtccttccaacgtaaaaatttctgataacccaaacacctacgactacatgaacaagc
gagtgggtggctcccgggttagtggactgctacattaaccttgagacacgctgggtcccttgactatatggacaacgt
caaccattttaaccaccaccgcaatgctggcctgcgctaccgctcaatgttgctgggcaatggtcgtatgtgcc
ttccacatccaggtgcctcagaagtcttttgcattaaaaacctcttctcctgccgggctcatacacctacgagt
ggaacttcaggaaggatgttaacatggttctgcagagctccctaggaaatgacctaaagggttgacggagccagcat
taagtttgatagcatttgcctttacgccaccttcttccccatggcccacaacaccgctccacgcttgaggccatg
cttagaaacgacaccaacgaccagtcctttaacgactatctctccgccccaacatgctctaccctatacccgcca
acgctaccaacgtgcccatatccatccccctcccgcaactgggcggctttccgcggctgggccttcacgcgccttaa
gactaaggaaaccccatcactgggctcgggctacgaccttattacacctactctggctctataccctacctagat
ggaaccttttacctcaaccacacctttaagaaggtggccattacctttgactcttctgtcagctggcctggcaatg
accgctgcttaccaccaacgagtttgaaattaagcgtcagttgacggggagggttacaacgttgcccagtgtaa
catgaccaaagactgggtcctgtgtaaatgctagctaaactacaacattggctaccagggttctatatccagag
agctacaaggaccgcatgtactccttctttagaaacttccagcccatgagccgtcaggtggtggatgatactaaat
acaaggactaccaacagggtgggcacacctacaccaacacaacaactctggatttgttggtaccttgccccaccat
gcgcgaaggacaggcctaccctgctaacttccccctatccgcttataggcaagaccgagttgacagcattaccag

aaaaagttttcttttgcgatcgaccctttggcgcatcccatttctccagtaactttatgtccatgggcgcactcacag
acctggggccaaaaccttctctacgccaaactccgcccacgcgctagacatgacttttgaggtggatcccatggacga
gcccacccttctttatgttttgtttgaagtctttgacgtgggtccgtgtgcaccggccgcaccgcggcgtcatcgaa
accgtgtacctgcgcacgccccttctcggcggcaacgccacaacataaagaagcaagcaacatcaacaacagctgc
cgccatgggctccagtgagcaggaactgaaagccattgtcaaagatcttggttgtgggcatatTTTTTgggcacc
tatgacaagcgctttccaggctttgtttctccacacaagctcgcctgcgccatagtcaatacggccggtcgcgaga
ctggggggcgtagactggatggcctttgcctggaacccgcactcaaaaacatgctaccttttgagccctttggctt
ttctgaccagecgactcaagcaggtttaccagtttgagtacgagtcactcctgcgccgtagcgccattgcttcttcc
cccgaccgctgtataacgctggaaaagtccacccaaagcgtacagggggcccaactcggccgctgtggactattct
gctgcatgtttctccacgcctttgccaactggccccaactcccatggatcacaaccccaccatgaaccttattac
cggggtacccaactccatgctcaacagtccccaggtacagcccaccctgcgtcgcaaccaggaacagctctacagc
ttcctggagcgccactcgcctacttccgcagccacagtgcgcagattaggagcgccacttctttttgtcacttga
aaaacatgtaaaaaataatgtactagagacactttcaataaaggcaaatgcttttatTTTgtacactctcgggtgatt
atttacccccacccttgccgtctgcgcgctttaaatacaaaggggttctgccgcgcatcgctatgcgccactggc
agggacacgttgcgatactggtgttttagtgctccacttaaactcaggcacaaccatccgcggcagctcgggtgaagt
tttactccacaggtgcgcaccatcaccaacgcgttttagcaggtcggggcgccgatatcttgaagtcgcagttggg
gcctccgcccctgcgcgcgcgagttgcgatacacagggttgagcactggaacactatcagcgccgggtggtgcacg
ctggccagcacgctcttgtcggagatcagatccgcgtccaggtcctccgcgttgctcagggcgaacggagtcact
ttggtagctgccttcccaaaaaggcgcggtgccaggctttgagttgactcgcaccgtagtggtcatcaaaaggtg
accgtgcccgtctgggcgttaggatacagcgctgcataaaagccttgatctgcttaaagccacctgagccttt
gcgccttcagagaagaacatgccgcaagacttgccggaaaactgattggccggacaggccgcgtcgtgcacgcagc
accttgcgctcgggtgttgagatctgcaccacatttcggccccaccggttcttcacgatcttggccttgctagactg
ctccttcagcgcgctgccgcttttcgctcgtcacatccatttcaatcacgtgctccttatttatcataatgctt
ccgtgtagacacttaagctcgccttcgatctcagcgcgagcggtgcagccacaacgcgcagcccgtgggctcgtgat
gcttgtaggtcacctctgcaaacgactgcaggtacgcctgcaggaatcgccccatcatcgtcacaaaggtcttgtt
gctggtgaaggtcagctgcaaccgcgggtgctcctcgttcagccaggtcttgcatagggcgccagagcttccact
tggtcaggcagtagtttgaagttgccttttagatcgttatccacgtggtacttgtccatcagcgcgcgcgagcct
ccatgcccttctcccacgcagacacgatcggcacactcagcgggttcacacacgttaatttactttccgcttcgt
gggctcttctcttcttcttgcgtccgcataaccacgcgccactgggtcgtcttcattcagccgcccgcactgtgcgc
ttacctcctttgcatgcttgattagaccgggtgggttgctgaaaccaccattttagcgccacatcttctcttt
cttctcgtcgtgccacgattacctctggtgatggcgggcgctcgggcttgggagaaggcgcttctttttcttctt
ggcgcaatggccaaatccgccgaggtcgatggcgcggggtgggtgtgcgcggcaccagcgcgcttctgtgat
gagttctctcgtcctcggactcgatacgcgcctcaccgcttttttggggcgccccggggaggcgggcgagc
gggacggggagcagacgtcctccatggttgggggagctcgcgcgcaccgcgtccgcgtcgggggtggtttcgcg
ctgctcctcttcccactggccatttcttctctctataggcagaaaaagatcatggagtcagtcgagaagaaggac
agcctaaccgccccctctgagttcgccaccaccgcctccaccgatgcgccaaacgcgcctaccaccttccccgtcg
aggcaccctcgcttgaggaggaggaagtgattatcgagcaggaccaggttttgtaagcgaagacgacgaggaccg
ctcagtagcaacagaggataaaaaagcaagaccaggacaacgcagaggcaaacgaggaacaagtcggggcggggggac
gaaaggcatggcgactacctagatgtgggagacgacgtgctgttgaagcatctgcagcgccagtgcgccattatct

gcgacgcgttgcaagagcgcagcgcgatgtgccccctgccatagcggatgtcagccttgccctacgaacgccacctatt
ctcaccgcgcgtaccccccaaacgccaagaaaacggcacatgcgagcccaacccgcgcctcaacttctaccccgtat
tttgccgtgccagaggtgcttgccacctatcacatctttttccaaaactgcaagatacccctatcctgccgtgccat
accgcagccgcgagcggacaagcagctggccttgccggcagggcgctgtcatacctgatatcgccctcgctcaacgaagt
gccaaaaatctttgagggctcttgagcgcgacgagaagcgcgcggcaaacgctctgcaacaggaaaacagcgaaaat
gaaagtcactctggagtggttggaactcgaggggtgacaacgcgcgcctagccgtactaaaacgcagcatcgagg
tccccactttgcctacccggcacttaacctaccccccaaggtcatgagcacagtcagtgagtgagctgatcgtgcg
ccgtgcgcagccccctggagagggatgcaattttgcaagaacaaacagaggagggcctacccgcagttggcgacgag
cagctagcgcgctggcttcaaacgcgcgagcctgccgacttgaggagcgcgcaaaactaatgatggccgcagtgcc
tcgttacccgtggagcttgagtgcatgcagcgggtcttttgctgacccggagatgcagcgcgaagctagaggaaacatt
gcactacacctttcgacagggctacgtacgccaggcctgcaagatctccaacgtggagctctgcaacctgggtctcc
taccttggaaattttgacgaaaaccgccttgggcaaaaacgtgcttcattccacgctcaagggcgagggcgccgcg
actacgtccgcgactgcgtttacttattttctatgctacacctggcagacggccatggggcgtttggcagcagtgctt
ggaggagtgcacctcaaggagctgcagaaactgctaaagcaaaaacttgaaggacctatggacggccttcaacgag
cgctccgtggccgcgcacctggcgacatcattttccccgaacgcctgcttaaaacctgcaacagggtctgccag
acttcaccagtc aaagcatgttgcaaaacttttaggaactttatcctagagcgtcaggaatcttgcccgccacctg
ctgtgcacttccctagcgactttgtgccattaaagtaccgcgaatgccctccgccgctttggggccactgctacctt
ctgcagctagccaactaccttgccctaccactctgacataatggaagacgtgagcggtgacggctctactggagtgtc
actgtcgctgcaacctatgcacccgcacccgtccctgggttgcaattcgagctgcttaacgaaagtcaaattat
cggtacctttgagctgcagggctccctcgccctgacgaaaagtcgcggctccggggttgaaactcactccggggctg
tgagcgtcggttaccttcgcaattttgtacctgaggactaccacgcccacgagattaggttctacgaagaccaat
cccgcccgccaaatgcggagcttacccgctgcgtcattaccagggccacattcttgccaattgcaagccatcaa
caaagcccgccaagagtttctgctacgaaaggacggggggtttacttggacccccagtcggcgaggagctcaac
ccaatccccccgcccgcagccctatcagcagcagccgcgggccttgcctccaggatggcacccaaaaagaag
ctgcagctgccgcccacccacggacgaggaggaatactgggacagtcaggcagaggaggttttgagcagaggag
aggaggacatgatggaagactgggagagcctagacgaggaagcttccgaggtcgaagaggtgtcagacgaaacacc
gtcacctcggtgcattccccctcgccggcgccccagaaatcggaacccggttccagcatggctacaacctccgct
cctcaggcgccgcccgcactgcccgttcgcccagccaaccgtagatgggacaccactggaaccaggggccggttaagt
ccaagcagccgcccgcgttagcccaagagcaacaacagcgcgaaggctaccgctcatggcgcggggcacaagaacgc
catagttgcttgcttgcaagactgtgggggcaacatctcttcgcccgcgctttcttctctaccatcacggcggtg
gccttcccccgtaacatcctgcattactaccgtcatctctacagccatactgcaccggcgggcagcggcagcggca
gcaacagcagcggccacacagaagcaaaggcgaccggatagcaagactctgacaaagcccaagaaatccacagcgg
cggcagcagcaggaggaggagcgtgcgtctggcgcccaacgaacccgtatcgacccgcgagcttagaaacaggat
ttttccactctgtatgctatatttcaacagagcaggggccaagaacaagagctgaaaataaaaaacaggtctctg
cgatccctcaccgcagctgcctgtatcacaaaagcgaagatcagcttcggcgcacgttggaagacgcggaggtc
tcttcagtaaatactgcgcgtgactcttaaggactagtttcgcgccctttctcaaatttaagcgcgaaaactacg
tcatctccagcggccacacccggcgccagcacctgtcgtcagcgccattatgagcaaggaaattcccacgccttac
atgtggagttaccagccacaaatgggacttgccggttgagctgcccagactactcaacccgaataaaactacatga
gcgcgggaccccatgatatcccggtcaacggaatccgcgcccaccgaaaccgaattctcttgaacaggcggc

tattaccaccacacctcgtaataaccttaatccccgtagttggccccgtgccctggtgtaccaggaaagtcccgt
cccaccactgttggtacttcccagagacgcccaggccgaagttcagatgactaactcaggggcgcagcttgccggcg
gctttcgtcacagggtgcggtcgcccgggcagggtataactcacctgacaatcagagggcgaggtattcagctcaa
cgacgagtcggtgagctcctcgcttggtctccgtccggacgggacatttcagatcggcggcgccggccgtccttca
ttcacgcctcgtcaggcaatcctaactctgcagacctcgctcctctgagccgcgctctggaggcattggaactctgc
aattttattgaggagtttgtgccatcggtctactttaaccccttctcgggacctcccggccactatccggatcaatt
tattcctaactttgacgcggtaaaggactcggcggacggctacgactgaatgttaagtggagaggcagagcaactg
cgcctgaaacacctgggtccactgtcgccgccacaagtgtttgccccgcgactccggtgagttttgctactttgaat
tgccccaggatcatatcgagggccccggcgacggcggtccggcttaccgccaggagagcttgcccgtagcctgat
tcgggagtttaccagcgccccctgctagttgagcgggacaggggacctgtgttctcactgtgatttgcaactgt
cctaaccttggtattacatcaagatctttgttgccatctctgtgctgagtataataaatacagaaattaaaatatac
tggggctcctatcgccatcctgtaaacgccaccgtcttccaccgcccagcaaaccaaggcgaaccttacctggta
cttttaacatctctccctctgtgatttacaacagtttcaaccagacggagtgagtctacgagagaacctctccga
gctcagctactccatcagaaaaaacaccacctccttacctgccgggaacgtacgagtgcgtcaccggccgctgca
ccacacctaccgctgaccgtaaaccagactttttccggacagacctcaataactctgtttaccagaacaggaggt
gagcttagaaaacccttagggtattaggccaaaggcgcagctactgtggggtttatgaacaattcaagcaactcta
cgggctatttctaattcaggtttctctagaatcggggttggggttattctctgtcttgtgattctctttattcttat
actaacgcttctctgcctaaggctcgccgctgctgtgtgcacatttgcatattatgtcagctttttaaacgctgg
ggctgccaccaagatgattaggtacataatcctaggtttactcacccttgcgtagccacggtaccacccaaaa
ggtggattttaaggagccagcctgtaatgttacattcgcagctgaagctaagtgaccactcttataaaatgc
accacagaacatgaaaagctgcttatcgcacaaaaacaaaattggcaagtatgctgtttatgctattttggcagc
caggtgacactacagagtataatgttacagttttccagggtaaaagtcataaaacttttatgtatacttttccatt
ttatgaaatgtgcgacattaccatgtacatgagcaaacagtataagttgtggccccacaaaattgtgtggaaaac
actggcactttctgctgcactgctatgctaattacagtgcctcgtttgggtctgtaccctactctatattaaataca
aaagcagacgcagctttattgaggaaaagaaaatgccttaatttactaagttacaaagctaagtgcaccactaact
gctttactcgtgcttgcaaaacaaattcaaaaagttagcattataattagaataggatttaaaccctccggtcat
ttcctgctcaataccattcccctgaacaattgactctatgtgggatatgctccagcgctacaaccttgaaagtcagg
cttcttggtatgtcagcatctgactttggccagcacctgtcccgcggatttgttccagtccaactacagcgaccac
cctaacagagatgaccaacacaaccaacgcggcgccgctaccggacttacatctaccacaaatacaccctaaagt
tctgcctttgtcaataactgggataacttgggcatgtgggtggttctccatagcgcttatgtttgtatgccttatta
ttatgtggctcatctgctgcctaaagcgcaaacgcgcccagaccacctatagtcctcatcattgtgtacaccc
aaacaatgatggaatccatagattggacggactgaaacacatgttcttttctcttacagtatgattaaatgagaca
tgattcctcgagtttttatattactgaccttgttgcgcttttttgtgcgtgctccacattggctgcggtttctca
categaagtagactgcattccagccttcacagtctattttgctttacggatttgtcaccctcacgctcatctgcage
ctcatcactgtggcatcgctttatccagtgcattgactgggtctgtgtgcgctttgcatactcagacaccatc
cccagtacagggacaggactatagctgagcttcttagaattctttaattatgaaatttactgtgacttttctgctg
attatttgcacctatctgcgttttgttccccgacctccaagcctcaaagacatatatcatgcagattcactcgta
tatggaatatccaagttgctacaatgaaaaagcgatctttccgaagcctgggttatatgcaatcatctctgttat
ggtgttctgcagtagcatcttagccctagctatatatccctaccttgacattggctggaaacgaatagatgccatg

aaccaccaactttccccgcgcccgtatgcttccactgcaacaagttgttgccggcggctttgtcccagccaatc
agcctcgccccactttctccacccccactgaaatcagctacttttaataacaggaggagatgactgacaccctag
atctagaatggacggaattattacagagcagcgctgctagaaagacgcagggcagcggccgagcaacagcgcat
gaatcaagagctccaagacatggttaacttgcaccagtgcaaaaggggtatcttttgtctggtaaagcaggccaaa
gtcacctacgacagtaataccaccggacaccgccttagctacaagttgccaaaccaagcgtcagaaattggtggtca
tggtgggagaaaaagcccattaccataactcagcactcggtagaaaccgaaggctgattcactcaccttgtcaagg
acctgaggatctctgcacccttattaagaccctgtgcggtctcaaagatcttattccctttaactaataaaaaaaa
ataataaagcatcacttacttaaaatcagtttagcaaatttctgtccagtttattcagcagcacctccttgcctcc
tcccagctctgggtattgcagcttctctctgggtgcaaactttctccacaatctaaatggaatgtcagtttctctct
gttctgtccatccgcacccactatcttcatgttgttgagatgaagcgcgcaagaccgtctgaagataccttcaa
ccccgtgtatccatatgacacggaaaccggctctccaactgtgccttttcttactcctcctttgtatcccccaat
gggtttcaagagagtgccccctgggggtactctctttgcgcctatccgaacctctagttacctccaatggcatgcttg
cgctcaaaatgggcaacggcctctctctggacgagcgcgcaaccttacctcccaaaatgtaaccactgtgagccc
acctctcaaaaaaaccaagtcaaacataaacctggaaatatctgcacccctcacagttacctcagaagccctaact
gtggctgccgcgcacctctaattggtcggggcaacacactcaccatgcaatcacaggccccgctaaccgtgcacg
actccaaacttagcattgccaccaaggaccctcacagtgtcagaaggaaagctagccctgcaaacatcaggccc
cctcaccaccaccgatagcagtacccttactatcactgcctcaccctcctaactactgccactggtagcttgggc
attgacttgaaagagcccatttatacacaaaatggaaaactaggactaaagtacggggctcctttgcatgtaacag
acgacctaaacactttgaccgtagcaactgggtccaggtgtgactattaataataacttcttgcaaactaaagttac
tgagccttgggttttgattcacaaggcaatatgcaacttaatgtagcaggaggactaaggattgattctcaaac
agacgccttatacttgatgttagttatccgtttgatgtcaaaaccaactaaatctaagactaggacagggcctc
ttttataaactcagcccacaacttgatattaactacaacaaaggcctttacttgttacagcttcaacaattc
caaaaagcttgaggttaacctaaagcactgccaaggggttgatgtttgacgctacagccatagccattaatgcagga
gatgggcttgaatttggttcacctaattgcacaaacacaaatcccccaaaaattggccatggcctagaat
ttgattcaacaaggctatggttcctaaactaggaactggccttagttttgacagcacaggtgccattacagtagg
aaacaaaaataatgataagctaactttgtggaccacaccagctccatctcctaactgtagactaaatgcagagaaa
gatgctaaactcactttggtccttaacaaatgtggcagtcataacttgcctacagtttcagttttggctgttaaag
gcagtttggtcctcaatatctggaacagttcaaagtgtcatcttattataagatttgacgaaaatggagtgtact
aaacaattccttcttgaccacagaatattggaactttagaaatggagatcttactgaaggcacagcctatacaaac
gctgttgatttatgcctaacctatcagcttatccaaaatctcacggtaaaaactgccaaaagtaacattgtcagtc
aagtttacttaaacggagacaaaactaaacctgtaacactaaccattacactaaacgggtacacaggaaacaggaga
cacaactccaagtgcatactctatgtcattttcatgggactgggtctggccacaactacattaatgaaatatttggc
acatcctcttacactttttcatacattgcccagaataaagaatcgtttggttatgtttcaacgtgtttattttt
caattgcagaaaatttcaagtcatttttctttagtagtatagccccaccaccacatagcttatacagatcacctg
accttaatcaaacacagaaaccttagtattcaacctgccacctcctcccaacacacaggtacacagtcctttc
tccccggttggtccttaaaaagcatcatatcatgggtaacagacatatcttaggtgttatattccacacggtttcc
tgtcgagccaaacgctcatcagtgatattaataaacctccccgggcagctcacttaagttcatgtcgtgtccagct
gctgagccacaggctgctgtccaacttgcggttgcttaacggggcggaaggagaagtccacgcctacatgggggt
agagtcataatcgtgcatcaggataggcggtggtgctgcagcagcgcggaataaactgctgccgcgcgcgtcc

gtcctgcaggaataacaacatggcagtggtctcctcagcgatgattcgcaccgcccgcagcataaggcgccttgtcc
tccgggcacagcagcgcacccctgatctcacttaaatcagcacagtaactgcagcacagcaccacaatatgtttcaa
aatcccacagtgcaaggcgctgtatccaaagctcatggcggggaccacagaaccacagtgccatcataccacaag
cgcaggtagattaagtggcgacccctcataaacacgctggacataaacattacctcttttggcatgttgtaattca
ccacctcccgtaccatataaacctctgattaaacatggcgccatccaccaccatcctaaaccagctggccaaaac
ctgcccgcgggtatacactgcaggaaccgggactggaacaatgacagtgagagcccaggactcgtaaccatgg
atcatcatgctcgtcatgatatcaatggtggcacaacacaggcacacgtgcatacacttctcaggattacaagct
cctcccgcgttagaacatatcccaggaacaacccattcctgaatcagcgtaaattcccacactgcaggggaagacc
tcgcacgtaactcacgttgtgcattgtcaaagtgttacattcgggcagcagcggatgatcctccagtatggtagcg
cgggtttctgtctcaaaaggaggtagacgatccctactgtacggagtgcgccgagacaaccgagatcgtgttggtc
gtagtgtcatgccaaatggaacgccggacgtagtcatatttctgaagcaaaaccaggtgccccggtgacaaacag
atctgcgtctccggtctcgccgcttagatcgctctgtgtagtagttgtagtatatccactctctcaaagcatccag
gcgccccctggcttcgggttctatgtaaactccttcatgcgcgctgcccgtgataacatccaccaccgcagaataa
gccacaccagccaaacctacacattcgttctgcgagtcacacacgggaggagcgggaagagctggaagaacctgt
ttttttttttattccaaaagattatccaaaacctcaaaatgaagatctattaagtgaacgcgtccctccggtgg
cgtggtcaaactctacagccaaagaacagataatggcatttgaagatgttgcaaatggcttccaaaaggcaaac
ggccctcacgtccaagtggacgtaaaaggctaaacccttcagggtgaatctcctctataaacattccagcaccttca
accatgccccaaataattctcatctcgccaccttctcaatatatctctaagcaaatcccgaatattaagtccggcca
ttgtaaaaatctgctccagagcgccctccaccttcagcctcaagcagcgaatcatgattgcaaaaattcaggttcc
tcacagacctgtataagattcaaaagcggaaacattaacaaaaataaccgcgatcccgtaggtcccttcgcagggcc
gctgaacataatcgtgcaggctcgcacggaccagcgcggccacttccccgccaggaaacctgacaaaagaaccac
actgattatgacacgcatactcggagctatgctaaccagcgtagccccgatgtaagcttggtgcatgggcggcgat
ataaaatgcaaggctgctgctcaaaaaatcaggcaaaagcctcgcgcaaaaaagaaagcacatcgtagtcatgctcat
gcagataaaggcaggtaagctccggaaccaccacagaaaaagacaccatttttctctcaaacatgtctgcgggttt
ctgcataaacacaaaaataaaataacaaaaaacattttaaacattagaagcctgtcttacaacaggaaaaacaacc
ttataagcataagacggactacggccatgccggcgtgaccgtaaaaaaactggtcaccgtgattaaaaagcaccac
cgacagctcctcggtcatgtccggagtcataatgtaagactcggtaaacacatcaggttgattcacatcggtcagt
gctaaaaagcgaccgaaatagcccgggggaatacataccgcaggcgtagagacaacattacagcccccataggag
gtataacaaaattaataggagagaaaaacacataaacacctgaaaaaccctcctgcctaggcaaaatagcaccctc
ccgctccagaacaacatacagcgcttccacagcggcagccataacagtcagccttaccagtaaaaaagaaaacct
ttaaaaaaacaccactcgacacggcaccagctcaatcagtcacagtgtaaaaaaggccaagtgcagagcgagtat
atataggactaaaaaatgacgtaacggttaaagtcacaaaaaacaccagaaaaaccgcacgcgaacctacgcca
gaaacgaaagccaaaaaacccacaacttctcaaatcgtcacttccgttttcccacgttacgtaacttcccatttt
aagaaaactacaattcccaacacatacaagttactccgcctaaaaacctacgtcacccgccccgttcccacgcccc
gcgccacgtcacaaactccacccccctcattatcatattggcttcaatccaaaataaggtatattattgatgatg

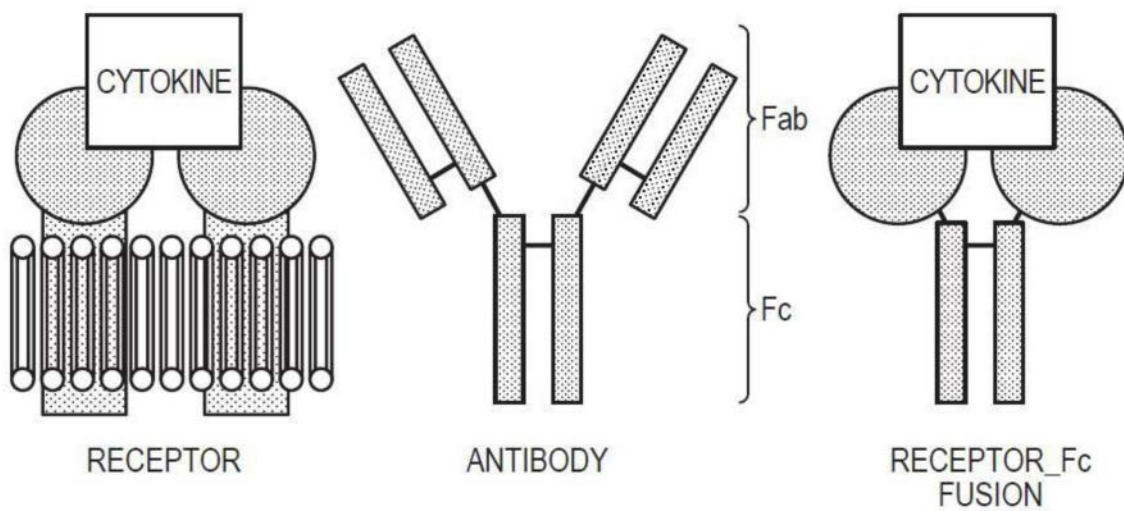


图1A

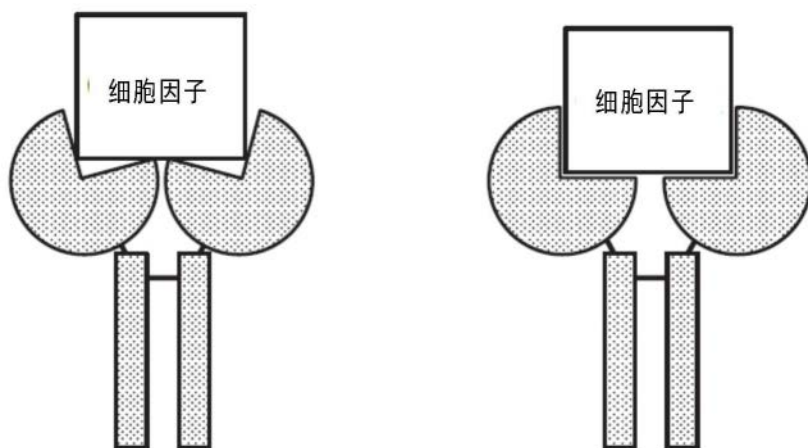


图1B

人类 CH1 结构域

IgA1 PKVFPLS.....LCSTQPDGNV-.....VIACLVQGF.....fPQEPISVTVWSESGQV.....tARNFPPSQDASGDL.....YTTSQTLTIPA.....TQCLAGKSVTCHVKH.....YTNPSQDVT
 IgA2 PKVFPLS.....LDSTPDQGNV-.....VVACLVQGF.....fPQEPISVTVWSESGQV.....tARNFPPSQDASGDL.....YTTSQTLTIPA.....TQCPDGKSVTCHVKH.....YTNPSQDVT
 IgD PDVFPLIs.....GCRHPKDNSPV.....VLACLTGy.....HPTSVTVTWYMTQsq.....PORTPEIORDSY.....YMTSSQLSTP-.....LQOMRQGEYKCVVOH.....TASKSKKEIF
 IgE PSVEPLTf.....cKNIPSNATSV.....TLGCLATGy.....FPEPVMVTWDTGSLn.....GTTMTLPATTLTlsg...hYATISLLTVSG.....-AWAKQMFTCRVAHt.....pSSTDWVDNKTfS
 IgG1 PSVEFLA.....PSSKSTSGGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNISGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSWTVPS.....-SSLGTQTYTCNVNH.....KPSNTKVDKKVE
 IgG2 PSVEFLA.....PCSRSTSESTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNISGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSWTVPS.....-SNFGTQTYTCNVH.....KPSNTKVDKTVE
 IgG3 PSVEFLA.....PCSRSTSGGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNISGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSWTVPS.....-SSLGTQTYTCNVNH.....KPSNTKVDKRVE
 IgG4 PSVEFLA.....PCSRSTSESTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNISGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSWTVPS.....-SSLGTQTYTCNVH.....KPSNTKVDKRVE
 IgM FTLEPLVs.....CENSPSDTSSV.....AVGCLAQDf.....LPDSITLSWKYKNN.....SDISSTRGFPSVLrg..gkYAATSQVLLPSk.....dVMQGTDEHVVCVKVOH.....-PNGNKEKNVP

人类 CH2 结构域

IgA1 PRLSLHRp.....ALEDLLGSEA.....NLTCILTlG.....rDASGVTFWTTPSSG.....KSAVQGPPEPDLcg.....cYSVSSVLPGCA.....EPWNHGKTFCTTAAY.....PESKTPLTATLS
 IgA2 PRLSLHRp.....ALEDLLGSEA.....NLTCILTlG.....rDASGATFTWTPSSG.....KSAVQGPPEPDLcg.....cYSVSSVLPGCA.....QPNHGETFTCTAAH.....PELKTPLTANIT
 IgD PAVQDL-.....-MLRDKA--.....TFTCFVGS.....DLKDAHLTWEVAGKvpt.....ggVEEGLERHSNGS-.....QSQHSRLTLPR.....SLWNAGSTVCTCTINH.....-PSLPPQRLMA
 IgE PTVKIL-.....-QSSCDGGGHFpp..tiQLLCLVSGy.....TPGTNITWLEDQvm.....dvdLSTASTTQEGEL.....ASTQSELTLSQ.....KHWLSDRYTCQVYq.....GHTFEDSTKKCA
 IgG1 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTGVVDvs.....hEDEPKENWYVDGvev.....hNAKTKPREEQYNST.....YRVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS
 IgG2 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTGVVDvs.....hEDEPKENWYVDGvev.....hNAKTKPREEQFns...tFRVSVLTVVH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPAPIEKTIS
 IgG3 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTGVVDvs.....hEDEPKENWYVDGvev.....hNAKTKPREEQYNST.....FRVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS
 IgG4 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTGVVDvs.....qEDPEVQFNWYVDGve.....qEDPEVQFNWYVDGve.....VHNAKTKPREEQFns...tYRVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPSSIEKTIS
 IgM PKVSFVf.....PPRDGFFGNPRk.....sKLICQATGf.....SPRQIQVSWLRECKqvsg.vttqQVQAEAKESGPTT.....YKVTSTILTIKE.....SDWLQSQMFTCRVDH.....-RGLTFQQNAS

图2

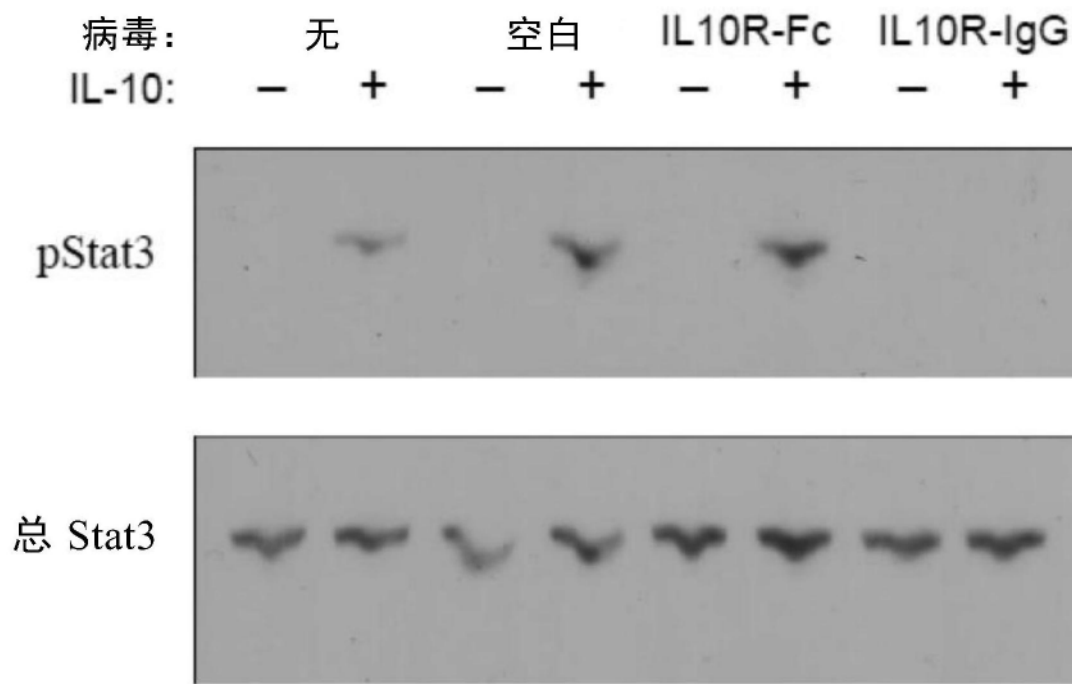


图3