



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102007145 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 200980113198.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.02.10

C07K 14/78 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/10 (2006.01)

61/065,955 2008.02.14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.10.14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/000830 2009.02.10

(87) PCT申请的公布数据

WO2009/102421 EN 2009.08.20

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 雷·坎普豪森 布伦特·莫斯

斯图尔特·伊曼纽尔

戴维·法布里齐奥

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

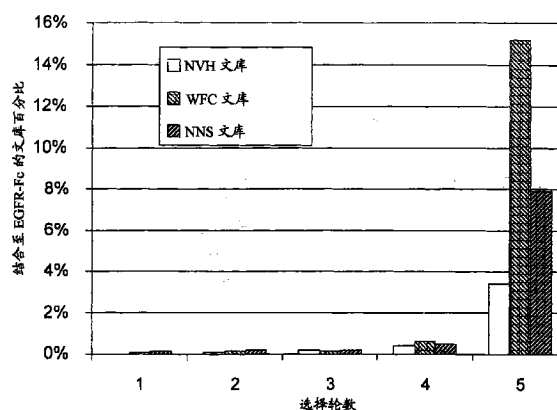
权利要求书 2 页 说明书 47 页 附图 14 页

(54) 发明名称

基于结合 EGFR 的工程化蛋白质的靶向治疗剂

(57) 摘要

本发明涉及与表皮生长因子受体 (EGFR) 结合的单域蛋白质。本发明还涉及供诊断、研究和治疗应用中使用的单域蛋白质。本发明进一步涉及包含此类蛋白质的细胞、编码此类蛋白质或其片段的多核苷酸、及包含编码该新蛋白质的多核苷酸的载体。



1. 一种包含纤连蛋白 III 型 (Fn3) 结构域的多肽, 其中所述 Fn3 结构域 (i) 包含环 AB、环 BC、环 CD、环 DE、环 EF、和环 FG ; (ii) 选自环 BC、DE 和 FG 中的至少一个环相对于人 Fn3 结构域的相应环的序列具有改变的氨基酸序列 ; 且 (iii) 以小于 10^{-4}M 的解离常数结合人表皮生长因子受体 (EGFR)。

2. 权利要求 1 的多肽, 其中所述 Fn3 结构域以小于 10^{-6}M 的解离常数结合人 EGFR。

3. 权利要求 1 或 2 的多肽, 其中环 BC 和环 FG 相对于人 Fn3 结构域的相应环的序列具有改变的氨基酸序列。

4. 权利要求 1-3 任一项的多肽, 其中所述 Fn3 结构域是第十纤连蛋白 III 型结构域 ($^{10}\text{Fn3}$)。

5. 权利要求 4 的多肽, 其中所述 $^{10}\text{Fn3}$ 结构域包含选自下列的多肽 :

(i) 包含 SEQ ID NO : 207-231 中任一氨基酸序列的多肽 ; 和

(ii) 包含与 SEQ ID NO : 207-231 中任一氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽。

6. 权利要求 1-5 任一项的多肽, 进一步包含一个或多个选自下述的药理学 (PK) 模块 : 聚氧化烯模块、人血清白蛋白结合蛋白、唾液酸、人血清白蛋白、IgG、IgG 结合蛋白、运铁蛋白、和 Fc 片段。

7. 权利要求 6 的多肽, 其中所述 PK 模块是聚氧化烯模块, 且所述聚氧化烯模块是聚乙二醇。

8. 权利要求 6 的多肽, 其中所述 PK 模块和所述 Fn3 结构域是藉由至少一个二硫键、肽键、多肽、聚合糖、或聚乙二醇模块可操作连接的。

9. 权利要求 8 的多肽, 其中所述 PK 模块和所述 Fn3 结构域是藉由包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 232-235 的多肽可操作连接的。

10. 权利要求 1-9 任一项的多肽, 还包含选自抗体模块、脂蛋白衍生物、四连蛋白衍生物、avimer、锚蛋白衍生物、以及第二纤连蛋白 III 型 (Fn3) 结构域的第二结构域, 其中所述第二结构域与人蛋白质结合, 且其中所述第二 Fn3 结构域 (i) 包含环 AB、环 BC、环 CD、环 DE、和环 FG ; (ii) 选自环 BC、DE、和 FG 中的至少一个环相对于人 Fn3 结构域的相应环的序列具有随机化的氨基酸序列 ; 且 (iii) 结合不被人 Fn3 结构域结合的人蛋白质。

11. 权利要求 10 的多肽, 其中所述第二结构域是第二 Fn3 结构域, 且其中所述第二 Fn3 结构域以小于 10^{-4}M 的解离常数结合所述人蛋白质。

12. 权利要求 10 或 11 的多肽, 其中所述第二结构域是第二 Fn3 结构域, 且其中所述第二 Fn3 结构域是第十纤连蛋白 III 型结构域 ($^{10}\text{Fn3}$)。

13. 权利要求 10-12 中任一项的多肽, 其中所述第二结构域所结合的人蛋白质选自 IGF-IR、EGFR、或 VEGFR2。

14. 权利要求 12 的多肽, 其中所述第二 $^{10}\text{Fn3}$ 结构域包含选自下述的多肽 :

(i) 包含 SEQ ID NO : 2-231 和 236 中任一氨基酸序列的多肽 ; 和

(ii) 包含与 SEQ ID NO : 2-231 和 236 中任一氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽。

15. 权利要求 10-14 任一项的多肽, 其中所述 Fn3 结构域和所述第二结构域是藉由至少一个二硫键、肽键、多肽、聚合糖、或聚乙二醇模块可操作连接的。

16. 权利要求 10-15 任一项的多肽,其中所述多肽抑制转化生长因子 α (TGF- α) 或皮生长因子 (EGF) 结合 EGFR,且在基于细胞的测定中在亚 IC_{50} 浓度不活化人 EGFR。

17. 权利要求 10-16 任一项的多肽,其中所述多肽与抗 EGFR 抗体竞争对 EGFR 的结合。

18. 权利要求 10-17 任一项的多肽,其中所述多肽以小于 $10\mu M$ 的 IC_{50} 抑制总 EGF 刺激的 EGFR 磷酸酪氨酸活化。

19. 权利要求 10-18 任一项的多肽,其中所述多肽以小于 $10\mu M$ 的 IC_{50} 抑制 ERK 磷酸化。

20. 权利要求 10-19 任一项的多肽,其中所述多肽以小于 $10\mu M$ 的 IC_{50} 抑制 AKT 磷酸化。

21. 权利要求 10-20 任一项的多肽,其中所述多肽已经过去免疫而消除了一个或多个 T 细胞表位。

22. 权利要求 1-21 任一项的多肽,其中所述 Fn3 结构域是通过包括下述步骤的方法选择的 :a) 生成一群候选 RNA 分子,它们各自包含与人 Fn3 结构域编码序列不同的候选第十纤连蛋白 III 型 (Fn3) 结构域序列,所述 RNA 分子各自包含可操作连接于所述候选 Fn3 结构域编码序列的翻译起始序列和起始密码子且各自可操作连接于 3' 末端的核酸-嘌呤霉素接头 ;b) 在体外翻译所述候选 Fn3 结构域编码序列以生成一群候选 RNA-Fn3 融合物 ;c) 使所述一群候选 RNA-Fn3 融合物与 EGFR 接触 ;并 d) 选择这样的 RNA-Fn3 融合物,其蛋白质部分对 EGFR 的结合亲和力或特异性相对于所述人 Fn3 对 EGFR 的结合亲和力或特异性有所改变。

23. 一种包含权利要求 1-22 任一项的多肽的药学可接受组合物,其中所述组合物基本上不含内毒素。

基于结合 EGFR 的工程化蛋白质的靶向治疗剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 2 月 14 日提交的美国临时申请流水号 61/065,955 的权益。通过述及将上述申请的所有教导并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及与表皮生长因子受体 (EGFR) 结合的单域蛋白质。本发明还涉及涉及供诊断、研究和治疗应用中使用的单域蛋白质。本发明进一步涉及包含此类蛋白质的细胞、编码此类蛋白质或其片段的多核苷酸、及包含编码该创新蛋白质的多核苷酸的载体。

[0004] 发明背景

[0005] 受体酪氨酸激酶的 HER 家族是细胞生长、分化和存活的重要介导体。该受体家族包括四个截然不同的成员,包括表皮生长因子受体 (EGFR、ErbB1、或 HER1)、HER2 (ErbB2)、HER3 (ErbB3) 和 HER4 (ErbB4 或 tyro2)。

[0006] 人们认为 HER 家族与人恶性肿瘤具有因果关系。Her 受体家族的异常活性与乳腺癌有关。EGFR、Her-3、和 Her-4 常常在卵巢颗粒细胞肿瘤中表达 (Leibl, S. 等, Gynecol Oncol 101:18-23(2005))。尤其是在乳腺、膀胱、肺、头、颈和胃的癌症以及成胶质细胞瘤中观察到 EGFR 表达升高。

[0007] EGFR 受体表达升高可能与同一肿瘤细胞的 EGFR 配体即转化生长因子 α (TGF- α) 的产量升高有关,后者导致受体经由自分泌刺激途径被活化。Baselga 和 Mendelsohn, Pharmac. Ther. 64:127-154(1994)。人们已经对针对 EGFR 或其配体 TGF- α 和 EGF 的单克隆抗体在此类恶性肿瘤的治疗中作为治疗剂进行了评估。参见例如 Baselga 和 Mendelsohn., 见上文;Masui 等, Cancer Research 44:1002-1007(1984);及 Wu 等, J. Clin. Invest. 95:1897-1905(1995)。

[0008] HER 受体在细胞中通常以不同的组合形式存在。有人认为它们的异二聚化可增加对各种 HER 配体的细胞应答的多样性 (Earp 等, Breast Cancer Research and Treatment 35:115-132(1995))。EGFR 受到至少 6 种不同配体的结合:表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、双调蛋白 (amphiregulin)、肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF)、 β 细胞调节素 (betacellulin) 和上皮调节蛋白 (epiregulin) (Groenen 等, Growth Factors 11:235-257(1994))。

[0009] EGF 结合与 HER2 形成异二聚体的 EGFR,活化 EGFR 并导致 HER 转磷酸化。异二聚化和 / 或转磷酸化作用活化 HER2 酪氨酸激酶。

[0010] 治疗剂的潜在副作用是在确定治疗方案时要考虑的一个重要问题。举例而言,已经发现 cetuximab (ErbixTM), 一种抗 EGFR 抗体,与可能危及生命的输液反应有关 (Thomas, M., Clin J Oncol Nurs. 9(3):332-8(2005))。吉非替尼 (Gefitinib) (IressaTM) 和埃罗替尼 (erlotinib) (TarcevaTM) (都是 EGFR 特异性小分子抑制剂) 与间质性肺病风险有关 (Sandler A., Oncology 20(5Suppl 2):35-40(2006))。每个患者可能具有特定类型并发症的倾向,会影响药物治疗的选择。通过提供更多的治疗选项,医师就可以为每个患者

选择具有最佳副作用谱的治疗剂。本发明提供在治疗方法中有用的新型多肽和蛋白质治疗剂。

[0011] 鉴于 EGFR 信号传导在病症（包括癌症和增殖性病症）中发挥的作用，理想的是制造能选择性调控、抑制或阻断 EGFR 的治疗剂，诸如 EGFR 结合多肽。

[0012] 另外，理想的是，此类治疗剂以成本经济的方式表达，拥有期望的生物物理特性（例如 T_m，基本上是单体，或适当折叠的），尺寸小以便渗透组织，及具有合适的体内半衰期。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明的一个方面提供一种包含纤连蛋白 III 型 (Fn3) 结构域的多肽，其中所述 Fn3 结构域 (i) 包含环 AB、环 BC、环 CD、环 DE、环 EF、和环 FG；(ii) 至少一个选自环 BC、DE 和 FG 的环相对于人 Fn3 结构域的相应环的序列具有改变的氨基酸序列；且 (iii) 结合人表皮生长因子受体 (EGFR)。在一些实施方案中，所述多肽以小于 10⁻⁴M、10⁻⁵M、10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M、或 10⁻⁹M 的 K_d 结合 EGFR。在一些实施方案中，Fn3 结构域的至少两个环是改变的。在一些实施方案中，环 BC 和环 FG 相对于人 Fn3 结构域的相应环的序列具有改变的氨基酸序列。在一些实施方案中，Fn3 结构域的至少三个环是改变的。在一些实施方案中，Fn3 结构域的至少两个环结合 EGFR。在一些实施方案中，Fn3 结构域的至少三个环结合 EGFR。在一些实施方案中，在选自环 BC、DE、和 FG 的至少一个环中至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 个氨基酸被不同于野生型序列的氨基酸所替代。在一些实施方案中，在选自环 BC、DE、和 FG 的至少一个环中删除或添加了至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 个氨基酸。在一些实施方案中，EGFR 结合多肽以大于 10⁻⁶M、10⁻⁵M、10⁻⁴M、10⁻³M、或 10⁻²M 的 K_d 与相关受体（诸如 HER2 或 HER3）结合。在一些实施方案中，EGFR 结合多肽抑制 EGFR 结合一种或多种 EGFR 配体。在一些实施方案中，EGFR 结合多肽抑制 EGFR 信号传导。

[0015] 在一些实施方案中，EGFR 结合多肽是第十纤连蛋白 III 型结构域 (¹⁰Fn3)。在一些实施方案中，¹⁰Fn3 包含 SEQ ID NO:207-231 中的任一氨基酸序列。在一些实施方案中，¹⁰Fn3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:215。在一些实施方案中，¹⁰Fn3 包含与 SEQ ID NO:207-231 中的任一至少序列 75、80、85、90、95、或 98% 相同的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中，EGFR 结合多肽进一步包含一个或多个选自下述各项的药理学 (PK) 模块：聚氧化烯模块、人血清白蛋白结合蛋白质、唾液酸、人血清白蛋白、运铁蛋白、IgG、IgG 结合蛋白、和 Fc 片段。在一些实施方案中，PK 模块是聚氧化烯模块且所述聚氧化烯模块是聚乙二醇 (PEG)。在一些实施方案中，PEG 模块是经 Cys 或 Lys 氨基酸共价连接于 EGFR 结合多肽的。在一些实施方案中，EGFR 结合多肽是 Fn3 结构域。在一些实施方案中，PEG 介于约 0.5kDa 和约 100kDa 之间。

[0017] 在一些实施方案中，PK 模块改进多肽的一项或多项药理学特性，例如生物利用度、血清半衰期、体内稳定性、和药物分布。在一些实施方案中，相对于单独的 EGFR 结合多肽，PK 模块将 EGFR 结合多肽的血清半衰期延长至少 20、30、40、50、70、90、100、120、150、200、400、600、800% 或更多。在一些实施方案中，所述进一步包含 PK 模块的 EGFR 结合多肽具有至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、或 14 天的血清体内半衰期。

[0018] 在一些实施方案中，PK 模块和 Fn3 结构域是藉由至少一个二硫键、肽键、多肽、聚糖、或聚乙二醇模块可操作连接的。在一些实施方案中，PK 模块和 Fn3 结构域是藉由包

含氨基酸序列 SEQ ID NO :232-235 的多肽可操作连接的。

[0019] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽进一步包含第二结构域。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽进一步包含抗体模块。在一些实施方案中,抗体模块小于 50KDa。在一些实施方案中,抗体模块小于 40KDa。在一些实施方案中,抗体模块是单链 Fv(scFv)、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂、二硫化物连接的 Fv(sdFv)、Fv、双抗体、或完整抗体。在一些实施方案中,抗体模块是单域抗体。在一些实施方案中,抗体模块结合人蛋白质。在一些实施方案中,抗体模块结合 IGF-IR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、c-Kit、人 p185 受体样酪氨酸激酶、HER2、HER3、c-Met、叶酸受体、PDGFR、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、人血管内皮生长因子 (VEGF) A、VEGF C、VEGF D、人 CD20、人 CD18、人 CD11a、人凋亡受体 -2(Apo-2)、人 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白、人 GPIIb-IIIa 整联蛋白、干细胞因子 (SCF)、EGFR、或人 CD3。

[0020] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽进一步包含脂笼蛋白衍生物、四连蛋白衍生物、avimer、或锚蛋白衍生物。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽结合人蛋白质。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽结合 IGF-IR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、c-Kit、人 p185 受体样酪氨酸激酶、HER2、HER3、c-Met、叶酸受体、PDGFR、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、人血管内皮生长因子 (VEGF) A、VEGF C、VEGF D、人 CD20、人 CD18、人 CD11a、人凋亡受体 -2(Apo-2)、人 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白、人 GPIIb-IIIa 整联蛋白、干细胞因子 (SCF)、EGFR、或人 CD3。

[0021] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽是 Fn3 结构域,且进一步包含第二 Fn3 结构域。该第二 Fn3 结构域 (i) 包含环 AB、环 BC、环 CD、环 DE、和环 FG;(ii) 选自环 BC、DE、和 FG 中的至少一个环相对于人 Fn3 结构域的相应环的序列具有改变的氨基酸序列;且 (iii) 结合人 Fn3 结构域不结合的人蛋白质。在一些实施方案中,第二 Fn3 结构域结合 IGF-IR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、c-Kit、人 p185 受体样酪氨酸激酶、HER2、HER3、c-Met、叶酸受体、PDGFR、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、人血管内皮生长因子 (VEGF) A、VEGF C、VEGF D、人 CD20、人 CD18、人 CD11a、人凋亡受体 -2(Apo-2)、人 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白、人 GPIIb-IIIa 整联蛋白、干细胞因子 (SCF)、EGFR、或人 CD3。在一些实施方案中,第二 Fn3 结构域以小于 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、或 10^{-9} M 的 K_D 结合人蛋白质。在一些实施方案中,选自第二 Fn3 结构域环 BC、DE、和 FG 的至少一个环中的至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 个氨基酸被不同于野生型序列的氨基酸所替代。在一些实施方案中,在选自环 BC、DE、和 FG 中的至少一个环中删除或添加了至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 个氨基酸。

[0022] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽是结合 EGFR 的 ¹⁰Fn3 结构域,其进一步包含第二 ¹⁰Fn3 结构域。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域结合 IGF-IR。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域结合 VEGFR2。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域结合 EGFR。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域包含 SEQ ID NO :2-125、184-204、或 236 中的任一氨基酸序列。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域包含与 SEQ ID NO :2-125、184-204、或 236 中的任一氨基酸序列至少 75、80、85、90、55、或 98% 相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域包含 SEQ ID NO :126-183、205、或 206 中的任一氨基酸序列。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域包含与 SEQ ID NO :126-183、205、或 206 中的任一氨基酸序列至少 75、80、85、90、55、或 98% 相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域包含 SEQ ID NO :207-231 中的任一氨基酸序列。在一些实施方案中,第二 ¹⁰Fn3 结构域包含与 SEQ ID NO :207-231 中的任一氨基酸序列至少 75、80、85、90、55、或 98% 相同的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中, EGFR 结合多肽进一步包含藉由至少一个二硫键、肽键、多肽、聚合糖、或聚乙二醇模块 (PEG) 可操作连接的第二结构域。在一些实施方案中, PEG 介于约 0.5kDa 和约 100kDa 之间。在一些实施方案中, PEG 是藉由 Cys 或 Lys 残基缀合于多肽和第二结构域的。在一些实施方案中, 至少 EGFR 结合多肽或第二结构域具有不超过一个 Cys 或 Lys。在一些实施方案中, 所述一个 Cys 或 Lys 位于氨基酸序列中的非野生型位置。在一些实施方案中, EGFR 结合多肽包含 SEQ ID NO:235。

[0024] 在一个方面, 本申请提供这样的 EGFR 结合多肽, 其可抑制转化生长因子 α (TGF- α) 或表皮生长因子 (EGF) 结合 EGFR, 且在基于细胞的测定法中在亚 IC_{50} 浓度不活化人 EGFR。在一些实施方案中, EGFR 结合多肽抑制 EGFR 结合一种或多种 EGFR 配体。

[0025] 在一个方面, 本申请提供与抗 EGFR 抗体竞争对 EGFR 的结合的 EGFR 结合多肽。在一些实施方案中, 抗 EGFR 抗体选自 panitumumab、nimotuzumab、zalutumumab、EMD72000、和 cetuximab。

[0026] 在一个方面, 本申请提供以小于 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、或 10^{-9} M 的 IC_{50} 抑制总 EGF 刺激的 EGFR 磷酸酪氨酸活化 (total EGF-stimulated phosphotyrosine activation of EGFR) 的 EGFR 结合多肽。

[0027] 在一个方面, 本申请提供以小于 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、或 10^{-9} M 的 IC_{50} 抑制 ERK 磷酸化的 EGFR 结合多肽。

[0028] 在一个方面, 本申请提供以小于 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、或 10^{-9} M 的 IC_{50} 抑制 AKT 磷酸化的 EGFR 结合多肽。

[0029] 在一个方面, 本申请提供在依赖 EGFR 活化的细胞系中在基于细胞的测定法中诱导凋亡的 EGFR 结合多肽。在一些实施方案中, EGFR 结合物阻断 EGFR 活性, 如凋亡控制、磷酸化或二聚化。

[0030] 在一个方面, 本申请提供经过去免疫化 (deimmunized) 以消除一个或多个 T 细胞表位的 EGFR 结合多肽。在一个方面, 本申请提供经过去免疫化以消除一个或多个 B 细胞表位的 EGFR 结合多肽。

[0031] 在一个方面, 本申请提供通过包括下述步骤的方法选择的 EGFR 结合性 Fn3 结构域: a) 生成一群候选核酸分子, 每个核酸分子包含与人 Fn3 结构域编码序列不同的候选纤维连蛋白 III 型 (Fn3) 结构域序列, 所述核酸分子各自包含可操作连接至所述候选 Fn3 结构域编码序列的翻译起始序列和起始密码子且各自在 3' 末端可操作连接于核酸-嘌呤霉素接头; b) 在体外翻译所述候选 Fn3 结构域编码序列以生成一群候选核酸-Fn3 融合物; c) 使所述一群候选核酸-Fn3 融合物与 EGFR 接触; 并 d) 选择这样的核酸-Fn3 融合物, 其蛋白质部分对 EGFR 的结合亲和力或特异性相对于所述人 Fn3 对 EGFR 的结合亲和力或特异性有所改变。在一些实施方案中, 对于所选择的核酸-Fn3 融合物通过下述方式加以进一步优化: 改变一个或多个核酸残基并再次用 EGFR 筛选融合物以选择改良的结合物 (improved binders)。在一些实施方案中, 候选核酸分子是 RNA。在一些实施方案中, 候选核酸分子是 DNA。在一些实施方案中, 核酸-嘌呤霉素是 DNA-嘌呤霉素。在一些实施方案中, Fn3 结构域是 ^{10} Fn3。

[0032] 在一个方面, 本申请提供包含 EGFR 结合多肽的药学可接受组合物。在一些实施方案中, 组合物基本上不含内毒素。在一些实施方案中, 组合物基本上没有微生物污染, 使之

适合于体内施用。组合物可配制成例如供 IV、IP 或皮下施用。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 结合一种或多种 EGFR 配体。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 信号传导。

[0033] 本申请的一个方面提供用于治疗患有癌症的受试者的方法,该方法是通过施用单独的 EGFR 结合多肽或 EGFR 结合多肽与其它细胞毒剂或治疗剂的组合。癌症可以是下述一项或多项,例如乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、骨肉瘤、宫颈癌、前列腺癌、肺癌、滑膜癌、成胶质细胞瘤、胰腺癌、或其它与非致瘤细胞相比在生理学上 EGFR 水平升高、上调、突变或改变的待确定的癌症。

[0034] 本申请的一个方面提供通过施用单独的 EGFR 结合多肽或与其它细胞毒剂或治疗剂组合的 EGFR 结合多肽来治疗患有癌症的受试者的方法。具体而言,优选的细胞毒剂和治疗剂包括多西他塞 (docetaxel)、帕利他塞 (paclitaxel)、多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、曲妥单抗 (trastuzumab)、卡培他滨 (capecitabine)、他莫昔芬 (tamoxifen)、托瑞米芬 (toremifene)、来曲唑 (letrozole)、阿那曲唑 (anastrozole)、氟维司群 (fulvestrant)、依西美坦 (exemestane)、戈舍瑞林 (goserelin)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、卡铂 (carboplatin)、顺铂 (cisplatin)、地塞米松 (dexamethasone)、安肽 (antide)、贝伐单抗 (bevacizumab)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、亚叶酸 (leucovorin)、左旋咪唑 (levamisole)、伊立替康 (irinotecan)、依托泊苷 (etoposide)、托泊替康 (topotecan)、吉西他滨 (gemcitabine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、雌莫司汀 (estramustine)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、阿巴瑞克 (abarelix)、唑来膦酸盐 (zoledronate)、链佐星 (streptozocin)、利妥昔单抗 (rituximab)、伊达比星 (idarubicin)、白消安 (busulfan)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、氟达拉滨 (fludarabine)、伊马替尼 (imatinib)、阿糖胞苷 (cytarabine)、替伊莫单抗 (ibritumomab)、托西莫单抗 (tositumomab)、干扰素 α -2b (interferon alpha-2b)、美法仑 (melphalam)、bortezomib、六甲蜜胺 (altretamine)、天冬酰胺酶 (asparaginase)、吉非替尼、埃罗替尼、抗 EGF 受体抗体 (例如西妥昔单抗 (cetuximab) 或 panitumumab)、伊沙匹隆 (ixabepilone)、和埃博霉素 (epothilone) 或其衍生物。更优选的是,治疗剂是铂剂 (诸如卡铂、奥沙利铂、顺铂)、紫杉烷 (taxane) (诸如帕利他塞、多西他塞)、吉西他滨、或喜树碱 (camptothecin)。

[0035] 本申请的另一个方面提供包含一种或多种本文中所描述的要素及关于使用那些要素的说明书的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包括单独的 EGFR 结合多肽或 EGFR 结合多肽与第二治疗剂,及关于使用单独的 EGFR 结合多肽或 EGFR 结合多肽与第二治疗剂来抑制癌细胞生长的说明书,和 / 或关于使用单独的 EGFR 结合多肽或 EGFR 结合多肽与第二治疗剂来治疗癌症患者的方法的说明书。

[0036] 本申请的又一个方面提供包含编码 EGFR 结合多肽的多核苷酸的细胞。还包括含有编码此类蛋白质的多核苷酸的载体。所述序列优选经过优化以使在所使用的细胞类型中的表达最大化。优选的是在大肠杆菌中表达。也可以在例如真核微生物 (包括酵母,例如毕赤氏酵母 (pichia) 或酿酒酵母 (cervaisea)) 或蓝绿藻中表达 EGFR 结合多肽。可以改造酵母细胞以产生期望的糖基化。本发明的细胞可以是哺乳动物细胞。在一个方面,可以改造哺乳动物细胞以产生期望的糖基化。在一个方面,细胞表达基于纤连蛋白的支架蛋白。

在一个方面,编码基于纤连蛋白的支架蛋白的多核苷酸经过密码子优化以便于在所选择的细胞中表达。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1。用于分离 EGFR 结合性克隆的选择谱

[0039] 显示了每一轮选择后来自实施例 1 的文库中结合于 EGFR-Fc 的百分比。经过 5 轮选择后每种 RNA- 蛋白质融合物文库均结合靶物。

[0040] 图 2。基于细胞的竞争性配体结合测定

[0041] 在基于细胞的竞争性配体结合测定系统(详情见材料和方法部分)中测定在 PBS 缓冲液或 Tris 缓冲液中稀释的 LA-1(抗 EGFR 单克隆抗体)和 679F09(EGFR 结合克隆) Midscale 蛋白质制备物。LA-1(圆圈)、679F09 Midscale PBS(正方形)和 679F09 Midscale Tris(三角形)都与 Eu-EGF 竞争对 A431 细胞上 EGFR 的结合。 IC_{50} 为:LA-1(2.254nM)、679F09 Midscale PBS(13.018nM)和 679F09 Midscale Tris(20.002nM)。

[0042] 图 3。基于细胞的竞争性配体结合测定

[0043] 在基于细胞的竞争性配体结合测定系统中测定 LA-1(抗 EGFR 单克隆抗体)、679F09(EGFR 结合克隆, Midscale 制备物)和 867A01(EGFR 结合克隆, HTPP 制备物)。LA-1(圆圈)、679F09(正方形)和 867A01(三角形)都与 Eu-EGF 竞争对 A431 细胞上 EGFR 的结合。 IC_{50} 为:LA-1(6.641nM)、679F09(14.726nM)和 867A01(258.258nM)。

[0044] 图 4。基于细胞的竞争性配体结合测定

[0045] 在基于细胞的竞争性配体结合测定中测定 LA-1(抗 EGFR 单克隆抗体)和 679F03(EGFR 结合克隆, Midscale 制备物)。LA-1(正方形)和 679F03(三角形)与 Eu-EGF 竞争对 A431 细胞上 EGFR 的结合。 IC_{50} 为:LA-1(6.944nM)和 679F03(26.847nM)。

[0046] 图 5。EGFR 特异性克隆的优化

[0047] 如实施例 4 中所述用于进一步优化 EGFR 结合克隆的过程的示意图。

[0048] 图 6 描绘本申请全文所述序列。

[0049] 发明详述

[0050] 定义

[0051] “多肽”指两个或更多个氨基酸的任何序列,无论长度、翻译后修饰、或功能。“多肽”、“肽”、和“蛋白质”在本文中可互换使用。多肽可包括天然氨基酸和非天然氨基酸,诸如美国专利 No. 6,559,126(通过述及收入本文)中披露的那些。还可以以多种标准化学方式中任一方式修饰多肽(例如可以用保护基团修饰氨基酸;可以将羧基末端氨基酸变成末端酰胺基团;可以用基团修饰氨基末端残基以例如增强亲脂性;或者,可以化学糖基化或以其它方式修饰多肽以提高稳定性或延长体内半衰期)。多肽修饰可包括将另一结构(诸如环状化合物或其它分子)搭接到多肽上,而且还可包括包含一个或多个构型发生了改变的(例如 R 或 S;或者 L 或 D)的氨基酸的多肽。

[0052] 术语“单域多肽”(single domain polypeptide)用来表示主题多肽的靶物结合活性(例如 EGFR 结合活性)位于单一结构域内,这不同于例如抗体和单链抗体,它们的抗原结合活性一般是由重链可变域和轻链可变域二者贡献的。可以将单域多肽搭接(例如作为融合蛋白)至任何数目的其它多肽(诸如荧光多肽、靶向多肽和具有独特治疗效果的多肽)。

[0053] 术语“PK”与“药动学”同义,涵盖化合物包括例如下列在内的特性:受试者对它的吸收、分布、代谢、和清除。“PK 调控蛋白”或“PK 模块”指任何在与生物学活性分子融合或一起施用时可影响生物学活性分子的药动学特性的蛋白质、肽、或模块。PK 调控蛋白或 PK 模块的例子包括 PEG、人血清白蛋白 (HSA) 结合物 (如美国公开文本 No. 20050287153 和 20070003549 中所公开的)、人血清白蛋白、Fc 或 Fc 片段、和糖 (例如唾液酸)。

[0054] “功能性 Fc 区”拥有天然序列 Fc 区的至少一项“效应器功能”。例示性的“效应器功能”包括 C1q 结合、补体依赖性细胞毒性 (CDC)、Fc 受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、吞噬、细胞表面受体 (例如 B 细胞受体 (BCR)) 的下调等。此类效应器功能一般要求 Fc 区与结合域 (例如抗体可变域) 组合,而且可以使用本领域已知的用于评估此类抗体效应器功能的各种测定法来加以评估。

[0055] “天然序列 Fc 区”包含与在自然界中找到的 Fc 区的氨基酸序列同样的氨基酸序列。

[0056] “变异 Fc 区”包含由于至少一处氨基酸修饰而与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选的是,变异 Fc 区与天然序列 Fc 区或亲本多肽的 Fc 区相比具有至少一处氨基酸替代,例如天然序列 Fc 区或区别多肽的 Fc 区中约 1 处至约 10 处氨基酸替代和优选约 1 处至约 5 处氨基酸替代。本文中的变异 Fc 区会优选与天然序列 Fc 区和 / 或区别多肽的 Fc 区具有至少约 80% 序列同一性和最优选至少约 90% 序列同一性、更优选至少约 95% 序列同一性。

[0057] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞 (例如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性细胞、和巨噬细胞) 识别靶细胞上所结合的抗体并随后引起靶细胞的溶解。介导 ADCC 的主要细胞 (NK 细胞) 只表达 Fc γ RIII, 而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。为了评估感兴趣分子的 ADCC 活性,可实施体外 ADCC 测定,诸如美国专利 No. 5,500,362 或 5,821,337 中所记载的。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者 / 另外,可在体内评估感兴趣分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes 等 PNAS (USA) 95 :652-656 (1998) 中所披露的。

[0058] “百分比 (%) 氨基酸序列同一性”在本文中定义为比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,且在不将任何保守替代视为序列同一性的一部分的条件下,候选序列中与所选择序列中的氨基酸残基同样的氨基酸的百分比。用于测定百分比氨基酸序列同一性的比对可以以本领域技术范围内的多种方式来实现,例如使用公众可获得的计算机软件诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定用于测量比对的适宜参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。然而,就本文而言,%氨基酸序列同一性值是如下文所描述的使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得的。ALIGN-2 序列比较计算机程序是由 Genentech 公司创作的,已经与用户文档一起提交给美国版权局 (U. S. Copyright Office, Washington D. C., 20559), 登记为美国版权注册号 TXU510087, 而且公众可通过 Genentech 公司 (South San Francisco, Calif.) 获得。ALIGN-2 程序应当编译成在 UNIX 操作系统、优选数字 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不再变化。

[0059] 就本文而言,给定氨基酸序列 A 对 (to)、与 (with)、或针对 (against) 给定氨基酸

序列 B 的 % 氨基酸序列同一性 (或者可表述为给定氨基酸序列 A 具有或包含对、与、或针对给定氨基酸序列 B 的某一 % 氨基酸序列同一性) 如下计算 :100 乘以分数 X/Y, 其中 X 是序列比对程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数目, 且其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。应当理解的是, 若氨基酸序列 A 的长度不等于氨基酸序列 B 的长度, 则 A 对 B 的 % 氨基酸序列同一性会不等于 B 对 A 的 % 氨基酸序列同一性。

[0060] “分离的”多肽指已经鉴定且与 / 自其天然环境的成分分开和 / 或回收的多肽。所谓其天然环境的污染成分, 是指会干扰该多肽的诊断或治疗用途的物质, 可包括酶、激素、和其它蛋白质性或非蛋白质性的溶质。在优选的实施方案中, 多肽会被纯化 (1) 至超过 95% (以多肽的重量计, 如通过 Lowry 法所测定的) 和最优选超过 99% (以重量计); (2) 至足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端氨基酸序列或内部氨基酸序列的程度, 或 (3) 至通过还原性或非还原性条件下 SDS-PAGE 并使用 Coomassie 蓝或优选银染色显示均质。分离的多肽包括重组细胞内原位的多肽, 这是因为其中不会存在多肽天然环境的至少一种成分。然而, 通常会通过至少一个纯化步骤来制备分离的多肽。

[0061] 靶物还可以是所述靶物的片段。如此, 靶物还是所述靶物的能够引发免疫应答的片段。靶物还是所述靶物的能够结合针对全长靶物生成的单域抗体的片段。

[0062] 片段, 在用于本文时, 指序列的小于 100% (例如 99%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10% 等), 但是包含 5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或更多个氨基酸。片段的长度足以使感兴趣的相互作用维持 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或更好的亲和力。

[0063] 片段在用于本文时还指如下所述的一个或多个任选的氨基酸的插入、删除和替代, 所述插入、删除和替代基本上不改变该靶物与针对全长靶物生成的单域抗体结合的能力。氨基酸插入、删除或替代的数目优选多至 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69 或 70 个氨基酸。

[0064] “诱导细胞死亡”的本发明蛋白质可导致有活力的细胞变成无活力。所述细胞一般表达该蛋白质所结合的抗原, 尤其是过表达所述抗原。优选的是, 所述细胞是癌细胞, 例如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰或膀胱细胞。在体外, 所述细胞可以是例如 SKBR3、BT474、Calu 3、MDA-MB453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。可在没有补体和免疫效应细胞的条件下测定体外细胞死亡, 以区分由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 诱导的细胞死亡。如此, 可以在使用热灭活血清 (即没有补体) 以及在没有免疫效应细胞的条件下实施细胞死亡测定。为了确定本发明的蛋白质是否能够诱导细胞死亡, 可以通过碘化丙啶 (PI)、台盼蓝 (trypan blue) (Moore 等 Cytotechnology 17 :1-11 (1995)) 或 7AAD 的摄取来评估可相对于未处理细胞评估膜完整性的丧失。

[0065] “诱导凋亡”的本发明蛋白质可诱导程序性细胞死亡, 如根据凋亡相关分子或事件 (诸如膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂、和 / 或膜囊 (称作凋亡小体) 形成) 等所确定的。所述细胞表达所述蛋白质所结合的抗原, 并且可以过表达所述抗原。所述细胞可以是肿瘤细胞, 例如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状

腺、胰或膀胱细胞。在体外,所述细胞可以是例如 SKBR3、BT474、Calu 3 细胞、MDA-MB453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。有多种方法可用于评估与凋亡有关的细胞事件。例如,可通过膜联蛋白结合来测量磷脂酰丝氨酸 (PS) 易位;可通过 DNA 梯化 (laddering) 来评估 DNA 断裂,如本文中实施例中所公开的;可以依据亚二倍体细胞的任何增加来评估伴随着 DNA 断裂的核/染色质浓缩。优选的是,在使用表达本发明蛋白质所结合的抗原的细胞进行的膜联蛋白结合测定中,诱导凋亡的蛋白质导致对膜联蛋白的结合相对于未处理细胞发生约 2 至 50 倍、优选约 5 至 50 倍、最优选约 10 至 50 倍的诱导。

[0066] 术语“治疗有效量”指在哺乳动物中有效治疗疾病或病症的药物量。在癌症的情况下,药物的治疗有效量可减少癌细胞的数目;缩小肿瘤的尺寸;抑制(即在一定程度上减缓,优选阻止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即在一定程度上减缓,优选阻止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻一种或多种与病症有关的症状。以药物可阻止生长和/或杀死现有癌细胞为限,药物可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗,可通过例如评估疾病进展前时间 (time to disease progression, TTP) 和/或测定响应率 (response rate, RR) 来测量体内功效。

[0067] 氨基酸序列或化合物的半衰期可一般性地定义为多肽的血清浓度在体内降低 50% (例如由于序列或化合物的降解和/或天然机制对序列或化合物清除或隔绝) 所花费的时间。可以以本身已知的任何方式来测定半衰期,诸如通过药动学分析。合适的技术对于本领域技术人员会是清楚的,而且例如一般包括下述步骤:对灵长类动物适当施用合适剂量的要处理的氨基酸序列或化合物;以规则时间间隔自所述灵长类动物收集血液样品或其它样品;测定本发明的氨基酸序列或化合物在所述血液样品中的水平或浓度;并从如此获得的数据(图)计算到本发明的氨基酸序列或化合物的水平或浓度与给药后的初始水平相比降低 50% 时的时间。参考例如标准手册,诸如 Kenneth, A 等, *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* 及 Peters 等, *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996)。还可参考“*Pharmacokinetics*”, M Gibaldi 和 D Perron, Marcel Dekker 出版,第二修订版 (1982)。

[0068] 半衰期可以使用诸如 $t_{1/2-\alpha}$ 、 $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积 (AUC) 等参数来表述。在本说明书中,“半衰期延长”指这些参数之任一项,如这些参数之任两项,或实质上所有这三项参数的增大。“半衰期延长”尤其指 $t_{1/2-\beta}$ 的增大,同时有或无 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或 AUC 或二者的增大。

[0069] 本文中所使用的术语“EGFR”等同于术语 HER-1。术语“EGFR 配体或 EGFR 配体”指一种或多种 EGFR 配体,诸如天然存在的结合 EGFR 的蛋白质。

[0070] 术语“HER”在本文中用于指 Her 受体家族的成员,包括 EGFR、Her-2、Her-3、和 Her-4。优选的是,本发明中所使用的 Her 家族成员是 EGFR。

[0071] EGFR 结合多肽

[0072] 在一个方面,本申请提供结合 EGFR 的单域多肽。在某些方面,单域多肽可包含分布在至少两个 β 片层间的至少五至七条 β 或 β 样链,例如免疫球蛋白和免疫球蛋白样结构域。 β 样链指参与单域多肽的稳定化但是并不一定采取 β 链构象的一串氨基酸。单域多肽可包含约 80 个至约 150 个氨基酸,其具有包含下述各项的结构组织:分布在至少两个 β 片层间的至少七个 β 链或 β 样链,和至少一个连接两个 β 链或 β 样链的环部分,该

环部分参与对 EGFR 的结合。换言之,环部分可连接两个 β 链、两个 β 样链、或一个 β 链和一个 β 样链。通常,一个或多个环部分会参与 EGFR 结合,尽管有可能一个或多个 β 或 β 样链部分也会参与 EGFR 结合,特别是那些位置最接近环部分的 β 或 β 样链部分。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 结合一种或多种 EGFR 配体。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 信号传导。

[0073] 在一个方面,单域多肽包含免疫球蛋白 (Ig) 可变域。Ig 可变域可以例如选自下组:人 V_L 结构域、人 V_H 结构域和骆驼 (camelid) V_H 结构域。Ig 可变域的一个、两个、三个或更多个环可参与对 EGFR 的结合,而且通常称作 CDR1、CDR2 或 CDR3 的环中任一个会参与 EGFR 结合。

[0074] 在一个方面,单域多肽是基于纤连蛋白的支架蛋白,即基于纤连蛋白 III 型结构域 (Fn3) 的多肽。基于纤连蛋白的支架蛋白的一个例子是 Adnectins™ (Adnexus, 一家 Bristol-Myers Squibb 研发公司)。纤连蛋白是一种在胞外基质形成和细胞-细胞相互作用中发挥至关重要作用的大型蛋白质;它由许多重复的小型结构域组成,这些小型结构域分为三种类型 (I 型、II 型、和 III 型) (Baron 等, 1991)。Fn3 自身是一个大型亚家族的范式,该亚家族包括细胞粘附分子、细胞表面激素和细胞因子受体、伴侣、和碳水化合物结合域的一部分。综述参见 Bork 和 Doolittle, Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Oct 1 ;89(19) : 8990-4 ;Bork 等, J Mol Biol. 1994 Sep 30 ;242(4) :309-20 ;Campbell 和 Spitzfaden, Structure. 1994 May 15 ;2(5) :333-7 ;Harpey&Chothia, J Mol Biol. 1994 May13 ;238(4) : 528-39)。

[0075] 在一些实施方案中,本申请提供结合 EGFR 的纤连蛋白 III 型 (Fn3) 结构域。此类结构域可包含 (自 N 端至 C 端的次序) β 或 β 样链 A、环 AB、 β 或 β 样链 B、环 BC、 β 或 β 样链 C、环 CD、 β 或 β 样链 D、环 DE、 β 或 β 样链 E、环 EF、 β 或 β 样链 F、环 FG、和 β 或 β 样链 G。环 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 中的任何或全部可参与 EGFR 结合。在一些实施方案中,环 BC 和 FG 参与 EGFR 结合。在一些实施方案中,环 BC、DE 和 FG 参与 EGFR 结合。

[0076] 在一些实施方案中,本公开内容提供这样的 Fn3 结构域,其中至少一个选自环 BC、DE、和 FG 的环相对于人 Fn3 结构域的相应环的序列具有改变的氨基酸序列。“改变”指一处或多处相对于模板序列 (对应的人纤连蛋白结构域) 的氨基酸序列改变,包括氨基酸添加、删除、和替代。改变氨基酸序列可通过有意的、盲目的、或自发的序列 (一般是核酸编码序列) 变异来实现,而且可藉由任何技术来进行,例如 PCR、易错 PCR、或化学 DNA 合成。在一些实施方案中,可结合 EGFR 的 Fn3 结构域抑制 EGFR 结合一种或多种 EGFR 配体。在一些实施方案中,可结合 EGFR 的 Fn3 抑制 EGFR 信号传导。

[0077] 在一些实施方案中,Fn3 结构域是自人纤连蛋白衍生的 Fn3 结构域,特别是纤连蛋白的第十 Fn3 结构域 ($^{10}\text{Fn3}$),如 SEQ ID NO:1 中所示。已经报告了多种突变型 $^{10}\text{Fn3}$ 支架。在一个方面,Asp 7、Glu 9、和 Asp 23 中的一个或多个被替换成另一种氨基酸,例如不带负电荷的氨基酸残基 (例如 Asn、Lys、等)。已经报告了这些突变具有与野生型相比促进突变型 $^{10}\text{Fn3}$ 在中性 pH 的更大稳定性的效果 (参见 PCT 公开文本 No. W002/04523)。已经公开了 $^{10}\text{Fn3}$ 支架中其他多种有益或中性的改变。参见例如 Batori 等, Protein Eng. 2002Dec ; 15(12) :1015-20 ;Koide 等, Biochemistry 2001 Aug 28 ;40(34) :10326-33。

[0078] 变体型和野生型 $^{10}\text{Fn3}$ 蛋白都具有相同的结构特征,即七个 β 链结构域序列 (称

作 A-G) 和连接前述七个 β 链结构域序列的六个环区 (AB 环、BC 环、CD 环、DE 环、EF 环、和 FG 环)。位置与 N- 和 C- 末端最接近的 β 链在溶液中可采取 β 样构象。在 SEQ ID NO:1 中, AB 环对应于残基 15-16, BC 环对应于残基 22-30, CD 环对应于残基 39-45, DE 环对应于残基 51-55, EF 环对应于残基 60-66, 而 FG 环对应于残基 76-87。

[0079] 在一些实施方案中, 结合 EGFR 的 $^{10}\text{Fn3}$ 多肽可以与 SEQ ID NO:1 中所示人 $^{10}\text{Fn3}$ 结构域至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、或 90% 相同。大部分变异性一般会存在于一个或多个环中。 $^{10}\text{Fn3}$ 多肽的每个 β 或 β 样链可以基本上由与 SEQ ID NO:1 的对应 β 或 β 样链的序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同的氨基酸序列组成, 只要这样的变异不破坏多肽在生理学条件中的稳定性。

[0080] 在一些实施方案中, 本公开内容提供包含第十纤连蛋白 III 型 ($^{10}\text{Fn3}$) 结构域的 EGFR 结合多肽, 其中 $^{10}\text{Fn3}$ 结构域包含环 AB、环 BC、环 CD、环 DE、环 EF、和环 FG, 且选自环 BC、DE 和 FG 中的至少一个环具有相对于人 $^{10}\text{Fn3}$ 结构域的相应环的序列改变的氨基酸序列。“改变”指一处或多处相对于模板序列 (对应的人纤连蛋白结构域) 的氨基酸序列改变, 而且包括氨基酸添加、删除、和替代。改变氨基酸序列可通过有意的、盲目的、或自发的序列 (一般是核酸编码序列) 变异来实现, 而且可通过任何技术来实施, 例如 PCR、易错 PCR、或化学 DNA 合成。

[0081] 在一些实施方案中, 一个或多个选自 BC、DE、和 FG 的环的长度可以相对于相应的人纤连蛋白环延长或缩短。在一些实施方案中, 环的长度可以延长 2-25 个氨基酸。在一些实施方案中, 环的长度可以缩短 1-11 个氨基酸。具体而言, $^{10}\text{Fn3}$ 的 FG 环长 12 个残基, 而抗体重链中的相应环范围为 4-28 个残基。因此, 为了优化抗原结合, $^{10}\text{Fn3}$ 的 FG 环的长度优选在长度以及序列方面改变以覆盖 4-28 个残基的 CDR3 范围, 以获得最大可能的抗原结合灵活性和亲和力。在一些实施方案中, 可以将整联蛋白结合基序“精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸” (RGD) 用极性氨基酸-中性氨基酸-酸性氨基酸序列 (N 端至 C 端方向) 替换。

[0082] 在一些实施方案中, 包含 $^{10}\text{Fn3}$ 结构域的多肽包含 SEQ ID NO:207-231 中的任一氨基酸序列。可以在 N 端或 C 端添加别的序列。例如, 可以在 N 端放置额外的 MG 序列。M 通常会被切掉, 在 N 端剩下 GVS... 序列。在一些实施方案中, 可以在 $^{10}\text{Fn3}$ 域的 C 端放置接头序列, 例如 SEQ ID NO:233 和 235。

[0083] 在某些方面, 本公开内容提供介导 EGFR 结合的短肽序列。此类序列可以以分离的形式介导 EGFR 结合, 或者在插入特定蛋白质结构 (诸如免疫球蛋白或免疫球蛋白样结构域) 时介导 EGFR 结合。此类序列的例子包括与来自 SEQ ID NO:207-231 的 BC、DE、和 FG 环对应的氨基酸残基。在一些实施方案中, 肽以小于 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-9}M 或更小的 K_D 结合 EGFR。

[0084] 可以依照平衡常数 (例如解离, K_D) 和依照动力学常数 (例如结合速率常数 k_{on} 和解离速率常数 k_{off}) 来评估多肽对 EGFR 的结合。通常会选择以小于 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-9}M 或更小的 K_D 结合 EGFR 的单域多肽, 尽管在 k_{off} 足够低或 k_{on} 足够高的情况中可以耐受更高的 K_D 值。在一些实施方案中, EGFR 结合多肽以大于 10^{-6}M 、 10^{-5}M 、 10^{-4}M 、 10^{-3}M 、 10^{-2}M 或更大的 K_D 结合相关受体, 诸如 HER2 或 HER3。

[0085] 在一个方面, 本申请提供进一步包含药动学 (PK) 模块的 EGFR 结合多肽。改善的药动学可依照所感受到的治疗需要来评估。通常希望提高生物利用度和 / 或延长给药的时间。

间间隔,这可能是通过延长服药后蛋白质在血清中保持可利用状态的时间。在有些情况下希望改善蛋白质的血清浓度随时间的连贯性(例如缩小施药后不久的蛋白质血清浓度与下次施药前不久的蛋白质血清浓度的差异)。可以将 EGFR 结合多肽连接于可使多肽在哺乳动物(例如小鼠、大鼠、或人)中的清除速率相对于未修饰多肽降低超过 3 倍的模块。改善的药动学的其它量度可包括血清半衰期,其常常分成 α 阶段和 β 阶段。两个阶段之一或二者可通过添加适宜的模块来显著改善。

[0086] 有减缓蛋白质从血液清除的倾向的模块(在本文中称作“PK 模块”)包括聚氧化烯模块(例如聚乙二醇)、糖(例如唾液酸)、和耐受良好的蛋白质模块(例如 Fc、Fc 片段、运铁蛋白、或血清白蛋白)。EGFR 结合多肽可以与清蛋白或清蛋白的片段(部分)或变体融合,如美国公开文本 No. 20070048282 中所记载的。

[0087] 在一些实施方案中,PK 模块是血清白蛋白结合蛋白,诸如美国公开文本 No. 2007/0178082 和 2007/0269422 中记载的那些。

[0088] 在一些实施方案中,PK 模块是血清免疫球蛋白结合蛋白,诸如美国公开文本 No. 2007/0178082 中记载的那些。

[0089] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽包含聚乙二醇(PEG)。可以将一个或多个 PEG 分子连接于蛋白质上的不同位置,而且这样的连接可通过与胺、硫醇或其它合适的反应性基团的反应来实现。胺模块可以是例如存在于多肽 N 端的伯胺或存在于氨基酸(诸如赖氨酸或精氨酸)中的氨基。在一些实施方案中,PEG 模块连接于多肽上选自下组的位置:a)N 末端;b)N 末端和最 N 端的 β 链或 β 样链之间;c)位于 EGFR 结合位点对面的多肽面上的环;d)C 末端和最 C 端的 β 链或 β 样链之间;和 e)C 末端。

[0090] PEG 化可通过定点 PEG 化来实现,其中将合适的反应性基团引入蛋白质中以创建 PEG 化优先发生的位点。在一些实施方案中,修饰蛋白质以在期望的位置引入半胱氨酸残基,容许半胱氨酸上的定点 PEG 化。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽包含含有 Cys 的接头,诸如 SEQ ID NO:235,其容许定点 PEG 化。PEG 在分子量方面可以广泛变化,而且可以是分支的或线性的。

[0091] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽包含 Fn3 结构域和 PK 模块。在一些实施方案中,Fn3 结构域是 ^{1} Fn3 结构域。在一些实施方案中,相对于单独的 Fn3 结构域,PK 模块将 EGFR 结合多肽的血清半衰期延长超过 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、200、400、600、800、1000%或更多。

[0092] 在一些实施方案中,PK 模块是经至少一个二硫键、肽键、多肽、聚合糖、或聚乙二醇模块可操作连接于 Fn3 结构域的。例示性多肽接头包括 PSTSTST(SEQ ID NO:232)、EIDKPSQ(SEQ ID NO:233)、和 GS 接头,诸如 GSGSGSGSGS(SEQ ID NO:234)及其多聚体。在一些实施方案中,PK 模块是人血清白蛋白。在一些实施方案中,PK 模块是运铁蛋白。

[0093] 在某些方面,本公开内容提供结合来自第一哺乳动物的 EGFR 和来自第二哺乳动物的 EGFR 类似物的 EGFR 结合多肽。此类多肽在第一哺乳动物是人且第二哺乳动物是进行临床前测试的期望哺乳动物(如小鼠、大鼠、豚鼠、犬、或非人灵长类)的情况下特别有用。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽会以小于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-9} M 或更小的 K_D 结合预先选择的人靶蛋白质及其同系物。

[0094] EGFR 结合多肽可结合 EGFR 的任何部分。在一些实施方案中,多肽结合 EGFR 的

胞外域。在一些实施方案中,多肽结合 EGFR 的配体结合域且破坏 EGFR 与一种或多种配体(包括 TGF- α 和 EGF)的相互作用。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽与抗 EGFR 抗体竞争对 EGFR 的结合。抗 EGFR 抗体可选自任何已知的抗 EGFR 抗体,包括 panitumumab (Amgen)、nimotuzumab (YM Biosciences)、zalutumumab (Genmab)、EMD72000 (Merck KGaA)、和 cetuximab (ImClone Systems)。

[0095] 在一些实施方案中,多肽结合 EGFR 并破坏受体二聚化。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 信号传导。

[0096] 在一些实施方案中,结合 EGFR 的多肽在基于细胞的测定中在亚 IC_{50} 浓度下不活化 EGFR。

[0097] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 的下游信号传导。EGFR 配体结合导致与 EGFR 的同二聚体受体二聚化或与另一种 HER 家族成员的异二聚体受体二聚化。二聚化促进受体自磷酸化,这继而导致数个信号传导途径的激活。一种被激活的途径是 MAPK 途径,包括 MEK 的磷酸化。另一种别激活的途径是磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 途径,包括 AKT 的磷酸化。信号传导被转导至细胞核,导致多种转录因子的活化。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽以小于 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、或 10^{-9} M 的 IC_{50} 抑制 EGFR 配体介导的 EGFR 磷酸化、ERK 磷酸化、AKT 磷酸化、或任何其它 EGFR 信号传导途径成员。

[0098] 多域实施方案

[0099] 本申请的一个方面提供进一步包含第二结构域的 EGFR 结合多肽。第二结构域可结合 EGFR 或不同的蛋白质,优选人蛋白质。在一些实施方案中,第二结构域结合选自下述各项的靶物:FGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FGFR5、c-Kit、人 p185 受体样酪氨酸激酶、EGFR、HER2、HER3、HER4、c-Met、叶酸受体、PDGFR、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、人血管内皮生长因子 (VEGF)-A、VEGF-C、VEGF-D、人 CD20、人 CD18、人 CD11a、人凋亡受体 -2 (Apo-2)、人 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白、人 GPIIb-IIIa 整联蛋白、干细胞因子 (SCF)、人 CD3、IGF-IR、Ang1、Ang2、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、肝细胞生长因子、或 Tie2.3。在一些实施方案中,第二结构域以小于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、或 10^{-9} M 的 K_D 结合人靶蛋白质。在一些实施方案中,第二结构域以大于 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M、 10^{-3} M、 10^{-2} M 或更大的 K_D 结合与靶蛋白质有关的蛋白质。在一些实施方案中,第二结构域抑制结合靶物 (binding target)。

[0100] 本申请的一个方面提供进一步包含第二结构域的 EGFR 结合多肽,该第二结构域结合肿瘤相关靶物或抗原。在一些实施方案中,抗原靶向会有助于 EGFR 结合多肽的定位(就组织分布或者提高在组织或期望细胞类型中的局部浓度效应而言)。或者,第二结构域可提供其他抗击癌症的作用机制来与 EGFR 结合多肽一起抗击癌症。

[0101] 在一些实施方案中,第二结构域结合肿瘤相关靶物或抗原,例如碳酸酐酶 IX、A3、对于 A33 抗体特异性的抗原、BrE3 抗原、CD1、CD1a、CD3、CD5、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD45、CD74、CD79a、CD80、HLA-DR、NCA 95、NCA90、HCG 及其亚基、CEA (CEACAM-5)、CEACAM-6、CSAp、EGFR、EGP-1、EGP-2、Ep-CAM、Ba 733、HER2/neu、低氧诱导因子 (HIF)、KC4 抗原、KS-1 抗原、KS1-4、Le-Y、巨噬细胞抑制因子 (MIF)、MAGE、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-4 抗原、PSA、PSMA、RS5、S100、TAG-72、p53、生腱蛋白、IL-6、IL-8、胰岛素生长因子 -I (IGF-I)、胰岛素生长因子 -II (IGF-II)、Tn 抗原、Thomson-Friedenreich 抗原、肿瘤坏死抗原、胎盘生长因子 (PlGF)、17-1A 抗原、血管发生标志物(例如 ED-B 纤连

蛋白)、癌基因标志物、癌基因产物、和其它肿瘤相关抗原。最近关于肿瘤相关抗原的报告包括 Mizukami 等 (2005, *Nature Med.* 11 :992-97) ;Hatfield 等 (2005, *Curr. Cancer Drug Targets* 5 :229-48) ;Vallbohmer 等 (2005, *J. Clin. Oncol.* 23 :3536-44) ;及 Ren 等 (2005, *Ann. Surg.* 242 :55-63), 通过述及将每一篇收入本文。

[0102] 可以用治疗剂的相应生物学靶向任何类型的肿瘤和任何类型的肿瘤抗原。癌症可以是例如下述一项或多项:乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、骨肉瘤、宫颈癌、前列腺癌、肺癌、滑膜癌、胰腺癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、和横纹肌肉瘤、或其中与非致瘤细胞相比在生理学上 EGFR 水平升高、上调、突变或改变的其它待确定的癌症。

[0103] 可以作为靶标的其它例示性的肿瘤类型包括急性成淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、胆癌、乳腺癌、宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、何杰金氏淋巴瘤、肺癌、髓质甲状腺癌、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵巢癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、黑素瘤、肝癌、前列腺癌、和膀胱癌。

[0104] 在一些实施方案中,第二结构域选自抗体模块。抗体模块指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即包含抗原结合位点(其可免疫特异性地结合抗原)的分子。因此,抗体模块这一术语不仅涵盖完整抗体分子,而且还涵盖抗体多聚体和抗体片段以及抗体、抗体多聚体和抗体片段的变体(包括衍生物)。抗体模块的例子包括但不限于单链 Fv(scFvs)、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂、二硫化物连接的 Fv(sdFv)、和 Fv。抗体模块可以是例如单克隆的、嵌合的、人的、或人源化的。

[0105] 在一些实施方案中,抗体模块选自:(i)Fab 片段,其具有 VL、CL、VH 和 CH1 结构域;(ii)Fab' 片段,其是在 CH1 结构域的 C-末端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段;(iii)Fd 片段,其具有 V_H 和 CH1 结构域;(iv)Fd' 片段,其具有 V_H 和 CH1 结构域及 CH1 结构域 C-末端的一个或多个半胱氨酸残基;(v)Fv 片段,其具有抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域;(vi)dAb 片段(Ward 等, *Nature* 341,544-546(1989)),其由 V_H 结构域组成;(vii)分离的 CDR 区;(viii)F(ab')₂ 片段,包含通过铰链区的二硫桥相连的两个 Fab' 片段的二价片段;(ix)单链抗体分子(例如单链 Fv;scFv)(Bird 等, *Science* 242 :423-426(1988);及 Huston 等, *PNAS(USA)* 85 :5879-5883(1988));(x)“双抗体”,其具有两个抗原结合位点,包含在同一条多肽链中相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)(参见例如 EP 专利公开文本 No. 404,097;WO 93/11161;及 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :6444-6448(1993));和(xi)“线性抗体”,其包含一对串联的 Fd 区段(V_H-CH1-V_H-CH1),与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata 等, *Protein Eng.* 8(10) :1057-1062(1995);及美国专利 No. 5,641,870)。

[0106] 在一些实施方案中,抗体模块是单域抗体。例子包括但不限于重链抗体、天然不含轻链的抗体、自常规的四链抗体衍生的单域抗体、工程化抗体和非衍生自抗体的单域支架(single domain scaffolds)。单域抗体可以衍生自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼(llama)、山羊、家兔、牛。

[0107] 在一些实施方案中,单域抗体是天然存在的单域抗体,诸如 V_H 结构域。V_H 指自天然不含轻链的免疫球蛋白衍生的重链可变域,诸如那些自骆驼科(Camelidae)(包括骆驼、单峰驼、美洲驼、小羊驼(vicuna)、羊驼(alpaca)和大羊驼(guanaco))衍生的,如 W094/04678 中所记载的。V_H 分子比 IgG 分子小约 10 倍。由于已知 V_H 结合“非常”表位,

诸如腔 (cavities) 或沟 (grooves), 因此此类 V_{HH} 的亲合力可能更适合于治疗性处理, PCT 公开文本号 W097/49805。

[0108] 在一些实施方案中, 单域抗体是结合血清蛋白质的 V_{HH} , 如美国公开文本 No. 20070178082 中所记载的。血清蛋白质可以是在受试者的血清中找到的任何合适蛋白质或其片段。在一些实施方案中, 血清蛋白质是血清白蛋白、血清免疫球蛋白、甲状腺素结合蛋白、运铁蛋白、或纤连蛋白。

[0109] 已经开发了多种抗体片段生产技术, 它们可用于制备本发明中所使用的抗体片段。传统上, 这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化来衍生 (参见例如 Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992); 及 Brennan 等, *Science*, 229:81(1985))。然而, 现在可以由重组宿主细胞直接生成这些片段。例如, 可以自上文所讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。或者, 可以自大肠杆菌直接回收 Fab' -SH 片段并化学偶联以形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。依照另一种方法, 可以自重组宿主细胞培养物直接分离 $F(ab')_2$ 片段。用于抗体片段生产的其它技术对于熟练从业人员会是显而易见的。在其它实施方案中, 所选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 W0 93/16185; 美国专利 No. 5, 571, 894; 及美国专利 No. 5, 587, 458。抗体片段也可以是“线性抗体”, 例如如美国专利 No. 5, 641, 870 所述。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0110] 在一些实施方案中, 第二结构域包含一种或多种 avimer 序列。avimer 是通过体外外显子改组和噬菌体展示而自人胞外受体域开发的 (Silverman 等, 2005, *Nat. Biotechnol.* 23:1493-94; Silverman 等, 2006, *Nat. Biotechnol.* 24:220)。所得多域蛋白可包含多个独立的、与单表位结合蛋白相比可展现出改善的亲合力 (有些情况下是亚纳摩尔级) 以及特异性的结合域。关于 avimer 的构建和使用方法的更多细节披露于例如美国专利公开文本 No. 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 和 20050221384, 通过述及将其完整收入本文。

[0111] 在一些实施方案中, 第二结构域包含一种或多种脂笼蛋白相关序列, 例如 anticalins 或脂笼蛋白衍生物。anticalins 或脂笼蛋白衍生物是一类对多种靶分子 (包括本文中所描述的那些) 具有亲和力和特异性的结合蛋白。此类蛋白质在美国专利公开文本 No. 20060058510, 20060088908, 20050106660, 和 PCT 公开文本 No. W02006/056464 中有记载。

[0112] 在一些实施方案中, 第二结构域包含一种或多种四连蛋白 C 型凝集素相关序列或三连蛋白, 例如四连蛋白 C 型凝集素或四连蛋白 C 型凝集素衍生物。四连蛋白 C 型凝集素或四连蛋白 C 型凝集素衍生物是一类对多种靶分子 (包括本文中所描述的那些) 具有亲和力和特异性的结合蛋白。不同的四连蛋白 C 型凝集素和相关蛋白记载于 PCT 公开文本 W02006/053568, W02005/080418, W02004/094478, W02004/039841, W02004/005335, W02002/048189, W098/056906, 和美国专利公开文本 No. 20050202043。

[0113] 在一些实施方案中, 第二结构域包含一种或多种天然锚蛋白重复蛋白, 例如 DARPin (Molecular Partners)。

[0114] 在一些实施方案中, 第二结构域包含一种或多种 Affibodies™。Affibodies™ 衍生自葡萄球菌蛋白 A 的 IgG 结合域。可通过改变位于蛋白 A 结构域的结合表面附近的残基来

获得新的结合特性。

[0115] 在一些实施方案中,第二结构域包含一种或多种基于半胱氨酸结的蛋白质支架,即微体 (Selecore/NascaCell)。

[0116] 在一些实施方案中,第二结构域包含一种或多种 Trans-bodies™。Trans-bodies™ 基于运铁蛋白支架 (BioResis/Pfizer)。

[0117] 在一些实施方案中,第二结构域包含基于伽马晶体蛋白或遍在蛋白的结合蛋白。这些所谓的 Affilin™ (Scil Proteins) 分子具有这样的特征,即在蛋白质的 β 片层结构中从头设计了结合区。Affilin™ 分子已经在美国公开文本 No. 20070248536 中有描述。

[0118] 在一些实施方案中,第二结构域包含 Fn3 结构域。在一些实施方案中,Fn3 结构域是自人纤连蛋白,特别是纤连蛋白的第十 Fn3 结构域 (^{10} Fn3) 衍生的 Fn3 结构域。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽是 Fn3 结构域。

[0119] 在一些实施方案中,Fn3 结构域中一个或多个选自 BC、DE、和 FG 的环的长度可以相对于相应的人纤连蛋白环延长或缩短。在一些实施方案中,环的长度可以延长 2-25 个氨基酸。在一些实施方案中,可以将整联蛋白结合基序“精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸”(RGD) 用极性氨基酸-中性氨基酸-酸性氨基酸序列(N 端至 C 端方向)替换。

[0120] 在一些实施方案中,Fn3 结构域结合人 IGF-IR、EGFR、或 VEGFR2。在一些实施方案中,Fn3 结构域结合人 IGF-IR,包含 SEQ ID NO :2-125、184-204、236 中的任一氨基酸序列,且抑制 IGF-IR 信号传导。在一些实施方案中,Fn3 结构域结合人 EGFR,包含 SEQ ID NO :207-231 中的任一氨基酸序列,且抑制 EGFR 信号传导。在一些实施方案中,Fn3 结构域结合人 VEGFR2,包含 SEQ ID NO :126-183、205、206 中的任一氨基酸序列,且抑制 VEGFR2 信号传导。在一些实施方案中,Fn3 结构域是包含 SEQ ID NO :2-231 或 236 中的任一氨基酸序列的 ^{10} Fn3 结构域。在一些实施方案中, ^{10} Fn3 结构域包含与 SEQ ID NO :2-231 或 236 中的任一氨基酸序列至少 75、80、85、90、95、或 98% 相同的氨基酸序列。

[0121] 缀合

[0122] 本申请的一个方面提供包含藉由至少一个二硫键、肽键、多肽、聚合糖、或 PEG 模块可操作连接的 EGFR 结合多肽和第二结构域的多肽。

[0123] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽和第二结构域是藉由多肽可操作连接的。在一些实施方案中,多肽接头是 SEQ ID NO :233 或 235。

[0124] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽和第二结构域是藉由具有血液或靶组织中的蛋白酶可切割的蛋白酶位点的多肽接头可操作连接的。可利用此类实施方案释放两种以上的治疗性蛋白质,以实现与分别生成这些蛋白质相比更好的投递或或更高的产生效率。

[0125] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽和第二结构域是藉由生物相容性聚合物(诸如聚合糖)可操作连接的。这样的聚合糖可以包含能够被血液或靶组织中的酶切割的酶切位点。可利用此类实施方案释放两种以上的治疗性蛋白质,以实现与分别生成这些蛋白质相比更好的投递或治疗性质或更高的产生效率。

[0126] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽和第二结构域是藉由聚合物接头可操作连接的。最佳地,聚合物接头可用于最合适地改变各蛋白质模块间的距离以创建具有下述一项或多项特征的蛋白质:1) 一个或多个蛋白质结构域在结合感兴趣蛋白质时的结合空间位阻降低或提高,2) 蛋白质稳定性或溶解度提高,而无需搜索别的氨基酸替代来提高稳定性

或溶解度（例如溶解度为至少约 20mg/ml, 或至少约 50mg/ml）, 3) 蛋白质聚集降低, 而无需搜索别的氨基酸替代来降低稳定性（例如如通过 SEC 所测量的）, 及 4) 通过添加别的结合域而使蛋白质的整体亲合力或亲和力提高。

[0127] 在一些实施方案中, EGFR 结合多肽是包含接头 SEQ ID NO:235 的 ¹⁰F_n3 结构域。PEG 被缀合于接头序列中的半胱氨酸模块且将 EGFR 结合多肽可操作地连接于第二结构域。

[0128] PEG 化的实施方案

[0129] 本申请的一个方面提供连接 EGFR 结合多肽与非蛋白质性的聚合物。在一些实施方案中, 聚合物是聚乙二醇（“PEG”）、聚丙二醇、或聚氧化烯, 如美国专利 No. 4, 640, 835 ; 4, 496, 689 ; 4, 301, 144 ; 4, 670, 417 ; 4, 791, 192 或 4, 179, 337 中所记载的。在一些实施方案中, EGFR 结合多肽包含 F_n3 结构域。在一些实施方案中, 聚合物是 PEG 模块。另外, 本申请提供与抗体模块（例如骆驼抗体及其衍生物, 以及单链和单域抗体 ; 特别是那些由微生物表达的）和抗体样模块（例如脂笼蛋白、锚蛋白、多重 Cys-Cys 结构域、和四连蛋白的衍生物 ; 特别是那些由微生物表达的）的 N 或 C 端 PEG 缀合。

[0130] PEG 是众所周知的水溶性聚合物, 其可通过商业途径获得或者可依照本领域众所周知的方法通过乙二醇的开环聚合来制备 (Sandler 和 Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, 卷 3, 页 138-161)。术语“PEG”广泛用于涵盖任何聚乙二醇分子, 无论大小或 PEG 末端的修饰, 而且可以由下式来表示 : $X-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2OH$ (1), 其中 n 为 20-2300, X 为 H 或末端修饰, 例如 C₁₋₄ 烷基。在一个实施方案中, 本发明的 PEG 的一端以氢或甲氧基终止, 即 X 是 H 或 CH₃（“甲氧基 PEG”）。PEG 可进一步包含的结合反应所必需的化学基团 ; 其源自分子的化学合成 ; 或者其是为获得分子各部分间的最佳距离的间隔物。另外, 这样的 PEG 可以由一个或多个连接到一起的 PEG 侧链组成。具有超过一条 PEG 链的 PEG 称作多臂的或分支的 PEG。分支的 PEG 可通过例如添加聚环氧乙烷至各种多元醇（包括甘油、季戊四醇、和山梨醇）来制备。例如, 可以自季戊四醇和环氧乙烷制备四臂分支 PEG。分支 PEG 记载于例如欧洲申请公布 No. 473084A 和美国专利 No. 5, 932, 462。一种形式的 PEG 包括两条经赖氨酸的伯氨基相连接的 PEG 侧链 (PEG2) (Monfardini, C. 等, Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69)。

[0131] PEG 对肽或蛋白质的缀合一般包括活化 PEG 和将活化后的 PEG 中间体直接偶联至目标蛋白质 / 肽或接头, 随后将该接头活化并偶联至目标蛋白质 / 肽（参见 Abuchowski, A. 等, J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977) 和 J. Biol. Chem., 252, 3582 (1977), Zalipsky 等, 和 Harris 等, 于 :《Poly(ethylene glycol) Chemistry : Biotechnical and Biomedical Applications》; (J. M. Harris 编) Plenum Press : New York, 1992 ; 第 21 和 22 章)。注意, 包含 PEG 分子的结合多肽也称作缀合蛋白质, 而没有附着 PEG 分子的蛋白质可称作未缀合的。

[0132] 所利用的 PEG 的大小取决于数项因素, 包括 EGFR 结合多肽的预期用途。为了延长在身体、血液、非血液胞外流体和组织中的半衰期, 优选较大的 PEG。对于体内细胞活性, 优选约 10-60kDa 范围的 PEG, 以及小于约 100kDa、更优选小于约 60kDa 的 PEG, 但也可使用大于约 100kDa 的大小。对于体内成像应用, 可使用较小的 PEG, 一般小于约 20kDa, 它们增加半衰期没有大 PEG 那么多, 从而容许更快地分布和更短的半衰期。为了缀合至本发明的结合多肽, 可以选择多种分子量形式的 PEG, 例如约 1, 000 道尔顿 (Da) 至 100, 000Da (n 为 20-2300)。PEG 中重复单元的数目“n”是根据以道尔顿描述的分子量而估算的。优选的是,

活化后的接头上的 PEG 的分子量的总和适合于药用。如此,在一个实施方案中,PEG 分子的分子量不超过 100,000Da。例如,如果三个 PEG 分子连接于接头,其中每个 PEG 分子具有相同的分子量 12,000Da (每个的 n 为约 270),那么接头上的 PEG 的联合分子量为约 36,000Da (总 n 为约 820)。连接于接头的 PEG 的分子量也可以是不同的,例如,在接头上的三个分子中,两个 PEG 分子可以是每个 5,000Da (每个 n 为约 110) 另一个 PEG 分子可以是 12,000Da (n 为约 270)。在一些实施方案中,将一个 PEG 模块缀合于 EGFR 结合多肽。在一些实施方案中,PEG 模块是约 30、40、50、60、70、80、或 90kDa。

[0133] 在一些实施方案中,PEG 化 EGFR 结合多肽含有一个、两个或更多个 PEG 模块。在一个实施方案中,PEG 模块结合于这样的氨基酸残基:其位于蛋白质表面上和/或远离与靶物配体接触的表面。在一个实施方案中,PEG-结合多肽中 PEG 的联合分子量或总分子量为约 3,000Da 至 60,000Da,或约 10,000Da 至 36,000Da。在一个实施方案中,PEG 化结合多肽中的 PEG 是基本上线性的直链 PEG。

[0134] 本领域技术人员能为 PEG 选择合适的分子量,例如根据 PEG 化的结合多肽会如何用于治疗、期望的剂量、循环时间、对蛋白水解的抗性、免疫原性、和其它考虑。关于 PEG 及其用于增强蛋白质性能的用途的讨论参见 N. V. Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10:91-114(1993)。

[0135] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽与符合下式的一个聚乙二醇基团共价连接: $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$, 其中聚乙二醇基团的 $-CO$ (即羰基) 与结合多肽的一个氨基形成酰胺键; R 是低级烷基; x 是 2 或 3; m 是约 450 至约 950; 并且选择 n 和 m 使得缀合物减去结合多肽的分子量为约 10-40kDa。在一个实施方案中,结合多肽的赖氨酸 ϵ -氨基是可利用的(游离的)氨基。

[0136] 在一个具体的实施方案中,使用 PEG 的碳酸酯来形成 PEG-结合多肽缀合物。可以在与 PEG 的反应中使用 N,N' -二琥珀酰亚氨基碳酸酯(DSC)来形成有活性的混合 PEG-琥珀酰亚氨基碳酸酯,其随后可以与接头的亲核基团或结合多肽的氨基起反应(参见美国专利 No. 5,281,698 和美国专利 No. 5,932,462)。在一种类似类型的反应中,可以使 1,1'-(二苯并三唑基)碳酸酯和二-(2-吡啶基)碳酸酯与 PEG 起反应以分别形成 PEG-苯并三唑基和 PEG-吡啶基混合碳酸酯(美国专利 No. 5,382,657)。

[0137] EGFR 结合多肽的 PEG 化可依照本领域已知方法来实施,例如通过结合多肽与亲电子活性 PEG 的反应(供应商:Shearwater Corp., USA, www.shearwatercorp.com)。本发明的优选 PEG 试剂是例如 N -羟基琥珀酰亚氨基丙酸酯(PEG-SPA)、丁酸酯(PEG-SBA)、PEG-琥珀酰亚氨基丙酸酯或分支的 N -羟基琥珀酰亚胺诸如 mPEG2-NHS(Monfardini, C., 等, *Bioconjugate Chem.* 6(1995)62-69)。此类方法可用于对结合多肽赖氨酸的 ϵ -氨基或结合多肽 N 末端氨基的 PEG 化。

[0138] 在另一个实施方案中,PEG 分子可以被偶联于结合多肽上的巯基(sulfhydryl)(Sartore, L., 等, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45(1991); Morpurgo 等, *Biocon. Chem.*, 7, 363-368(1996); Goodson 等, *Bio/Technology* (1990) 8, 343; 美国专利 No. 5,766,897)。美国专利 No. 6,610,281 和 5,766,897 记载了例示性的可偶联于巯基的反应性 PEG 种类。

[0139] 在一些实施方案中,PEG 化 EGFR 结合多肽是通过定点 PEG 化生成的,特别是通过将 PEG 缀合至 N 或 C 末端处的半胱氨酸模块。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽是共价结

合于 PEG 模块的 Fn3 结构域,其中所述 Fn3 结构域的至少一个环参与 EGFR 结合。PEG 模块可通过定点 PEG 化连接至 Fn3 多肽,诸如通过连接至 Cys 残基,其中 Cys 残基可以位于 Fn3 多肽的 N 末端、或位于 N 末端和最靠 N 端的 β 或 β' 样链之间、或位于 Fn3 多肽的 C 末端、或位于 C 末端和最靠 C 端的 β 或 β' 样链之间。Cys 残基也可以位于其它位置,特别是任何不参与靶物结合的环。PEG 模块也可以通过其它化学来连接,包括通过缀合至胺。

[0140] 在某些 PEG 分子被缀合至结合多肽上半胱氨酸残基的实施方案中,半胱氨酸残基对于结合多肽而言是天然的,而在其它实施方案中,一个或多个半胱氨酸残基是通过工程改造引入结合多肽的。可以在结合多肽编码序列中引入突变以产生半胱氨酸残基。这可以通过,例如,将一个或多个氨基酸残基突变成半胱氨酸来实现。用于突变成半胱氨酸残基的优选氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸和其它亲水性残基。优选的是,待突变成半胱氨酸的残基是表面暴露的残基。根据蛋白质一级序列预测残基的表面可及性的算法在本领域是众所周知的。或者,由于结合多肽的设计和改进的基础框架的晶体结构已经得以解析并且由此鉴定了表面暴露的残基,可以通过比较结合多肽的氨基酸序列来预测表面残基(参见 Himanen 等, *Nature*. (2001) 20-27 ;414 (6866) :933-8)。在一个实施方案中,将半胱氨酸残基引入结合多肽中的 N 和 / 或 C 末端或其附近,或者环区内。半胱氨酸残基的 PEG 化可以使用例如 PEG- 马来酰亚胺、PEG- 乙烯基砜、PEG- 碘乙酰胺、或 PEG- 正吡啶基二硫化物。

[0141] 在有些实施方案中,PEG 化的结合多肽包含共价连接至 N 末端氨基酸的 α 氨基的 PEG 分子。位点特异性 N 末端还原性氨化记载于 Pepinsky 等 (2001) JPET, 297, 1059 和美国专利 No. 5, 824, 784。利用其它可获得的亲核氨基用 PEG- 醛进行蛋白质还原性氨化的用途记载于美国专利 No. 4, 002, 531 ;Wieder 等 (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12579 ;和 Chamow 等 (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 133。

[0142] 在另一个实施方案中,PEG 化的结合多肽包含一个或多个共价连接至接头的 PEG 分子,该接头连接于结合多肽 N 末端处氨基酸残基的 α 氨基。这样的方法披露于美国公开文本 No. 2002/0044921 和 PCT 公开文本 No. W094/01451。

[0143] 在一个实施方案中,结合多肽的 C 末端被 PEG 化。在一个具体的实施方案中,通过引入 C 末端叠氮 - 甲硫氨酸,随后借助 Staudinger 反应来缀合甲基 -PEG- 三芳基膦,将蛋白质的 C 末端 PEG 化。这种 C 末端缀合方法记载于 Cazalis 等, C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity, *Bioconjug Chem.* 2004 ;15(5) :1005-1009。

[0144] 可以使用本领域已知的常规分离和纯化技术来纯化 PEG 化结合多肽,诸如大小排阻(例如凝胶过滤)和离子交换层析。也可以使用 SDS-PAGE 来分离产物。可以分离的产物包括单 PEG 化、二 PEG 化、三 PEG 化、多 PEG 化和未 PEG 化的结合多肽,以及游离 PEG。可以通过合并洗脱峰周围的更宽级分(broader fractions),提高组合物中单 PEG 的百分比,来控制单 PEG 缀合物的比例。约 90% 的单 PEG 缀合物代表了产量和活性的优良平衡。如下所述的组合物可能是理想的:其中例如至少 92% 或至少 96% 的缀合物是单 PEG 种类。在本发明的一个实施方案中,单 PEG 缀合物的百分比为约 90% 至 96%。

[0145] 在本发明的一个实施方案中,PEG 化 EGFR 结合多肽中的 PEG 在羟胺测定(例如 450mM 羟胺 pH6. 5, 室温, 8-16 小时)中不会从 PEG 化氨基酸残基水解,因此是稳定的。在一个实施方案中,组合物的超过 80%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 是稳定的单 PEG- 结

合多肽。

[0146] 在另一个实施方案中,PEG 化 EGFR 结合多肽优选将保留与未修饰蛋白质相关的生物学活性的至少约 25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 100%。在一个实施方案中,生物学活性指其结合 EGFR 的能力,以 K_D 、 k_{on} 或 k_{off} 来评估。在一个具体的实施方案中,相对于未 PEG 化的结合多肽,PEG 化结合多肽蛋白显示出升高的对 EGFR 的结合。

[0147] 相对于未修饰结合多肽的血清清除速率,PEG 修饰多肽的清除速率可以降低约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或甚至 90%。相对于未修饰蛋白质的半衰期,PEG 修饰多肽的半衰期 ($t_{1/2}$) 可以延长。PEG- 结合多肽的半衰期可以相对于未修饰结合多肽的半衰期延长至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400% 或 500%、或甚至 1000%。在有些实施方案中,蛋白质半衰期是在体外测定的,诸如在缓冲盐水溶液中或在血清中。在其它实施方案中,蛋白质半衰期是体内半衰期,诸如蛋白质在动物的血清或其它体液中的半衰期。

[0148] EGFR 结合多肽的去免疫

[0149] 在一个方面,本申请提供去免疫 (deimmunized) 的 EGFR 结合多肽。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽的序列经过改变以消除一个或多个 B 或 T 细胞表位。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽包含 ^{10} Fn3 结构域。

[0150] EGFR 结合多肽可以去免疫以使得它对于给定物种无免疫原性或免疫原性降低。去免疫可以藉由对多肽的结构改变来实现。可采用本领域技术人员知道的任何去免疫技术。例如,WO 00/34317 记载了一种合适的用于蛋白质去免疫的技术,将其公开内容完整收入本文。总的来说,其中所述一般方法内的典型方案包括下述步骤。

[0151] 1. 测定多肽的氨基酸序列;

[0152] 2. 通过任何方法来鉴定多肽的氨基酸序列内的潜在 T 细胞表位,包括测定肽对 MHC 分子的结合,测定肽:HLA 复合物对来自要接受治疗性蛋白质的物种的 T 细胞受体的结合,使用具有要接受治疗性蛋白质的物种的 HLA 分子的转基因动物测试多肽或其部分,或测试来自要接受治疗性蛋白质的物种的免疫系统细胞重建的此类转基因动物;

[0153] 3. 通过遗传工程或其它生成修饰多肽的方法来改变多肽以消除一个或多个潜在 T 细胞表位,并生成这样的改变多肽供测试用。

[0154] 在一个实施方案中,可以分析多肽的序列以确定 MHC II 类结合基序的存在。例如,可以与 MHC 结合基序的数据库进行比较,例如通过搜索万维网上 sitewehil.wehi.edu.au 的“基序”数据库。或者,可以使用计算穿线法 (computational threading method) 来鉴定 MHC II 类结合肽,诸如由 Altuvia 等 (J.Mol.Biol.249 244-250(1995)) 设计的穿线法,测试来自多肽的连续重叠肽对 MHC II 类蛋白质的结合能。预测结合的计算机算法 (computational binding prediction algorithms) 包括 iTope™、Tepitope、SYFPEITHI、EpiMatrix(EpiVax)、和 MHCpred。为了帮助鉴定 MHC II 类结合肽,可搜索涉及被成功呈递的肽的有关序列特征,诸如两亲性和 Rothbard 基序,及组织蛋白酶 B 和其它加工酶的切割位点。

[0155] 鉴定出潜在的 (例如人) T 细胞表位后,通过改变一个或多个氨基酸 (视消除 T 细胞表位的需要) 来消除这些表位。通常,这会涉及 T 细胞表位自身内的一个或多个氨基酸的改变。这可能涉及改变这样的氨基酸:在蛋白质的一级结构上其邻近于所述表位,或者

在分子的一级结构上不邻近但在二级结构中邻近。所考虑的通常的改变是氨基酸替代,但是在某些情况下有可能氨基酸添加或删除是适宜的。所有改变均可通过重组 DNA 技术来实现,这样最终的分子可通过重组宿主表达来制备,例如借助已确立的方法,但是也可使用蛋白质化学或任何其它改变分子的手段。

[0156] 一旦消除了鉴定出的 T 细胞表位,可再次分析去免疫序列以确保没有产生新的 T 细胞表位,并且,如果它们有新的 T 细胞表位,那么可删除该表位。

[0157] 并非所有通过计算鉴定出的 T 细胞表位都需要消除。本领域技术人员会理解特定表位的“强度”(或者更恰当的说是潜在免疫原性)的重要性。各种计算方法为潜在表位生成得分。本领域技术人员会理解,只有得分高的表位可能需要消除。本领域技术人员还会认识到,消除多肽的潜在表位与维持结合亲和力之间有一种权衡。因此,一种策略是依次地将替代引入多肽,然后测试抗原结合和免疫原性。

[0158] 在一个方面,去免疫的多肽在人受试者中的免疫原性比原始多肽要低(或者更恰当的说,引发更低的 HAMA 应答)。用于测定免疫原性的测定法完全在熟练技术人员的知识范围内。可实施本领域公认的测定免疫应答的方法来监测特定受试者中的或临床试验中的 HAMA 应答。对施用了去免疫的多肽的受试者可在施用所述疗法开始时和整个期间给予免疫原性评估。HAMA 应答例如使用本领域技术人员知道的方法通过测定来自受试者的血清样品中针对去免疫多肽的抗体来测量,包括表面等离子共振技术(BIACORE)和/或固相 ELISA 分析。或者,设计用于测量 T 细胞活化事件的体外测定法也能指示免疫原性。

[0159] 其他修饰

[0160] 在一些实施方案中,EGFR 结合多肽是糖基化的。在一些实施方案中,多肽是 Fn3 结构域。Fn3 结构域在正常情况中不含有糖基化位点,然而,可以将此类糖基化通过工程化改造引入蛋白质。

[0161] 蛋白质的糖基化通常是 N- 连接或是 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物模块连接于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物模块酶促连接于天冬酰胺侧链的识别序列。可以将这些通过工程化改造引入本发明的蛋白质,特别是基于纤连蛋白的支架蛋白及其相应的多核苷酸中。如此,多肽中若存在这两种三肽序列中任一种,则产生潜在的糖基化位点。O- 连接的糖基化是指将 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖等糖类之一连接于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

[0162] 向蛋白质中添加糖基化位点是通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列(用于 N-连接的糖基化位点)而便利地完成的。也可通过向原始抗体的序列中添加或替换入一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(用于 O-连接的糖基化位点)来进行改变。

[0163] 在一些实施方案中,修饰 EGFR 结合多肽以增强抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽是进一步包含 Fc 区的 Fn3 结构域。在一些实施方案中,Fc 区是增强 ADCC 或 CDC 的变体。Fc 区变体可包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如替代)的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

[0164] 在一个实施方案中,变异的 Fc 区可以比天然序列 Fc 区更有效地在人效应细胞存在下介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),或以更好的亲和力结合 Fc 伽马受体

(Fc γ R)。此类 Fc 区变体可以在 Fc 区的第 256、290、298、312、326、330、333、334、360、378 或 430 位中的一个或多个处包含氨基酸修饰,其中 Fc 区中残基的编号方式是如 Kabat 中的 EU 索引的。

[0165] 核酸-蛋白质融合技术

[0166] 在一个方面,本申请提供结合人靶物例如 EGFR、VEGFR2、IGF-1R 和其它蛋白质的纤连蛋白 III 型结构域。一种快速产生并测试具有特定结合特性的 Fn3 结构域的方式是 Adnexus(一家 Bristol-Myers Squibb 研发公司)的核酸-蛋白质融合物技术。本公开内容描述此类体外表达和标记技术的使用,该技术称作 PROfusion™,利用核酸-蛋白质融合物(RNA-蛋白质融合物和 DNA-蛋白质融合物)来鉴定对于结合 EGFR 和其它蛋白质(binding to EGFR and other proteins)重要的新型多肽和氨基酸基序。核酸-蛋白质融合物技术是一种共价偶联蛋白质与其编码遗传信息的技术。关于 RNA-蛋白质融合技术和基于纤连蛋白的支架蛋白文库筛选方法的详细描述参见 Szostak 等,美国专利 No. :6,258,558 ;6,261,804 ;6,214,553 ;6,281,344 ;6,207,446 ;6,518,018 ;PCT 公开文本号 W000/34784 ;W001/64942 ;W002/032925 ;及 Roberts 和 Szostak,Proc Natl. Acad. Sci. 94 :12297-12302,1997,通过述及收入本文。关于核酸-蛋白质融合技术的进一步讨论可见于本申请的实施例及材料和方法部分。

[0167] 载体和多核苷酸实施方案

[0168] 编码本文中所公开的各种蛋白质或多肽之任一的核酸可以化学合成。可以选择密码子用法以改善在细胞中的表达。此类密码子用法会取决于所选择的细胞类型。已经开发了用于大肠杆菌和其它细菌以及哺乳动物细胞、植物细胞、酵母细胞和昆虫细胞专门的密码子用法。参见例如:Mayfield 等,Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21 ;100(2) :438-42 ;Sinclair 等,Protein Expr Purif. 2002 Oct ;26(1) :96-105 ;Connell ND., Curr Opin Biotechnol. 2001 Oct ;12(5) :446-9 ;Makrides 等,Microbiol Rev. 1996 Sep ;60(3) :512-38 ;及 Sharp 等,Yeast. 1991 Oct ;7(7) :657-78。

[0169] 通用核酸操作技术记载于例如 Sambrook 等,Molecular Cloning :A Laboratory Manual,卷 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press,第 2 版,1989,或 F. Ausubel 等,Current Protocols in Molecular Biology(Green Publishing and Wiley-Interscience ;New York,1987) 和定期更新,通过述及收入本文。编码多肽的 DNA 与源自哺乳动物、病毒、或昆虫基因的转录或翻译调节元件可操作连接。这样的调节元件包括转录启动子、任选的操纵基因序列(用以控制转录)、编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列、和控制转录和翻译终止的序列。还加入在宿主中复制的能力(通常由复制起点赋予)和选择基因(用以帮助转化子的识别)。

[0170] 本文所述蛋白质可以重组生产,不仅是直接的重组生产,还有作为与异源多肽的融合蛋白,所述异源多肽优选是信号序列或其它位于成熟蛋白或多肽的 N 末端、具有特异性切割位点的多肽。所选择的异源信号序列优选是受到宿主细胞识别和加工(即被信号肽酶切割)的异源信号序列。对于不识别和加工天然信号序列的原核宿主细胞,用原核信号序列替换信号序列,原核信号序列选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或热稳定肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌,可以用例如下述序列替换天然信号序列:酵母转化酶前导序列、α 因子前导序列(包括酵母属(Saccharomyces)和克鲁维酵母属(Kluyveromyces) α-因

子前导序列)、或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母 (*C. albicans*) 葡糖淀粉酶前导序列、或 PCT 公开文本 No. W090/13646 中记载的信号。在哺乳动物细胞表达中,有哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列(例如单纯疱疹 gD 信号)可供使用。可以将这样的前体区域的 DNA 与编码蛋白质的 DNA 以符合读码框的方式相连接。

[0171] 表达载体和克隆载体都包含使载体能够在选定的一种或多种宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,这种序列使载体能够不依赖于宿主染色体 DNA 而复制,这种序列包括复制起点或自主复制序列。多种细菌、酵母和病毒的此类序列是公知的。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2 微米质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通常,哺乳动物表达载体不需要复制起点构件(SV40 起点的使用通常可能只是因为它包含早期启动子)。

[0172] 表达和克隆载体可包含选择基因,也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予对抗生素或其它毒素,例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素,的抗性;(b) 补足营养缺陷型的缺陷;或(c) 提供不能由复合培养基获得的必需营养物,例如用于芽孢杆菌的编码 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0173] 适用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 *trp1* 基因(Stinchcomb 等, *Nature* 282:39(1979))。*trp1* 基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株(例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1) 提供了选择标志。Jones, *Genetics* 85:12(1977)。于是,酵母宿主细胞基因组中 *trp1* 损伤的存在提供了用于通过在缺乏色氨酸时的生长来检测转化的有效环境。类似的,Leu2 缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626) 被携带 Leu2 基因的已知质粒所补足。

[0174] 表达载体和克隆载体通常包含被宿主生物体识别的、与编码本发明蛋白质(例如基于纤连蛋白的支架蛋白)的核酸可操作连接的启动子。适用于原核宿主的启动子包括 *phoA* 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(*trp*)启动子系统、和杂合启动子(诸如 *tac* 启动子)。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还将包含与编码本发明蛋白质的 DNA 可操作连接的 Shine-Dalgarno(S.D.) 序列。

[0175] 真核细胞的启动子序列是已知的。事实上,所有真核基因在位于起始转录的位点上游大约 25 至 30 个碱基处都具有富 AT 区。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处还可找到另一种序列,即 CNCAAT 区,其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3' 端是 AATAAA 序列,它可能是向编码序列的 3' 端添加 polyA 尾的信号。所有这些序列合适的插入真核表达载体。

[0176] 适用于酵母宿主的启动序列的例子包括 3- 磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子,诸如烯醇酶、甘油醛-3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0177] 其它酵母启动子(它们是诱导型启动子,具有通过生长条件控制转录的额外优点)有醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3- 磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步记载于 EP 专利公开文本 No. 73,657。酵母增强子也可以有利地与酵母启动

子一起使用。

[0178] 对于哺乳动物宿主细胞中载体的转录,可通过例如从病毒(诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和更优选的猿猴病毒 40(SV40))基因组、异源哺乳动物启动子(例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)、及热休克启动子获得的启动子来控制,条件是这样的启动子应与宿主细胞系统相容。

[0179] 方便地以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子,该片段还包含 SV40 病毒复制起点。方便地以 HindIII 限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利 No. 4, 419, 446 中披露了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 No. 4, 601, 978 中记载了该系统的一种改良。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素 cDNA 还可参见 Reyes 等, *Nature* 297 :598-601 (1982)。或者,可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0180] 常常通过在载体中插入增强子序列来增加高等真核细胞对编码本发明蛋白质的 DNA 的转录。现在知道许多来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。然而,典型的是使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括 SV40 复制起点晚期一侧的增强子(bp100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见 Yaniv, *Nature* 297 :17-18 (1982)。可以将增强子剪接到载体中多价抗体编码序列的 5' 或 3' 方向的位置,但是优选位于启动子的 5' 方向的位置上。

[0181] 用于真核宿主细胞(例如酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可以从真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5' 端和(偶尔可从 3' 端)获得。这些区域包含这样核苷酸区段,其被转录为编码多价抗体的 mRNA 的非翻译部分中的聚腺苷酸化片段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见 WO 94/11026 及其中披露的表达载体。

[0182] 重组 DNA 还可包含任何类型的可能对蛋白质纯化有用的蛋白质标签序列。蛋白质标签的例子包括但不限于组氨酸标签、FLAG 标签、myc 标签、HA 标签、或 GST 标签。与细菌、真菌、酵母、和哺乳动物细胞宿主一起使用的适宜的克隆和表达载体可见于 *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, (Elsevier, New York, 1985), 以此通过述及收入其相关公开内容。

[0183] 使用对宿主细胞适宜的方法将表达构建物导入宿主细胞中,这对本领域技术人员而言是显而易见的。本领域已知多种用于将核酸导入宿主细胞中的方法,包括但不限于电穿孔;采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-右旋糖酐、或其它物质的转染;微粒轰击;脂转染;和感染(其中载体是传染剂)。

[0184] 合适的宿主细胞包括原核生物、酵母、哺乳动物细胞、或细菌细胞。合适的细菌包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠埃希氏菌或大肠杆菌(*E. coli*)或芽孢杆菌属(*Bacilli* spp)。酵母(优选来自酵母属物种,诸如酿酒酵母(*S. cerevisiae*))也可用于生产多肽。也可采用各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白。关于在昆虫细

胞中生产异源蛋白的杆状病毒系统的综述见 Luckow 和 Summers, Bio/Technology, 6 :47, 1988。合适的哺乳动物宿主细胞系的例子包括内皮细胞、COS-7 猴肾细胞、CV-1、L 细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢 (CHO)、人胚肾细胞、HeLa、293、293T、和 BHK 细胞系。为了制备纯化的多肽,培养合适的宿主 / 载体系统以表达重组蛋白。对于许多应用,本文中所公开的许多多肽的小尺寸会使得大肠杆菌表达成为优选的表达方法。然后从培养液或细胞提取物纯化蛋白质。

[0185] 适于表达本发明的糖基化蛋白质的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 等宿主。有多种转染用病毒株是公众可获得的,例如苜蓿尺蠖 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株,而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0186] 在有些情况下会希望在脊椎动物细胞生产蛋白质,诸如为了糖基化,而且培养 (组织培养) 中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾系 (293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham 等, J. Gen. Virol. 36 :59 (1977)); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216 (1980)); 小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 : 243-251 (1980)); 猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 牛鼠 (buffalorati) 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68 (1982)); MRC5 细胞; FS4 细胞; 人肝癌系 (Hep G2); 和骨髓瘤或淋巴瘤细胞 (例如 Y0、J558L、P3 和 NS0 细胞) (参见美国专利 No. 5, 807, 715)。还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0187] 蛋白质生产

[0188] 用本文所述用于生产蛋白质的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0189] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明蛋白质的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基: Ham 等, Meth. Enz. 58 :44 (1979); Barnes 等, Anal. Biochem. 102 :255 (1980); 美国专利 No. 4, 767, 704; 4, 657, 866; 4, 927, 762; 4, 560, 655; 或 5, 122, 469; WO90/03430; WO 87/00195; 或美国专利 No. Re. 30, 985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和 / 或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如 HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适宜浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。

培养条件（诸如温度、pH 等）为先前表达选用的宿主细胞所用的培养条件，这对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0190] 本文中所公开的蛋白质也可以使用无细胞翻译系统来生产。为了该目的，必须修饰编码多肽的核酸以容许体外转录产生 mRNA，并容许 mRNA 在所利用的特定无细胞系统（真核型如哺乳动物或酵母无细胞翻译系统；或原核型如细菌无细胞翻译系统）中进行无细胞翻译。

[0191] 本发明的蛋白质也可以通过化学合成来生产（例如使用 Solid Phase Peptide Synthesis, 第 2 版, 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL 中记载的方法）。对蛋白质的修饰也可以通过化学合成来产生。

[0192] 本发明的蛋白质可以通过蛋白质化学领域普遍知道的蛋白质分离 / 纯化方法来纯化。非限制性的例子包括抽提、再结晶、盐析（例如用硫酸铵或硫酸钠）、离心、透析、超滤、吸附层析、离子交换层析、疏水层析、正相层析、反相层析、凝胶过滤、凝胶渗透层析、亲和层析、电泳、逆流分配或这些的任意组合。纯化后，可以通过本领域已知的多种技术（包括但不限于过滤和透析）将多肽更换到不同的缓冲液中和 / 或浓缩。

[0193] 纯化后的多肽优选是至少 85% 纯、更优选至少 95% 纯、最优选至少 98% 纯。无论纯度的确切数值如何，多肽对于用作药品是足够纯的。

[0194] 成像、诊断和其它应用

[0195] 在一个方面，本申请提供用可检测模块标记的 EGFR 结合多肽。该多肽可用于各种诊断应用。可检测模块可以是任何能够直接或间接产生可检测信号的模块。例如，可检测模块可以是放射性同位素，诸如 H³、C¹⁴ 或 I¹³¹、P³²、S³⁵、或 I¹³¹；荧光或化学发光化合物，诸如异硫氰酸荧光素、罗丹明、或萤光素；或酶，诸如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。

[0196] 任何本领域已知的将蛋白质缀合至可检测模块的方法均可以采用，这样的方法包括 Hunter 等, Nature 144 :945 (1962) ;David 等, Biochemistry 13 :1014 (1974) ;Pain 等, J. Immunol. Meth. 40 :219 (1981) ;及 Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30 :407 (1982) 所记载的方法。体外方法包括本领域众所周知的缀合化学，包括与蛋白质相容的化学，诸如对特定氨基酸（诸如 Cys 和 Lys）的化学。为了将模块（诸如 PEG）连接至本发明的蛋白质，使用连接基团或反应性基团。合适的连接基团是本领域众所周知的，而且包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。取决于应用，优选的连接基团是二硫化物基团和硫醚基团。对于不含 Cys 半胱氨酸的多肽，可以通过工程化在某个位置引入 Cys，以便在创建缀合位置的同时容许蛋白质的活性存在。

[0197] 连有可检测模块的 EGFR 结合多肽也可用于体内成像。可将多肽与不透射线（radio-opaque）的药剂或放射性同位素连接，施用给受试者（优选进入血流），并测定经标记蛋白质在受试者中的存在和位置。这种成像技术在恶性肿瘤的分期和治疗中是有用的。可以用任何在受试者中可检测（通过核磁共振、放射学、或本领域已知的其它检测手段）的模块来标记蛋白质。

[0198] EGFR 结合多肽也可以用作亲和纯化剂。在这种方法中，使用本领域众所周知的方法将多肽固定化在合适的支持物上，诸如 Sephadex 树脂或滤纸。

[0199] EGFR 结合多肽可用于任何已知的测定法，诸如竞争性结合测定、直接和间接夹

心测定、和免疫沉淀测定 (Zola, Monoclonal Antibodies :A Manual of Techniques, 页 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

[0200] 在某些方面,本公开内容提供了用于检测样品中的 EGFR 的方法。该方法可包括使样品接触本文中所描述的 EGFR 结合多肽,其中所述接触在容许多肽-EGFR 复合物形成的条件下进行,并检测所述复合物,由此检测所述样品中的所述 EGFR。检测可使用本领域已知的任何技术来进行,如放射线照相术、免疫学测定法、荧光检测、质谱、或表面等离子共振。样品常常会是生物学样品,诸如活检,特别是肿瘤、疑似肿瘤的活检。样品可以来自人或其它哺乳类动物。EGFR 结合多肽可以用标记模块标记,诸如放射性模块、荧光模块、生色模块、化学发光模块、或半抗原模块。EGFR 结合多肽可以固定化在固体支持物上。

[0201] 治疗 / 体内用途

[0202] 在一个方面,本申请提供在 EGFR 相关病症的治疗中有用的 EGFR 结合多肽。本申请还提供用于对受试者施用 EGFR 结合多肽的方法。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者具有 EGFR 相关病症,诸如癌症。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 信号传导。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 结合一种或多种 EGFR 配体。

[0203] 在一些实施方案中,对动物施用 EGFR 结合多肽引起表达 EGFR 的肿瘤中 EGFR 水平降低。在一些实施方案中,与未处理动物相比,多肽引起受体水平降低至少 20、30、40、50、60、70、80% 或更多。

[0204] 在一些实施方案中,施用 EGFR 结合多肽在体内抑制肿瘤细胞生长。肿瘤细胞可衍生自任何细胞类型,包括但不限于表皮、上皮、内皮、白血病、肉瘤、多发性骨髓瘤、或中胚层细胞。异种移植肿瘤研究中使用的常用肿瘤细胞系的例子包括 A549 (非小细胞肺癌) 细胞、DU-145 (前列腺) 细胞、MCF-7 (乳腺) 细胞、Co1o 205 (结肠) 细胞、3T3/1GF-1R (小鼠成纤维细胞) 细胞、NCI H441 细胞、HEP G2 (肝癌) 细胞、MDA MB 231 (乳腺) 细胞、HT-29 (结肠) 细胞、MDA-MB-435s (乳腺) 细胞、U266 细胞、SH-SY5Y 细胞、Sk-Me1-2 细胞、NCI-H929、RPM18226、和 A431 细胞。在一些实施方案中,相对于未处理动物中肿瘤的生长,多肽抑制肿瘤细胞生长。在一些实施方案中,相对于未处理动物中肿瘤的生长,多肽将肿瘤细胞生长抑制 50、60、70、80% 或更多。在一些实施方案中,对肿瘤细胞生长的抑制是在动物开始多肽处理后至少 7 天或至少 14 天测量的。在一些实施方案中,与多肽一起给动物施用另一种抗肿瘤剂。

[0205] 在某些方面,本公开内容提供用于治疗具有对抑制 EGFR 有响应的状况 (即“EGFR 相关疾病”) 的受试者的方法。此类方法可包括对所述受试者施用有效量的本文所述任何 EGFR 抑制性多肽。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 信号传导。在一些实施方案中,EGFR 结合多肽抑制 EGFR 结合一种或多种 EGFR 配体。

[0206] 术语“EGFR 相关疾病”涉及依赖于 EGFR 活性的病理状态。EGFR 直接地或间接地参与多种细胞活动 (包括增殖、粘附和迁移,以及分化) 的信号转导途径。与 EGFR 活性有关的疾病包括肿瘤细胞增殖、病理性新血管形成 (其促进实体瘤生长)、眼中的新血管形成 (糖尿病性视网膜病、年龄诱发的黄斑变性等等) 和炎症 (银屑病、类风湿性关节炎等等)。

[0207] 在某些方面,本公开内容提供施用 EGFR 结合多肽以治疗和 / 或预防肿瘤和 / 或肿瘤转移的方法,其中肿瘤特别优选选自下组:脑瘤、泌尿生殖道肿瘤、淋巴系统肿瘤、胃肿

瘤、喉肿瘤、单核细胞白血病、肺腺癌、小细胞肺癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤和乳腺癌，不限于这些。

[0208] 在某些方面，本公开内容提供施用 EGFR 结合多肽以治疗选自下组癌性疾病的疾病的方法：鳞状细胞癌、膀胱癌、胃癌、肝癌、肾癌、结肠直肠癌、乳腺癌、头癌、颈癌、食管癌、妇科癌症、甲状腺癌、淋巴瘤、慢性白血病和急性白血病。

[0209] 在某些方面，本公开内容提供施用 EGFR 结合多肽以治疗和 / 或预防由血管发生引起、介导和 / 或传播的疾病的方法。此类涉及血管发生的类型的疾病之一是眼病，诸如视网膜血管化、糖尿病性视网膜病、年龄诱发的黄斑变性等等。

[0210] 在某些方面，本公开内容提供施用 EGFR 结合多肽以治疗和 / 或预防选自下组的疾病的方法：视网膜血管化、糖尿病性视网膜病、年龄诱发的黄斑变性和 / 或炎症性疾病。

[0211] 在某些方面，本公开内容提供施用 EGFR 结合多肽以治疗和 / 或预防选自下组的疾病的方法：银屑病、类风湿性关节炎、接触性皮炎、迟发性超敏反应、炎症、子宫内膜异位症、瘢痕形成、良性前列腺增生、免疫学疾病、自身免疫性疾病和免疫缺陷性疾病。

[0212] 在某些方面，本公开内容提供为了选自下组的骨病理的治疗和 / 或预防而施用 EGFR 结合多肽的方法：骨肉瘤、骨关节炎和佝偻病。

[0213] 本申请的一个方面提供在体内抑制 EGFR 酪氨酸磷酸化和 / 或受体水平的 EGFR 结合多肽。在一个实施方案中，对动物施用 EGFR 结合物引起表达 EGFR 的肿瘤中 EGFR 磷酸酪氨酸信号降低。在一些实施方案中，EGFR 结合物引起磷酸酪氨酸信号降低至少 20%。在一些实施方案中，EGFR 结合物引起磷酸酪氨酸信号降低至少 50、60、70、80、90% 或更多。

[0214] 可以与本发明的适宜实施方案一起使用的其他药剂

[0215] 本发明的一个方面提供与细胞毒剂相连的 EGFR 结合多肽。此类实施方案可视情况通过体外或体内方法来制备。体外方法包括本领域众所周知的缀合方法，包括与蛋白质相容的化学，诸如对特定氨基酸（诸如 Cys 和 Lys）的化学。为了将细胞毒剂与多肽相连，使用连接基团或反应性基团。合适的连接基团是本领域众所周知的，包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。优选的连接基团是二硫化物基团和硫醚基团。例如，可以使用二硫化物交换反应或通过抗体和细胞毒剂之间形成硫醚键来构建缀合物。优选的细胞毒剂是美登木素生物碱、紫杉烷和 CC-1065 类似物。

[0216] 在一些实施方案中，将 EGFR 结合多肽与细菌毒素、植物毒素、蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶（RNA 酶）、DNA 酶 I、蛋白酶、葡萄球菌肠毒素 -A、商陆（pokeweed）抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素、Ranpimase（Rap）、Rap（N69Q）、酶、或荧光蛋白相连。

[0217] 在一些实施方案中，将 EGFR 结合多肽与美登木素生物碱或美登木素生物碱类似物相连。合适的美登木素生物碱的例子包括美登醇和美登醇类似物。合适的美登木素生物碱披露于美国专利 No. 4, 424, 219 ; 4, 256, 746 ; 4, 294, 757 ; 4, 307, 016 ; 4, 313, 946 ; 4, 315, 929 ; 4, 331, 598 ; 4, 361, 650 ; 4, 362, 663 ; 4, 364, 866 ; 4, 450, 254 ; 4, 322, 348 ; 4, 371, 533 ; 6, 333, 410 ; 5, 475, 092 ; 5, 585, 499 ; 和 5, 846, 545。

[0218] 在一些实施方案中，将 EGFR 结合多肽与紫杉烷相连。美国专利 No. 6, 372, 738 和 6, 340, 701 披露了适合用于本发明的紫杉烷。

[0219] 在一些实施方案中,将 EGFR 结合多肽与 CC-1065 或其类似物相连。美国专利 No. 6, 372, 738 ;6, 340, 701 ;5, 846, 545 和 5, 585, 499 披露了 CC-1065 及其类似物。

[0220] 用于制备此类细胞毒性缀合物的一种令人感兴趣的候选物是 CC-1065,其是一种从泽耳链霉菌 (*Streptomyces zelensis*) 培养液中分离得到的强有力的抗肿瘤抗生素。CC-1065 在体外比常用的抗癌药 (诸如多柔比星、甲氨蝶呤和长春新碱) 强约 1000 倍 (B. K. Bhuyan 等, *Cancer Res.*, 42, 3532-3537 (1982))。

[0221] 细胞毒性药物 (诸如甲氨蝶呤、柔红霉素、多柔比星、长春新碱、长春碱、美法仑、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥、和加利车霉素) 也适合于制备本发明的缀合物,而且,也可以通过中间载体分子 (诸如血清白蛋白) 将药物分子与 EGFR 结合多肽连接。

[0222] 在其它治疗性处理或组合物中,将 EGFR 结合蛋白与一种或多种其他的治疗剂共同施用或顺序施用。合适的治疗剂包括但不限于靶向治疗剂、其它靶向生物制品、和细胞毒性或细胞抑制性药剂。在有些情况下,优选在同一个或各别的、装有液体配制剂的治疗可接受管形瓶、注射器或其它施用装置中施用药剂。

[0223] 癌症治疗剂指那些旨在杀死癌细胞或限制癌细胞生长同时对患者具有最低限度影响的药剂。如此,此类药剂可利用与癌细胞的性质 (例如代谢、血管化或表面抗原呈递) 与健康宿主细胞相比的任何差异。肿瘤形态学差异是潜在的干预位点:例如,第二治疗剂可以是抗体,如可以用来阻碍实体瘤内部血管化由此减缓其生长速率的抗 VEGF。其它治疗剂包括但不限于辅助剂诸如盐酸格拉司琼 (granisetron HCl)、雄激素抑制剂诸如醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate)、抗生素诸如多柔比星、抗雌激素诸如他莫昔芬、抗代谢物诸如干扰素 α -2a、细胞毒剂诸如紫杉醇、酶抑制剂诸如 ras 法尼基转移酶抑制剂、免疫调控剂诸如阿地白介素 (aldesleukin)、和氮芥衍生物诸如盐酸美法仑、诸如此类。

[0224] 可以为了改善的抗癌效果而与 EGFR 结合蛋白组合的治疗剂包括肿瘤学实践中所使用的多种药剂 (参考文献:Cancer, Principles&Practice of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 第 6 版, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001), 诸如多西他塞、帕利他塞、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、曲妥单抗、卡培他滨、他莫昔芬、托瑞米芬、来曲唑、阿那曲唑、氟维司群、依西美坦、戈舍瑞林、奥沙利铂、卡铂、顺铂、地塞米松、安肽、贝伐单抗、5- 氟尿嘧啶、亚叶酸、左旋咪唑、伊立替康、依托泊苷、托泊替康、吉西他滨、长春瑞滨、雌莫司汀、米托蒽醌、阿巴瑞克、唑来膦酸盐、链佐星、利妥昔单抗、伊达比星、白消安、苯丁酸氮芥、氟达拉滨、伊马替尼、阿糖胞苷、ibritumomab、托西莫单抗、干扰素 α -2b、美法仑、bortezomib、六甲蜜胺、天冬酰胺酶、吉非替尼、埃罗替尼、抗 EGF 受体抗体 (例如西妥昔单抗或 panitumab)、ixabepilone、epothilones 或其衍生物、和细胞毒性药物与针对细胞表面受体的抗体的缀合物。优选的治疗剂是铂剂 (诸如卡铂、奥沙利铂、顺铂)、紫杉烷 (诸如帕利他塞、多西他塞)、吉西他滨、和喜树碱。

[0225] 可以在施用 EGFR 结合多肽之前、同时、或之后施用一种或多种其他的治疗剂。熟练技术人员会理解,对于每种治疗剂,特定施用次序可能是有利的。类似的,熟练技术人员会理解,对于每种治疗剂,施用药剂与本发明的抗体、抗体片段或缀合物之间的时间长度会变化。

[0226] 配制和施用

[0227] 通过将具有期望纯度的所述蛋白质与任选的生理学可接受的载体、赋形剂或稳

定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)) 混合, 以水溶液、冻干或其它干燥配制剂的形式制备包含 EGFR 结合多肽的治疗用配制剂。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 包括缓冲剂, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵 (octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride); 氯化己烷双胺 (hexamethonium chloride); 苯扎氯铵 (benzalkonium chloride)、苯索氯铵 (benzethonium chloride); 苯酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯 (alkyl parabens), 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚 (catechol); 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或右旋糖酐; 螯合剂, 诸如 EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐反荷离子 (salt-forming counter-ions), 诸如钠; 金属复合物 (例如 Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0228] 本文中的配制剂还可含有多于一种治疗具体适应症所必需的活性化合物, 优选活性互补且彼此没有不利影响的化合物。本文中提供了活性化合物组合的例子。这样的分子以对预定目的有效的量合适的组合存在。

[0229] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中 (例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚 (甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊), 在胶状药物投递系统中 (例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊), 或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)。

[0230] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易地通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0231] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有本发明蛋白质的固体疏水性聚合物半透性基质, 该基质是定型产品的形式, 例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶 (例如聚 (2-羟乙基-甲基丙烯酸酯) 或聚 (乙烯醇))、聚交酯 (美国专利 No. 3, 773, 919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体) 及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子达 100 天以上, 但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体或免疫偶联物在体内长时间维持时, 它们可能因为暴露于 37°C 的潮湿环境而变性或聚集, 导致生物学活性的损失和可能的免疫原性改变。可以根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如, 如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换的分子间 S-S 键形成, 那么可通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0232] 虽然熟练技术人员会理解每种治疗剂的剂量会取决于药剂本身, 但是优选的剂量范围可以是约 10mg/平方米至约 2000mg/平方米、更优选约 50mg/平方米至约 1000mg/平方米。

[0233] 为了治疗性应用, 以药学可接受剂量形式将 EGFR 结合多肽施用于受试者。它们可

以静脉内（作为推注或持续一段时间的连续输注）、肌肉内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面、或吸入路径施用。蛋白质也可以通过肿瘤内、肿瘤周围、病变内、或病变周围路径施用，以发挥全部以及全身治疗效果。合适的药学可接受载体、稀释剂、和赋形剂是众所周知的，而且可以由本领域技术人员根据临床情况来决定。合适的载体、稀释剂和 / 或赋形剂的例子包括：(1) Dulbecco 氏磷酸盐缓冲盐水，pH 约 7.4，含有约 1mg/ml 至 25mg/ml 人血清白蛋白；(2) 0.9% 盐水 (0.9% w/v NaCl)；和 (3) 5% (w/v) 右旋糖。本发明的方法可以在体外、在体内、或回体实施。

[0234] 以治疗应用为目的，可以如上所述地进行 EGFR 结合多肽与一种或多种其他治疗剂的施用（无论是共同施用或者是顺序施用）。根据共同施用的具体治疗剂的身份，熟练技术人员会了解适合于共同施用的药学可接受载体、稀释剂和赋形剂。

[0235] 在以水性剂型而非冻干剂型存在时，蛋白质通常配制成药 0.1mg/ml 至 100mg/ml 的浓度，但也容许在这些范围以外广泛变化。就疾病治疗而言，EGFR 结合多肽的适宜剂量将取决于待治疗疾病的类型（如上文所定义的）、疾病的严重程度和进程、施用抗体是出于预防目的还是治疗目的、先前疗法的过程、患者的临床史和对抗体的响应、及主治医师的判断等。合适地以一次性处理或一系列处理的方式施用蛋白质。

[0236] 本发明还包括试剂盒，其包括一种或多种本文中所描述的成分和关于那些成分的使用说明书。在一个优选的实施方案中，本发明的试剂盒包括 EGFR 结合多肽，及治疗剂。关于此优选实施方案的说明书包括使用 EGFR 结合多肽及治疗剂抑制癌细胞生长的说明书，和 / 或施用 EGFR 结合多肽及治疗剂治疗患有癌症的患者的方法的说明书。

[0237] 优选的是，试剂盒中所使用的治疗剂选自下组：多西他塞、帕利他塞、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、曲妥单抗、卡培他滨、他莫昔芬、托瑞米芬、来曲唑、阿那曲唑、氟维司群、依西美坦、戈舍瑞林、奥沙利铂、卡铂、顺铂、地塞米松、安肽、贝伐单抗、5-氟尿嘧啶、亚叶酸、左旋咪唑、依托泊苷、拓扑替康、吉西他滨、长春瑞滨、雌莫司汀、米托蒽醌、阿巴瑞克、唑来膦酸盐、链佐星、利妥昔单抗、伊达比星、白消安、苯丁酸氮芥、氟达拉滨、伊马替尼、阿糖胞苷、ibritumomab、托西莫单抗、干扰素 α -2b、美法仑、bortezomib、六甲蜜胺、天冬酰胺酶、吉非替尼、埃罗替尼、抗 EGF 受体抗体（例如西妥昔单抗或 panitumumab）、ixabepilone、和 epothilone 或其衍生物。更优选的是，治疗剂是铂剂（诸如卡铂、奥沙利铂、顺铂）、紫杉烷（诸如帕利他塞、多西他塞）、吉西他滨、或喜树碱。

[0238] 本发明试剂盒的成分处于适合于试剂盒的形式，诸如溶液或冻干粉。熟练技术人员会了解，试剂盒的成分的浓度或量因试剂盒的每种成分的身份和预定用途而变化。

[0239] 试剂盒的说明书中提到的癌症及其细胞包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、骨肉瘤、宫颈癌、前列腺癌、肺癌、滑膜癌、胰腺癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、和横纹肌肉瘤。

[0240] 本领域技术人员能容易地确定在本文所述方法中施用的细胞毒剂或治疗剂的剂量。在确定适当的剂量时，也可以参考药物包装插页。

[0241] 其他专利参考文献

[0242] 以下别的专利申请和专利中所记载的方法和组合物也包括在本公开内容中：美国公开文本 No. 20050186203；20050084906；20050008642；20040202655；20040132028；20030211078；20060083683；20060099205；20060228355；20040081648；20040081647；

20050074865 ;20040259155 ;20050038229 ;20050255548 ;20060246059 ;和 美国 专利 No. 5, 707, 632 ;6, 818, 418 ;和 7, 115, 396 ;及 PCT 国际申请公开文本 No. W02005/085430 ; W02004/019878 ;W02004/029224 ;W02005/056764 ;W02001/064942 ;和 W02002/032925。

[0243] 通过提述的引证

[0244] 本文以提述方式将所记载的所有文件和参考文献（包括专利文件和网站）个别地引证到本文件中，如同它们完整地或部分地书面记载在本文件中一样。

实施例

[0245] 现在参考以下实施例来描述本发明，实施例只是例示性的，并非意图限制本发明。虽然上文中已经结合具体实施方案详细地描述了本发明，但对本领域技术人员显然能够想到可以进行各种变化和修饰而不背离本发明的精神和范围。

[0246] 实施例 1 :EGFR 结合分子的初始鉴定

[0247] 以人纤连蛋白第十个 3 型结构域的支架为基础构建了具有大约 10^{13} 个 RNA- 蛋白质融合物变体的文库，所述变体在第 23-29、52-55 和 77-86 位处具有三个随机化区（氨基酸编号方式依照 SEQ ID NO :1）（“NNS”文库）（Xu 等，Chemistry&Biology 9 :933-942, 2002）。构建了相似的文库，其中使用亚磷酸胺三聚物的混合物代替兼并密码子，以产生缺少色氨酸、苯丙氨酸和半胱氨酸的随机化区（“-WFC”文库）或缺少色氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸的随机化区（“NVH”文库）。转变成 mRNA/cDNA 异双链体后，将多个文库（每个包括一万亿个或更多个 mRNA/cDNA- 蛋白质融合物）在溶液中与 100nM EGFR-Fc 一起温育，并在蛋白 G 包被的磁珠上捕捉存在的复合物。通过高 pH 处理洗脱 cDNA，经 PCR 扩增后，用于生成聚焦度更高的新 mRNA/cDNA- 蛋白质融合物文库，其中富集了 EGFR 结合物。以这种方式实施五轮扩增和选择，并通过定量 PCR 来监测靶物结合。使用 EGFR-Fc 的 s525 变体（EGFR 的氨基酸 1-525 与 Fc 的融合物），或者在 EGFR 存在下使用 EGFR-Fc 实施了类似实验。在两种情况下，RNA- 蛋白质融合物文库均在 5 轮选择后结合靶物。

[0248] 实施例 2 :EGFR 结合克隆的鉴定

[0249] 对由独立克隆编码的蛋白质进行单点直接结合测定，分析它们对 EGFR 全长胞外域以及含有 EGFR 胞外域前 525 个氨基酸的截短型（EGFR 525）的结合情况。使用抗 His 抗体以定向方式捕捉蛋白质克隆，接着与全长 EGFR 或 EGFR 525Fc 融合蛋白一起温育。藉由抗人 Fc HRP 偶联物利用生色读取（即 A450）来检测结合的受体 -Fc。筛选的代表性结果（部分）呈现于表 1，其中显示了 24 个克隆对全长和截短 EGFR 的相对结合强度。与对照（SGE）相比，所有克隆均展现出显著的 EGFR 结合。所述 SGE 对照是如 SEQ ID NO :1 中所示的 ^{10} Fn3 结构域，其中用氨基酸 SGE 取代整联蛋白结合域（RGD）。

[0250] 表 1

[0251]

[0252]

克隆	EGFR-FL-Fc A450	EGFR 525-Fc A450	SEQ ID NO:
SGE	0.1434	0.1385	
679A01	1.568	1.5285	207
679A05	1.428	1.7188	208
679A10	0.787	0.9251	209
679B01	0.213	0.5389	210
679B09	0.455	0.3754	211
679B10	1.376	1.7437	212
679C10	0.467	0.803	213
679F03	2.367	2.4468	214
679F09	2.416	2.4685	215
679G06	2.102	0.1282	216
867A01	1.4045	0.1369	217
867E02	1.4179	1.4313	218
867A03	2.2985	1.8519	219
867B04	2.8105	2.5532	220
867C04	1.9493	1.5665	221
867A05	1.8684	1.6112	222
867B05	2.8208	2.5487	223
867E05	1.7157	1.6823	224
867C07	2.4325	2.1811	225
867B08	2.6106	2.4947	226
867H08	1.8953	1.7903	227
867B09	2.7704	2.4136	228
867B10	2.955	2.5545	229

867F10	2.7801	2.3242	230
--------	--------	--------	-----

[0253] 实施例 3:基于细胞的竞争性配体结合测定

[0254] 基于细胞的竞争性配体结合测定法测量测试样品结合人 A431 细胞表面上的 EGFR, 并与带铕标签的天然 EGFR 配体 (Eu-EGF) 的结合竞争的能力。测试样品与 Eu-EGF 对细胞表面上 EGFR 的结合的竞争是通过荧光信号的降低来测量的。在图 2-4 中将抗 EGFR 抗体 (LA-1) 的竞争性结合与两个 EGFR 结合克隆 (679F03、679F09 和 867A01) 的结合比较。

[0255] 实施例 4:EGFR 特异性克隆的初始优化

[0256] 为了找出亲和力和特异性更好的克隆, 进一步实施诱变来创建更加聚焦度更高的文库以优化结合 EGFR 的环。

[0257] 构建了三个文库, 其中每次用随机序列替换一个环。如材料和方法部分所述在 DNA 水平构建文库, 只是将三个环中两个的随机序列用与所优化克隆对应的固定序列替换。

[0258] 对这三个文库实施扩增、mRNA-蛋白质融合物的合成和亲和选择。每轮监测结合百分比, 并继续 PROfusion™ 直至每个文库显示出超过 1% 的结合。此时, 从每个文库扩增随机环并重新组装, 制备其中所有 3 个环都得到了优化的主文库 (master library) (图 5)。

[0259] 对包含所有 3 个经过优化的环的主文库进行多轮扩增、mRNA-蛋白质融合物合成、亲和选择。使用递减浓度的 EGFR-Fc 以选择亲和力最高的结合者。在第 1 轮中, EGFR-Fc 的浓度是 100nM。在第 2 轮中, EGFR-Fc 的浓度是 1nM。在第 3 轮和第 4 轮中, EGFR-Fc 的浓度是 0.1nM。

[0260] 实施例 5:用于评估经优化衍生物克隆的基于细胞的竞争性配体结合测定

[0261] 比较所选择的经过优化的克隆与优化前的克隆的结合人 A431 细胞表面上 EGF 并与用铕标签标记的天然 EGF 配体 (Eu-EGF) 的结合竞争的能力。在 HTPP 和量化后, 许多克隆展现出优于起始克隆的抑制, 其 IC_{50} 处于低 nM 范围内。

[0262] 实施例 6:经过优化的 EGFR 竞争性 IC_{50} 克隆的热稳定性的检验

[0263] 制备所选择的 EGFR 优化克隆的一升大肠杆菌培养液 (one liter E coli growths) 并纯化蛋白质。实施差示扫描量热法 (DSC) 来表征各个克隆的解折叠能量学或熔解温度 T_m 。

[0264] 实施例 7:经过优化的 EGFR 竞争性克隆的溶液特性的检验

[0265] 制备所选择的优化克隆的一升大肠杆菌培养液并纯化蛋白质。使用大小排阻层析 (SEC) 来测定单体行为。使用 SEC 结合多角度激光散射 (MALLS) 来证实单体性。“经典”光散射 (也称作“静态”或“瑞利”散射或 MALLS) 提供了分子量的直接量度。因此, 它对于确定蛋白质的天然状态是单体还是高级寡聚体, 及对于测量聚集体或其它非天然种类的质量是非常有用的。

[0266] 实施例 8:经过优化的 EGFR 竞争性克隆的结合亲和力和动力学的测定

[0267] 制备所选择的优化克隆的一升大肠杆菌培养液并纯化蛋白质。使用重组的、固定化的 EGFR 和溶液相克隆实施表面等离子共振 (BIAcore) 分析以测定结合动力学和结合亲和力。

[0268] 实施例 9:经过优化的 EGFR 竞争性克隆对其它 HER 家族成员的结合的测定

[0269] 制备所选择的优化克隆的一升大肠杆菌培养液并纯化蛋白质。为了确保 EGFR 竞

竞争性克隆确实是对 EGFR 特异性的,使用 BIAcore 方法学对它们在高浓度下针对其它 HER 家族成员或其他无关受体的作用进行评估。将 HER 家族成员或其他无关受体、以及一种无关蛋白质(作为非特异性结合的对照)固定化到 BIAcore 芯片上。使 10 μ M 的克隆流过芯片来寻找非特异性结合或特异性。

[0270] 实施例 10 :EGFR 克隆在基于细胞的测定中的活性

[0271] 在基于细胞的测定中评估纯化后的 EGFR 克隆以验证活性。在此实施例中描述了来自克隆 679F09 (SEQ ID NO :215) 的结果。对克隆 679F09 筛选直接干扰配体刺激的 EGFR 活化 (ligand-stimulated EGFR activation) 和下游 MAP 激酶信号传导的能力。使用免疫细胞化学测定(细胞内 Western)来测量:1)EGFR 的总磷酸化,2)EGFR 酪氨酸 1068(一个功能上重要的负责细胞溶质信号传导蛋白质结合的残基)上的磷酸化,和 3)ERK (MAP 激酶途径中一种响应 EGFR 活化而刺激生长的组分)的磷酸化。在 A431 表皮样癌细胞和 FaDu 头颈癌细胞中实施这些测定。

[0272] 在 FaDu 细胞中,克隆 679F09 以 1.32 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的 EGFR 酪氨酸 1068 上的磷酸化,且以 2.8 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的 ERK 磷酸化。在 A431 细胞中,克隆 679F09 以 2.4 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的总 EGFR 磷酸化,以 2.88 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的 EGFR 酪氨酸 1068 上的磷酸化,且以 3.1 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的 ERK 磷酸化。

[0273] 利用测量 AKT 磷酸化、总 EGFR 磷酸化、EGFR 酪氨酸 1068 上的磷酸化、和 ERK 磷酸化的 ELISA 测定来评估 DiFi 结肠癌细胞中的上述这些终点,这是因为该细胞系不适合于细胞内 Western 测定。在 DiFi 细胞中,克隆 679F09 以介于 1.8 μ M 和 5.3 μ M 之间的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的 AKT 磷酸化,以 5.3 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的总 EGFR 磷酸化,以 1.49 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的 EGFR 酪氨酸 1068 上的磷酸化,且以大于 4.4 μ M 的 IC_{50} 阻断 EGF 刺激的 ERK 磷酸化。

[0274] 实施例 11 :表位作图

[0275] 使用细胞内 Western (ICW) 测定来确定 EGFR 克隆是否能干扰其它 EGFR 抗体对 EGFR 胞外结构域上已知表位的结合。装配了一组具有规定结合区的抗体(表 2)。将 EGFR 克隆与 A431 细胞一起温育,洗去未结合的蛋白质,并用 BS3 将结合的蛋白质交联至受体。固定细胞,并且在结合位点已知的场合,用抗体进行探查。如果 EGFR 克隆与抗体享有共同的表位,那么克隆对 EGFR 的结合可阻止或降低抗体的结合。

[0276] 表 2 说明了 EGFR 结合性克隆 679F09 以及抗 EGFR 抗体 cetuximab 和 panitumumab 的竞争结合研究的结果。

表2: 针对EGFR胞外结构域的抗体及规定的结合决定簇

[0277]

	克隆	供应者	物种	表位	竞争
1		Abcam ab38165	兔	肽AA 42-58	
2	E234	Abcam ab32198	兔	肽AA 40-80 (无 ICC)	
3	N-20	Santa Cruz#31155	山羊IgG	AA 110-160	
4	ICR10	Abcam ab231 Santa Cruz #57095	大鼠 IgG2a	AA 124-176 ^b , 中和性 ^c	
5	EGFR1	Abcam ab30 Chemicon MAB88910 Labvision MS-311	小鼠IgG1	AA 176-294, 中和性 ^b ab30&MAB88910@ (1mg/ml)	
6	199.12	Labvision MS-396-P	小鼠 IgG2a	AA 124-176, 非中和性 ^b	
7	LA22	Upstate 05-104	小鼠 IgG2a	AA 351-364, 中和性 ^a	C, P
8		Abcam ab15669	Rab	肽AA376-394 ^d	
9	225	Sigma E2156 Labvision MS-269-P	小鼠IgG1	AA 294-475, 中和性 ^{b,c}	C, P, 679F09
10	528	Abcam ab3103 Santa Cruz#120 Labvision MS-268-P	小鼠 IgG2a	AA 294-475, 中和性 ^{b,c}	C, P

[0278]	11	B1D8	Labvision MS-666-P	小鼠 IgG2a	AA 294-475 ^b	C, P, 679F09
	12	LA1	Upstate 05-101	小鼠IgG1	中和性	C, P, 679F09
	13	H11	Labvision MS-316-P	小鼠IgG1	AA 294-475, 非中和性 ^b	679F09
	14	111.6	Labvision MS-378-P	小鼠IgG1	AA 294-475, 中和性 ^b	679F09
	15	29.1	Sigma E2760 Abcam ab10414	小鼠IgG1	外部碳水化合物非 中和性	

[0279] 1 : 100 稀释抗体, 结合弱的可 1 : 50 稀释。^aJBC264(1989)17469 Ala351-Asp364, ^bJImmunological Methods 287(2004)147, ^cMol Biol Med1(1983)511, ^d 针对小鼠 EGFR 的肽生成的, ^eInt J Oncol4(1994)277. C-cetuximab ;P-panitumumab.

[0280] 实施例 12 : 克隆的再优化

[0281] 蛋白质贮存期间常见的降解过程之一是甲硫氨酸或其它氨基酸残基诸如色氨酸、酪氨酸、或组氨酸的氧化。可实施优化以选择保留起始克隆的生物学活性的期望特性和生物物理学特性但替代了环中不想要的甲硫氨酸残基(如果存在的话)的克隆。当鉴定出环中的任何色氨酸、酪氨酸、组氨酸残基易受氧化性破坏时, 亦使用该手段。

[0282] 实施例 13 : 再优化衍生物的直接结合测定

[0283] 针对经过再优化的衍生物使用直接结合测定法筛选增强的对 EGFR 的结合。对于在单点测定法中显示出结合的克隆使用克隆浓度梯度进一步加以分析。

[0284] 实施例 14 : 经过再优化的 EGFR 竞争性克隆的溶液特性的检验

[0285] 再优化的 EGFR 竞争性克隆的 HTPP 物质的大小排阻层析 (SEC) 典型地揭示单体行为, 这表明在较高的蛋白浓度下, 经过优化的克隆不具有聚集趋向。

[0286] 实施例 15 : 再优化的 EGFR 竞争性克隆的结合亲和力和动力学的测定

[0287] 制备了所选择的 FG 环优化的 EGFR 竞争性克隆 (FG loop optimized EGFR competitive clone) 的一升大肠杆菌培养液并纯化蛋白质。使用重组的、固定化的 EGFR 和溶液相克隆实施 BIAcore 分析以确定结合动力学和结合亲和力。典型地, 各克隆的结合亲和力的范围为两位数至三位数 pM。

[0288] 实施例 16 : 再优化的 EGFR 竞争性克隆对其它 HER 家族成员的结合的测定

[0289] 制备所选择的 FG 环优化的 EGFR 竞争性克隆的一升大肠杆菌培养液并纯化蛋白质。为了确保 EGFR 竞争性克隆确实是对 EGFR 特异性的, 使用 BIAcore 方法学对它们在高浓度下针对其它 HER 受体或其他无关受体的作用进行评估。典型地, 大多数克隆在此高浓度不会展现出可检测的对其它 EGFR 家族成员或其它无关受体的结合, 说明这些克隆确实是对 EGFR 特异性的。

[0290] 实施例 17 :再优化的 EGFR 克隆的热稳定性的检验

[0291] 制备了所选择的再优化的 EGFR 竞争性克隆的一升大肠杆菌培养液并纯化蛋白质。实施差示扫描量热法 (DSC) 来表征各个克隆的解折叠能量学或溶解温度 T_m 。

[0292] 实施例 18 :Fn3 结构域的 PEG 化

[0293] 实施 Fn3 结构域的 PEG 化以提高药动学特性。在大肠杆菌表达系统中生成经过优化的克隆,其带有 C 末端半胱氨酸替代。

[0294] 将 SEQ ID NO :235 连接至缺少半胱氨酸残基的克隆的 N 端。使用标准马来酰亚胺化学,利用来自 SEQ ID NO :235 的半胱氨酸残基的单一巯基来偶联于 PEG 变体,以产生两种不同 PEG 化形式。将一条线性 20kDa 双功能 PEG 和一条单功能性分支 40kDa PEG (NOF Corporation) 与克隆缀合。通过离子交换和大小排阻层析将 PEG 化蛋白质形式从未反应的蛋白质和 PEG 中纯化分离。通过 SDS-PAGE、质谱术和分析性大小排阻层析 (其偶联有多角度激光散射) 证实两种 PEG 形式的共价连接。

[0295] 实施例 19 :PEG 化 Fn3 结构域克隆变体的结合亲和力和动力学的测定

[0296] 使用被捕捉在抗人抗体表面上的重组的 EGFR-Fc 以及液相分析物 (PEG 化克隆) 实施表面等离子共振 (BIAcore) 分析,以测定 PEG 化变体的结合动力学和结合亲和力。

[0297] 实施例 20 :EGFR 依赖性细胞系中对 EGFR 结合克隆的抗增殖活性的评估

[0298] 在生长依赖 EGFR 信号传导的 DiFi 结肠癌细胞系中评估克隆的抗增殖活性。以 $10 \mu M$ 和 $1 \mu M$ 一式两份地进行初筛以鉴定活性克隆。一个活性克隆在任一浓度表现出大于 50% 的抑制,而且优选地表现出剂量响应。对于活性克隆继续进行 IC_{50} 测定,方法是测试一式三份八个浓度的连续稀释物。主要的测定方法是测量 ^3H - 胸苷向新合成 DNA 的掺入,但是偶尔也使用一种代谢检测测定,其测量水溶性四唑盐变成有色副产物的转变。在每项实验中包括标准化化合物以验证测定性能和再现性。

[0299] 在 DiFi 细胞中使用 ^3H - 胸苷掺入测定法时,克隆 679F09 在一项实验中轻微地抑制了增殖,但是在另两项实验中未能抑制增殖。

[0300] 实施例 21 :EGFR/IGF-IR PEG 化双特异性分子的生成

[0301] 通过下述方法创建针对 EGFR 和 IGF-1R 二者的双特异性分子 :将对每一种靶物特异性的基于纤连蛋白的支架结构域克隆使用双功能 PEG 分子连接到一起。将每个克隆的 C 端替代为半胱氨酸残基,使得双功能 PEG 能够藉由马来酰亚胺化学连接两个克隆。

[0302] 在本实施例中,利用 SEQ ID NO :203 所示的 IGF-IR 结合克隆和 SEQ ID NO :231 所示的 EGFR 结合克隆。使用两种办法之一来生成适宜的双特异性分子。将 EGFR 克隆、IGF-IR 克隆、和马来酰亚胺-PEG-X-kDa- 马来酰亚胺的等摩尔混合物混合适宜的一段时间,并在最适于根据 pI 差异将两种分离的克隆分开的 pH 条件下,通过离子交换层析对产物进行分离。此分离的理论产物及其比例为 :1 份同特异性 (homospecific) EGFR、1 份同特异性 IGF-IR、和 2 份双特异性 EGFR/IGF-IR。第二种办法是基于依次向 PEG- 接头添加各个种类。将过量的接头 (例如 10 倍过量) 添加至各种类之一,并容许反应进行完成。通过离子交换层析从 PEG 连接的同二聚物和未反应的 PEG- 接头中回收 PEG 化单种类 (PEGylated mono-species)。然后将分离的 PEG 化单种类与等摩尔量的另一种克隆种类反应而生成双特异性分子。

[0303] 实施例 22 :EGFR/VEGFR2 PEG 化双特异性分子的生成

[0304] 以下述方法创建针对 EGFR 和 VEGFR2 二者的双特异性分子 :将针对每一种靶物特

异性的基于纤连蛋白的支架结构域克隆使用双功能 PEG 分子连接到一起。将每个克隆的 C 端替代为半胱氨酸残基,使得双功能 PEG 能够藉由马来酰亚胺化学连接两个克隆。

[0305] 在本实施例中,利用 SEQ ID NO:128 所示的 VEGFR2 结合克隆和 SEQ ID NO:231 中所示的 EGFR 结合克隆。使用两种办法之一来生成适宜的双特异性分子。将 EGFR 克隆、VEGFR2 克隆、和马来酰亚胺-PEG-X-kDa-马来酰亚胺的等摩尔混合物混合一段适宜的时间,并在最有利于根据 pI 差异将两种不同克隆分开的 pH 条件下通过离子交换层析对产物进行分离。此分离的理论产物及其比例为:1 份同特异性 EGFR、1 份同特异性 VEGFR2、和 2 份双特异性 EGFR/VEGFR2。第二种办法是基于顺序向 PEG-接头添加各种类。将过量的接头(例如 10 倍过量)添加至各种类之一,并容许反应进行完成。通过离子交换层析从 PEG 连接的同二聚物和未反应的 PEG-接头回收 PEG 化单种类。然后将分离的 PEG 化单种类与等摩尔数量的另一克隆种类反应以生成双特异性分子。

[0306] 实施例 23:EGFR/EGFR PEG 化双特异性分子的生成

[0307] 通过使用双功能 PEG 分子将对 EGFR 特异性的基于纤连蛋白的支架结构域克隆连接到一起,创建针对 EGFR 的双域分子。将每个克隆的 C 端替代为半胱氨酸残基,以便双功能 PEG 能藉由马来酰亚胺化学连接两个克隆。

[0308] 在本实施例中,利用 SEQ ID NO:231 所示的 EGFR 结合克隆。将 2:1 比例的 EGFR 克隆和马来酰亚胺-PEG-X-kDa-马来酰亚胺混合适宜的一段时间,并通过离子交换层析将产物分离。此分离的理论产物及其比例为 2 份同特异性 EGFR 和 2 份 EGFR/EGFR。

[0309] 实施例 24:EGFR/IGF-IR 多肽连接的双特异性分子的生成

[0310] 通过经多肽接头连接两个克隆来创建针对 EGFR 和 IGF-IR 二者的双特异性分子。两个克隆关于 N 端克隆对 C 端克隆的取向是任意的,但是在本实施例中,EGFR 克隆位于 N 端位置。在本实施例中,利用 SEQ ID NO:215 所示的 EGFR 结合克隆和 SEQ ID NO:236 所示的 IGF-IR 结合克隆。

[0311] 因此,本实施例中的 DNA 构建物是:EGFR 结合克隆-多肽接头-IGF-IR 结合克隆。将它在大肠杆菌中表达并按照常规或从包涵体或可溶性级分中纯化出来。

[0312] 实施例 25:EGFR/VEGFR2 多肽连接的双特异性分子的生成

[0313] 通过经多肽接头连接两个克隆来创建针对 EGFR 和 VEGFR2 二者的双特异性分子。两个克隆关于 N 端克隆对 C 端克隆的取向是任意的,但是在本实施例中,EGFR 克隆位于 N 端位置。在本实施例中,利用 SEQ ID NO:215 所示的 EGFR 结合克隆和 SEQ ID NO:129 所示的 VEGFR2 结合克隆。

[0314] 因此,本实施例中的 DNA 构建物是:EGFR 结合克隆-多肽接头-VEGFR 结合克隆。将它在大肠杆菌中表达并按照常规或从包涵体或可溶性级分中纯化出来。

[0315] 实施例 28:EGFR/EGFR 多肽连接的双特异性分子的生成

[0316] 通过藉由多肽接头连接两个克隆来创建针对 EGFR 的双域分子。在本实施例中,利用 SEQ ID NO:215 所示的 EGFR 结合克隆。因此,本实施例中的 DNA 构建物是:EGFR 结合克隆-多肽接头-EGFR 结合克隆。将它在大肠杆菌中表达并按照常规或从包涵体或可溶性级分中纯化出来。

[0317] 本文中所使用的材料和方法

[0318] 下述材料和方法用于实施例中所描述的实验。

[0319] 重组蛋白：

[0320] EGFR-Fc(R&D Systems,Minneapolis,MN),其由作为Fc融合物的人EGFR胞外域组成,是购得的,且通过Biacore显示出对于EGF结合是有功能的。将人EGFR胞外域的前525个氨基酸克隆到含有人IgG1铰链和恒定区的哺乳动物表达载体中。通过质粒的瞬时转染生成融合蛋白EGFR 525-Fc,随后通过蛋白A层析来纯化该蛋白。使用与对全长胞外域融合物所进行的相似的Biacore测定法分析显示此蛋白质能够结合EGF。

[0321] 引物：

[0322] 通过化学合成制备以下寡核苷酸,最终用于文库构建和选定克隆的诱变。

[0323] T7TMV:5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG-3'(SEQ ID NO:237)

[0324] FnAB:5'-GGG ACA ATT ACT ATT TAC AAT TAC AAT GGT TTC TGA TGT GCC GCG CGA CCT GGA AGT GGT TGC TGC CAC CCC CAC CAG CCT GCT GAT CAG CTG G-3'(SEQ ID NO:238)

[0325] FnBC:5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CGA TAT TAC CGC ATC ACT-3'(SEQ ID NO:239)

[0326] FnBC8:5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG NVH NVHNVH NVH NVH NVH NVH NVH TAT TAC CGC ATC ACT-3'(SEQ ID NO:240)

[0327] FnBC(三聚物):5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG X X X X X X X CGA TAT TAC CGC ATC ACT-3'(SEQ ID NO:241),用于使用三聚物亚磷酰胺来构建BC环

[0328] FnCD:5'-AGG CAC AGT GAA CTC CTG GAC AGG GCT ATT GCC TCC TGT TTC GCC GTA AGT GAT GCG GTA ATA TCG-3'(SEQ ID NO:242)

[0329] FnDE:5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT NNS NNS NNS NNS ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3'(SEQ ID NO:243)

[0330] FnDE(三聚物):5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT X X X X ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3'(SEQ ID NO:244),用于使用三聚物亚磷酰胺来构建DE环

[0331] FnEF:5'-AGT GAC AGC ATA CAC AGT GAT GGT ATA ATC AAC GCC AGG TTT AAG GCC GCT GAT GGT AGC TGT-3'(SEQ ID NO:245)

[0332] FnFG6:5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCAATT TCC ATTAAT TAC-3'(SEQ ID NO:246),用于给出具有6个随机氨基酸的FG环。

[0333] FnFG6(三聚物):5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT X X X X X X CCA ATT TCC ATTAAT TAC-3'(SEQ ID NO:247),用于使用三聚物亚磷酰胺给出具有6个随机氨基酸的FG环。

[0334] FnFG8:5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3'(SEQ ID NO:248),用于给出具有8个随机氨基酸的FG环。

[0335] FnFG8(三聚物):5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT X X X X X X X X CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3'(SEQ ID NO:249),用于使用三聚物亚磷酰胺给出具有8个随机氨基酸的FG环。

[0336] FnFG10:5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3'(SEQ ID NO:250),用于给出具有10个随机氨基酸的FG环。

[0337] FnFG10 :5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT X X X X X X X X X X CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3'(SEQ ID NO :251),用于使用三聚物亚磷酰胺给出具有8个随机氨基酸的FG环。

[0338] FnFG12 :5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (SEQ ID NO :252), 用于给出具有 12 个随机氨基酸的 FG 环。

[0339] FnFG14 :5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS
NNS NNS NNS NNS NNSCCA ATT TCC ATT AAT TAC-3'(SEQ ID NO :253),用于给出具有 14个
随机氨基酸的 FG 环。

[0340] FnG :5'-TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC TGT GCG GTA
ATT AAT GGA AAT TGG-3' (SEQ ID NO :254)

[0341] FLAG :5' -TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC
GTC CTT GTA-3' (SEQ ID NO:255)

[0342] 679F09BC :5' -AGC CTG CTG ATC AGC TGG CAG GTT CCG CGT CCG ATG TAC CAA
TAT TAC CGC ATC ACT TAC-3' (SEQ ID NO :256)

[0343] 679F09DE :5' -CAG GAG TTC ACT GTG CCT GGT GGT GTT CGT ACA GCT ACC ATC
AGC GGC-3' (SEQ ID NO :257)

[0344] 679F09FG :5' -ACT GTG TAT GCT GTC ACT GAC TAC ATG CAT TCT GAA TAC CGT
CAG TAC CCAATT TCC ATT AAT TAC-3' (SEQ ID NO :258)

[0345] F_nCD': 5'-AGG CAC AGT GAA CTC CTG GAC AGG GCT ATT GCC TCC TGT TTC GCC
GTA AGT GAT GCG GTA ATA-3' (SEQ ID NO:259)

[0346] FnB :5' -AGC CTG CTG ATC AGC TGG-3' (SEQ ID NO :260)

[0347] FnD :5' -CAG GAG TTC ACT GTG CCT-3' (SEQ ID NO :261)

[0348] FnF :5' -ACT GTG TAT GCT GTC ACT-3' (SEQ ID NO :262)

[0349] 一级文库构建：

[0350] 通过使用 KOD 聚合酶 (EMD Biosciences, San Diego, CA) 对上文所列的重叠合成寡核苷酸进行延伸来构建多样性文库。在这些寡核苷酸的表述中,“N”代表 A、C、G 和 T 的混合物;“V”代表 A、C 和 G 的混合物;“H”代表 A、C 和 T 的混合物;而“S”代表 C 和 G 的混合物。环的定义与先前所述的那些相同 (Xu 等, 2002)。用 50pmol F_nBC 与 100pmol F_nCD 在补充有 1M 甜菜碱和 3% DMSO 的 100 μl KOD 反应中进行延伸来构建 BC 环。该反应进行 10 个温度循环: 30s 94°C, 30s 52°C 和 1min 68°C, 以确保片段的完全延伸。以相似的方式构建 DE 和 FG 环, 使用 200pmol F_nDE 与 100pmol F_nEF (用于 DE 环) 或者 100pmol F_nFG10 与 200pmol F_nG (用于 FG 环)。分别延伸这三个环后, 将 DE 和 FG 环组合, 并一起再延伸 10 个温度循环: 30s 94°C, 30s 52°C 和 1min 68°C。以相同的方式用 100pmol F_nAB 延伸 BC 环。将 DE/FG 混合物和 BC 环均用新鲜的 KOD 试剂稀释 10 倍并分别用 FLAG 和 T7TMV 延伸 10 个温度循环: 30s 94°C, 30s 52°C 和 1min 68°C。最后, 将各片段组合并一起延伸 10 个温度循环: 30s 94°C, 30s 52°C 和 1min 68°C。这产生了一个 BC 环中具有 7 个随机氨基酸、DE 环中具有 4 个随机氨基酸、且 FG 环中具有 10 个随机氨基酸的文库。通过使用寡核苷酸 F_nFG6、F_nFG8、F_nFG12 或 F_nFG14 代替 F_nFG10 构建了其他具有不同 FG 环长度的文库。将包含长度介于 6 个和 14 个氨基酸之间的 FG 环的文库组合以产生“NNS”文库。

[0351] 使用相同的方法制备“NVH”和“WFC”文库,只是寡核苷酸 FnBC、FnDE 和 FnFG 分别用 FnBC(三聚物)、FnDE(三聚物)和 FnFG(三聚物)替换。在这些寡核苷酸中,X 代表编码用于“NVH”文库的 13 种氨基酸(Lys、Asn、Thr、Gln、His、Pro、Arg、Glu、Asp、Ala、Gly、Tyr、Ser)或用于“-WFC”文库的 17 种氨基酸(Lys、Asn、Thr、Gln、His、Pro、Arg、Glu、Asp、Ala、Gly、Tyr、Ser、Leu、Ile、Met、Val)的亚磷酰胺三聚物的混合物(Glen Research, Sterling, VA)。

[0352] RNA-蛋白质融合物的生成:

[0353] 基本上如 Xu 等,2002, Kurz 等, Nuc. Acid Res. 28 :83, 2000 所述将双链 DNA 文库转变成 RNA-蛋白质融合物(PROfusion™)。简言之,使用体外转录试剂盒(MEGAscript™, Ambion, Austin, Tex)转录 DNA 文库,并通过 NAP-5 柱(GE Healthcare)上的大小排阻层析将所得 RNA 脱盐。取 2nmol RNA,在 200 μ l 含 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH8)和 1.5 倍过量的含嘌呤霉素接头(5'-Pso u agc gga ugc XXX XXX CC Pu-3' (Pu=嘌呤霉素, Pso=C6-补骨脂素, u, a, g, c=2' OMe-RNA, X=9-原子 PEG 间隔物))的溶液中以 314nM 辐射 20 分钟来将其交联。

[0354] 然后使 mRNA-嘌呤霉素分子在 3ml 家兔网织红细胞溶胞物(Ambion, Austin, Tex)中翻译。使用寡聚 dT 纤维素(GE Healthcare)纯化所得的 mRNA-蛋白质融合物,并使用 2nmol 引物 FLAG 和 Superscript II 逆转录酶(Invitrogen)依照制造商的说明书逆转录。

[0355] 通过 M2 Flag 琼脂糖(Sigma, St Louis, MO)纯化 cDNA/mRNA-蛋白质融合物并通过 PCR 定量。由此得到了经纯化的大约 10^{12} 个全长克隆的文库,使用引物 T7TMV 和 FLAG 对其进行 PCR 扩增,供后续 PROfusion™ 实验用。

[0356] 对 EGFR 的结合的亲选择和:

[0357] 在蛋白 G 包被的磁珠(Invitrogen)上包被人 IgG(Sigma)以生成负选择基质。将 RNA-蛋白质融合物文库与该负选择基质混合以除去结合蛋白 G 或靶物的 Fc 区的克隆。用磁铁分离磁珠,收集未结合的级分并添加至含 0.05% Tween20 和 1mg/ml BSA(Ambion)的 PBS 中的 100nM EGFR-Fc。30 分钟后,将结合的蛋白质捕捉到蛋白 G 包被的磁珠上,并使用 Kingfisher 磁性粒子处理仪(Thermo Electron, Waltham, MA)清洗 6 次。将 cDNA 在 100mM KOH 中洗脱,用 100mM Tris-HCl 中和,并通过 PCR 扩增以生成富集了结合 EGFR 的分子的第二代文库。将扩增、mRNA-蛋白质融合物的合成、和亲和选择这一连续过程实施总共 5 次,并通过 PCR 来定量所结合的分子。扩增第 4 轮和第 5 轮后得到的结合群,并通过重组(InFusion™, Clontech, Mountain View, CA)连接入包含 T7RNA 聚合酶和框内 His₆ 标签的大肠杆菌表达载体中。将连接混合物转化入大肠杆菌菌株 BL21(DE3)pLysS(Invitrogen),该菌株在用 IPTG 诱导后表达 T7RNA 聚合酶,由此提供可诱导的蛋白质表达。

[0358] 自克隆 679F09 构建单环随机化文库:

[0359] 构建了三个文库,其中用随机序列替换单环。这些文库是如上所述用 KOD 聚合酶通过重叠延伸在 DNA 水平构建的,不同之处是三个环中两个的随机序列是用与克隆 679F09 对应的固定序列替换的。BC 环中的固定序列由寡核苷酸 679F09BC 提供,DE 环中的固定序列由寡核苷酸 679F09DE 提供,而 FG 环中的固定序列由寡核苷酸 679F09FG 提供。它们在文库构建过程中替换了对应的随机寡核苷酸 FnBC、FnDE、或 FnFG10。位置 XX 的随机化要求用引物 FnCD' 代替 FnCD,及 FnBC8 代替 FnBC。另外,“NVH”密码子的使用使得文库中去除了

疏水性氨基酸。

[0360] 其中来自 679F09 的 BC 环被替换为随机氨基酸的文库,是通过如上所述地装配寡核苷酸:T7TMV+FnAB+FnBC8+FnCD'+679F09DE+FnEF+679F09FG+FnG+FLAG 而构建的。其中来自克隆 679F09 的 DE 环被替换为随机氨基酸的文库,是通过如上所述装配寡核苷酸:T7TMV+FnAB+679F09BC+FnCD'+FnDE(三聚物)+FnEF+679F09FG+FnG+FLAG 而构建的。其中来自克隆 679F09 的 FG 环被替换为随机氨基酸的文库,是通过装配寡核苷酸:T7TMV+FnAB+669F09BC+FnCD'+679F09+FnEF+FnFG10(三聚物)+FnG+FLAG 而构建的。

[0361] 自克隆 679F09 构建三环随机化文库:

[0362] 如上所述地对衍生自克隆 679F09 的三个单环文库进行 PROfusion™ 选择。每个文库中幸存的克隆包含 2 个来自亲本克隆的环和 1 个来自随机序列(其与每种克隆的结合相容)的环。使用结合周围支架区的寡核苷酸引物扩增这三个随机环(每个文库一个)。使用寡核苷酸引物 FnB 和 FnCD' 从包含可变 BC 环的文库扩增 BC 环。使用寡核苷酸引物 FnD 和 FnEF 自包含可变 DE 环的文库扩增 DE 环。使用寡核苷酸引物 FnF 和 FnG 从包含可变 FG 环的文库扩增 FG 环。通过琼脂糖凝胶电泳纯化这三个切出的环,以等比例混合,并利用 KOD 聚合酶先后用引物 FnAB 与 FnG、T7TMV 与 FLAG 进行扩增。

[0363] 含 3 个随机环的克隆的优化:

[0364] 如上所述将三环随机化文库进行多轮扩增、RNA-蛋白质融合物的合成、和亲和选择。使用递减浓度的 EGFR-Fc 以选择结合亲和力最高者。4 轮后,将所得蛋白质群克隆入大肠杆菌,进行如上所述的分析。

[0365] 针对 EGFR 的直接结合 ELISA

[0366] 将得自上述选择的蛋白质群在大肠杆菌中作为带 His6 标签的蛋白质表达。直接结合 ELISA 依赖于将带 His6 标签的克隆定向捕捉到经酪蛋白封闭缓冲液(Pierce, Rockford, IL)封闭 1-2 小时的抗 His 单克隆抗体板(EMDBiosciences, San Diego, CA)上。典型地,将 1:50 稀释的 HTPP 材料(0.2-2ug)捕捉 1 小时,接着与 50nM EGFR-Fc 靶物一起温育。通过与抗人 HRP 一起温育来检测结合的 EGFR-Fc。使用显色底物 TMB(BD Biosciences, San Jose, CA)遵循制造商的说明来检测结合的 HRP 缀合物。

[0367] 基于细胞的竞争性配体结合测定

[0368] 对于从上述选择过程获得的克隆,在基于细胞的竞争性配体结合测定中进行测定,以确定克隆是否与 EGF(天然配体)竞争与细胞表面上的 EGFR 的结合。将人上皮癌细胞克隆 A431(该细胞在细胞表面上大量表达 EGFR)铺板于 96 孔组织培养板中,让其贴壁 48 小时。用无血清培养基清洗细胞,将选出的克隆的稀释液与细胞一起在增湿温箱中 37℃、5% CO₂ 温育 15 分钟。该温育容许克隆结合至细胞表面上的 EGFR。然后以 10nM 的终浓度将钼标记的 EGF(Eu-EGF)添加至细胞,并于 4℃再温育 3 小时。温育后,用冷的 PBS 清洗细胞以除去未结合的克隆和 Eu-EGF,向细胞添加 50ul 增强液(Perkin Elmer),并于 37℃温育 45 分钟。此步骤自 EGF 配体解离钼标记物,生成荧光信号,荧光信号通过时间分辨荧光(time resolved fluorescence)来测量。信号强度与结合于细胞表面的 Eu-EGF 的量相关。信号强度的剂量响应性降低表明特定克隆与钼标记的天然 EGF 配体竞争对 EGFR 的结合。

[0369] 高通量蛋白质制备(HTPP):

[0370] 将选定的结合物克隆入 pDEST-14 载体中,转化入大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 细胞,

以 24 孔格式接种 5ml 含 50 μ g/mL 羧苄青霉素和 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 培养基, 于 37°C 培养过夜。制备新鲜的 5ml LB 培养基 (50 μ g/mL 羧苄青霉素和 34 μ g/mL 氯霉素) 培养物, 吸出 200 μ l 过夜培养物分配入适宜的孔, 进行诱导型表达。将培养物于 37°C 培养直至 A_{600} 0.6–1.0。与 1mM 异丙基- β -硫代半乳糖苷 (IPTG) 一起温育后, 将培养物于 30°C 再培养 4 小时, 并通过于 4°C 以 3220g 离心 30 分钟来收获。将细胞离心沉淀物冷冻于 -80°C。

[0371] 将细胞离心沉淀物 (24 孔格式) 重悬于 450 μ l 裂解缓冲液 (50mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 1x Complete™ 蛋白酶抑制剂鸡尾酒 – 无 EDTA (Roche), 1mM PMSF, 10mM CHAPS, 40mM 咪唑, 1mg/ml 溶菌酶, 30ug/ml DNA 酶, 2ug/ml 抑肽酶 (aprotinin), pH 8.0), 室温摇动 1 小时来裂解。将溶胞物转移入配有 96 孔 650 μ l 捕捉板的 96 孔 Whatman GF/D Unifilter 并以 200g 离心 5 分钟, 以澄清溶胞物并将其重设成 96 孔格式。将澄清后的溶胞物转移至经平衡缓冲液 (50mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 10mM CHAPS, 40mM 咪唑, pH 8.0) 平衡的 96 孔 Ni 螯合板并温育 5 分钟。用真空除去未结合的物质。将树脂用 1 号清洗缓冲液 (50mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 5mM CHAPS, 40mM 咪唑, pH 8.0) 2x0.3ml/孔清洗, 用真空除去每次的清洗液。接着, 将树脂用 PBS 3x0.3ml/孔清洗, 用真空除去每步的清洗液。在洗脱前, 将每个孔用 50 μ l 洗脱缓冲液 (PBS+20mM EDTA) 清洗, 温育 5 分钟, 并通过真空弃去该清洗液。向每个孔中另加 100ul 洗脱缓冲液来洗脱蛋白质。于室温温育 30 分钟后, 将板以 200g 离心 5 分钟, 并在有 5 μ l 10.5M MgCl_2 固定至 Ni 板底部的 96 孔捕捉板中收集所洗脱的蛋白质。使用 BCA 测定定量所洗脱的蛋白质, 以溶菌酶作为蛋白质标准品。

[0372] 可溶性基于纤连蛋白的支架蛋白结合物的中等规模表达和纯化:

[0373] 为了表达, 将所选择的克隆 (后面有 His6 标签) 克隆入 pET9d (EMD Biosciences, San Diego, CA) 载体, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 细胞中表达。用 20ml 接种培养物 (自单个涂布菌落产生的) 接种 1 升含 50 μ g/mL 羧苄青霉素和 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 培养基。将培养物于 37°C 培养直至 A_{600} 0.6–1.0。用 1mM 异丙基- β -硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导后, 将培养物于 30°C 培养 4 小时并通过 4°C 以 $\geq 10,000$ g 离心 30 分钟来收获。将细胞沉淀物冷冻于 -80°C。使用 Ultra-turrax 匀浆仪 (IKA works) 在冰上将细胞沉淀物重悬于 25mL 裂解缓冲液 (20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 1x Complete™ 蛋白酶抑制剂鸡尾酒 – 不含 EDTA (Roche), 1mM PMSF, pH 7.4)。使用 M-110S 型微流化仪 (Microfluidics) 通过高压 ($\geq 18,000$ psi) 匀浆来实现细胞裂解。通过于 4°C 以 23,300g 离心 30 分钟来分离可溶性级分。经 0.45 μ m 滤器将上清液澄清。将澄清后的溶胞物 (lysate) 加载到用 20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, pH 7.4 预平衡的 HisTrap 柱 (GE) 上。然后用 25 个柱体积的 20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, pH 7.4 洗柱, 接着用 20 个柱体积的 20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 25mM 咪唑, pH 7.4 洗柱, 再接着用 35 个柱体积的 20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 40mM 咪唑, pH 7.4 洗柱。用 15 个柱体积的 20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 500mM 咪唑, pH 7.4 洗脱蛋白质, 根据 A280 吸光度合并级分, 并针对 1x PBS, 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.5 或 50mM NaOAc; 150mM NaCl; pH4.5 透析。通过 0.22 μ m 过滤除去任何沉淀物。

[0374] EGFR 结合克隆的 PEG 化

[0375] 使用 C 型克隆及对其 2 倍过量的 PEG-40-kDa (NOF Corporation) 利用马来酰亚胺化学来制备 EGFR 结合克隆-PEG40 分子。让反应于室温进行 2.5 小时。通过阳离子交换层析 (SP-HiTrap; GE) 将游离 PEG-40 与克隆-PEG-40 分开。将反应混合物用 20mM NaH_2PO_4 ,

pH 6.7 1 : 10 稀释,并施加于用平衡缓冲液 (20mM NaH_2PO_4 , 10mM NaCl , pH 6.7) 预平衡的 SP-HiTrap 柱,用平衡缓冲液清洗,并用 20mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl , pH 6.7 洗脱。根据 SDS-PAGE 分析合并所洗脱的级分。经 G25 层析 (GE) 将 SP 合并洗脱液的缓冲液交换为 PBS。

[0376] 使用 PEG-20-kDa (NOF Corporation) 和对其 2 倍过量的纯化的克隆 -C, 通过马来酰亚胺化学制备 PEG20-EGFR 结合克隆 -PEG20 分子。让反应于室温进行 1 小时。通过 20mM NaH_2PO_4 , 10mM NaCl , pH 6.7 缓冲液中的 SEC 层析 (Superose 6 ;GE) 将未 PEG 化的蛋白质与 PEG20- 克隆 -PEG20 分开。合并含有 PEG20- 克隆 -PEG20 的级分并进一步纯化以除去单 PEG 化的克隆。这是通过阳离子交换层析 (SP ;GE) 来实现的。将 SP-HiTrap 柱用缓冲液 A (20mM NaH_2PO_4 , 10mM NaCl , pH 6.7) 预平衡,加载 SEC 洗脱物,然后用缓冲液 A 清洗柱子,再然后运行 5 个柱体积的 0-10% 缓冲液 B (20mM NaH_2PO_4 , 1.0M NaCl , pH 6.7) 梯度并再保持 5 个柱体积。通过 50% 缓冲液 B 的洗脱自 SP 柱洗脱 PEG20- 克隆 -PEG20。根据 A280 合并级分,并通过 G25 层析 (GE) 将缓冲液交换为 PBS。

[0377] 可溶性基于纤连蛋白的支架蛋白的 BIAcore 分析 :

[0378] 使用 Biacore 3000 或 T100 生物传感器 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 测量基于纤连蛋白的支架蛋白结合蛋白对靶物的结合动力学。遵循制造商的指令在 Biasensor CM5 芯片的流动槽 1 和 2 (Fc1 和 Fc2) 上直接固定化抗人抗体 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。动力学分析涉及 :使 EGFR-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) 或自制的截短型 EGFR 525-Fc 被捕捉到 Fc2 上的抗人 IgG 上,然后将含有克隆的溶液注射到 Fc1 和 Fc2 上。通过 2 次连续注射 3M MgCl_2 来再生抗人抗体表面。获得每个浓度的传感图,并使用制造商的程序 Biaevaluation 或 Biacore T100 软件来评估,以确定速率常数 k_a (k_{on}) 和 k_d (k_{off})。自速率常数 k_{off}/k_{on} 的比值计算解离常数 K_D 。典型地,将纯化的克隆在运行缓冲液 HBS-EP (10mM Hepes 150mM NaCl 3mM EDTA 0.05% 表面活性剂 P20) 中稀释成一系列浓度 (0 μM 至 2 μM), 评估它们针对抗人 IgG 捕捉的人 EGFR-Fc 融合蛋白的结合。

[0379] 对于测定对其它相关家族成员诸如 HER2 或 HER3 的结合的实验,如上所述使用抗人 IgG 抗体捕捉重组胞外域 -Fc 融合物。通过扣除对空白参照流动槽 1 观察到的结合来计算对人 EGFR 或其它相关家族成员 (如 HER2 或 HER3) 的特异性结合。VEGFR2-Fc, 一种无关受体,充当额外的非特异性结合参照。将 EGFR 结合克隆在 HBS-EP (10mM Hepes, 150mM NaCl , 3mM EDTA, 0.05% 表面活性剂 P20) 中稀释至 10 μM , 并于 25°C 在流动槽上以 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注入 5 分钟,观察 10 分钟里的解离情况。

[0380] 差示扫描量热法 :

[0381] 实施中等规模克隆的差示扫描量热法 (DSC) 分析以测定热稳定性。在 3 个大气压下以每分钟 1 度的速率将温度自 5°C 上升至 95°C, 在 N-DSC II 量热计 (Calorimetry Sciences Corp) 中扫描适宜克隆的 1mg/ml 溶液。使用 Origin 软件 (OriginLab Corp) 以用适宜缓冲液进行的对照实验为参照分析数据。

[0382] 大小排阻层析 :

[0383] 大小排阻层析 (SEC) 使用 TSKgel Super SW2000 柱 (TOSOH Biosciences, LLC), 4.6mmx30cm, 在 Agilent 1100 HPLC 系统上进行,使用 A214nm 和 A280nm 的 UV 检测和荧光检测 (激发 = 280nm, 发射 = 350nm)。使用的缓冲液为 100mM 硫酸钠, 100mM 磷酸钠, 150mM 氯化钠, pH 6.8, 流速 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。以大约 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度分别注入样品 (每种 0.1-1 μg)。

使用凝胶过滤标准品 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 来进行分子量校准。

[0384] 克隆的 SEC MALLS 分析：

[0385] 在配备有 Waters 2487UV 检测仪的 Waters Breeze HPLC 系统上实施大小排阻层析 (SEC), 使用 Superdex 200 柱 (GE Healthcare), 流动相为以 0.6ml/min 流速施加的 100mM 硫酸钠, 100mM 磷酸钠, 150mM 氯化钠 pH 6.8。将样品用流动相稀释至大约 1.0mg/ml 并注入 50 μ l。使用在 UV 检测仪之后铅封接入管线 (plumbed in-line) 的 miniDAWN 光散射检测仪 (Wyatt Technology Corporation) 和 Optilab DSP 差示折光仪 (Wyatt Technology Corporation) 实施多角度激光散射 (MALLS) 分析。使用 Astra V 5.1.9.1 版软件 (Wyatt Technologies Corporation) 实施对光散射数据的分析。为了通过 280nm 吸光度计算克隆的浓度, 使用基于氨基酸序列的理论摩尔消光系数。对于根据折光率的浓度测定, 使用 0.185mL/g 的估计比折光率增量 (dn/dc)。

[0386] MALDI TOF 质谱：

[0387] 使用 Voyager DE PRO 质谱仪 (Applied Biosystems) 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱分析 EGFR 结合克隆 (图 14)。将样品用 0.1% TFA 稀释至大约 1.0mg/ml。将大约 12 μ l 样品加载到 C4 ZipTip (Millipore Corporation) 上并用 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 清洗以除去盐和污染物。使用 2 μ l 芥子酸基质 (70% 乙腈, 0.1% TFA 中, 10mg/ml) 将样品直接自 ZipTip 洗脱到目标板上。使用质量已知的两种蛋白质标定仪器：细胞色素 C (12361.96Da) 和脱铁卟啉肌红蛋白 (16952.27Da), 在芥子酸中制备 5 μ M 的终浓度并点到板上。以如下仪器设置获取光谱：加速电压 25000V, 栅极电压 (Grid Voltage) 91%, 导线 (Guide Wire) 0.1%, 提取延迟时间 400nsec, 激光强度 3824。原始谱图在 Data Explorer 4.5 版 (Applied Biosystems) 中通过应用基线校正和高斯平滑算法 (滤波器宽度值为 9) 加以处理。

[0388] 3H- 胸苷掺入增殖测定

[0389] 以 2,500 个细胞每孔在 96 孔微量滴定板中铺入细胞。24 小时后添加在 PBS 中溶解的化合物, 并将培养物再温育 72 小时。将细胞用 4 μ Ci/mL [3H] 胸苷 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) 冲激 3 小时, 用胰蛋白酶处理, 并收获到 UniFilter-96, GF/B 板 (Perkin-Elmer, Boston, MA) 上。在 TopCount NXT (Packard, Meriden, CT) 上通过闪烁计数来测量进入 DNA 的掺入。结果表述成 IC₅₀, 即将细胞增殖抑制到未处理对照细胞的细胞增殖的 50% 所需要的药物浓度。数据是一式三份孔的平均值, 并给出了 SE。

[0390] 水溶性四唑盐增殖测定法

[0391] 在不含酚红的完全培养基中接种细胞, 并如上所述用 EGFR 结合克隆处理。在处理期结束时, 向每个孔添加 10 μ l/孔 WST-8 试剂 (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg MD), 并将板于 37 $^{\circ}$ C 在 5% CO₂ 中温育 3 小时。通过在 SpectraMAX Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上读取 450nm 处的吸光度来定量甲臯染料的积累。

[0392] 细胞内 Western 测定

[0393] 对于 A431 表皮样癌或 FaDu 头颈癌细胞, 将细胞以 24,000 细胞/孔接种入聚 D-赖氨酸包被的微量滴定板 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 并容许贴壁过夜。清洗

细胞,在无血清培养基中温育 24 小时。然后对细胞施加各克隆的连续稀释物,温育 4 小时,之后用 100ng/ml EGF 刺激 10 分钟。刺激后,将细胞在含有 3.7% 甲醛的 PBS 中固定 20 分钟,然后在含有 0.1% Triton-X-100 的 PBS 中透化 15 分钟。将细胞在 Odyssey 封闭液中封闭 1 小时,并与抗体一起温育以检测酪氨酸 1068 上磷酸化的 EGFR (Cell Signaling, Beverly, MA) 和肌动蛋白 (Sigma, St. Louis, MO) 或 ERK (酪氨酸 202/ 苏氨酸 204 上磷酸化的 MAP 激酶和总 ERK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。在含有 0.1% Tween-20 的 PBS 中清洗 3 次后,添加二抗 (Invitrogen, Carlsbad, CA 或 Rockland, Gilbertsville, PA)。将细胞在含有 0.1% Tween-20 的 PBS 中清洗 3 次,并在 Li-Cor Odyssey 红外成像系统 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska) 上成像。一式三份地测定每个克隆,以最大信号百分比抑制减去背景的结果进行线性回归分析计算 IC_{50} 值。

[0394] 通过阻断性 EGFR 抗体进行的表位作图

[0395] 将 A431 细胞以 24,000 细胞 / 孔接种入聚 D- 赖氨酸包被的微量滴定板,并容许贴壁过夜。次日,将每个孔用冷的 PBS 清洗一次,并将细胞与各种浓度的克隆一起于 4℃ 预温育 1 小时。用冷的 PBS 洗去未结合的蛋白质,用含 1mMBS3 的 PBS pH = 8.0 于 4℃ 处理 1 小时以将结合的蛋白质交联至受体。倒掉板的内容物,添加 50ul/ 孔的 50mM Tris-HCl pH = 7.5 于室温温育 15 分钟以淬灭交联反应。将板在 PBS+0.1% Tween-20 中清洗一次,在 PBS+3.7% 甲醛中固定 20 分钟。将板在 Odyssey 封闭液中于室温封闭 1 小时。除去封闭液,向板添加在 Odyssey 封闭液中 1 : 100 或 1 : 50 稀释的各种一抗,于室温温育 1 小时。将板清洗三次,并向板添加在 Odyssey 封闭液 +0.2% Tween-20 中 1 : 800 稀释的二抗及 TOPRO3 复染剂 1 : 3000,并于室温温育 1 小时。将板清洗三次,并在 Li-Cor Odyssey 红外成像系统上以 160uM 分辨率成像。

[0396] 用于测定 DiFi 细胞中总 EGFR 磷酸酪氨酸水平的 ELISA 测定

[0397] 在微量滴定板的每个孔中铺入 1×10^5 个 DiFi 细胞,并容许它们贴壁过夜,以测定对 EGF 刺激的 EGFR 磷酸化的抑制。次日,用无血清培养基更换培养基,并让细胞饥饿 16 小时。将 EGFR 结合克隆或对照抗体与细胞一起于 37℃ 温育 4 小时。然后将细胞用 20ng/ml EGF 刺激 10 分钟,并在 HNTG[50mM Hepes, 150mM NaCl, 0.5% Triton-X-100, 8% 甘油, 2mM Na_3PO_4 , 1.5mM $MgCl_2$, 1mMEDTA, 含有蛋白酶抑制剂 AEBSF、抑肽酶、亮肽素、苯丁抑制素、胃蛋白酶抑制剂 -A 和 E64] 中制备细胞溶胞物。将溶胞物转移至用对人 EGF 受体胞外结构域特异性的一抗 (Cell Signaling, Beverly, MA) 包被的捕捉板。将检测抗体替换为缀合有辣根过氧化物酶的小鼠单克隆抗磷酸酪氨酸抗体 (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)。使用显色底物四甲基联苯胺在分光光度计上于 450nm 测量吸光度。每次测定中一式三份地测试样品,通过减去背景并计算总最大信号的百分比抑制来确定 IC_{50} 值。

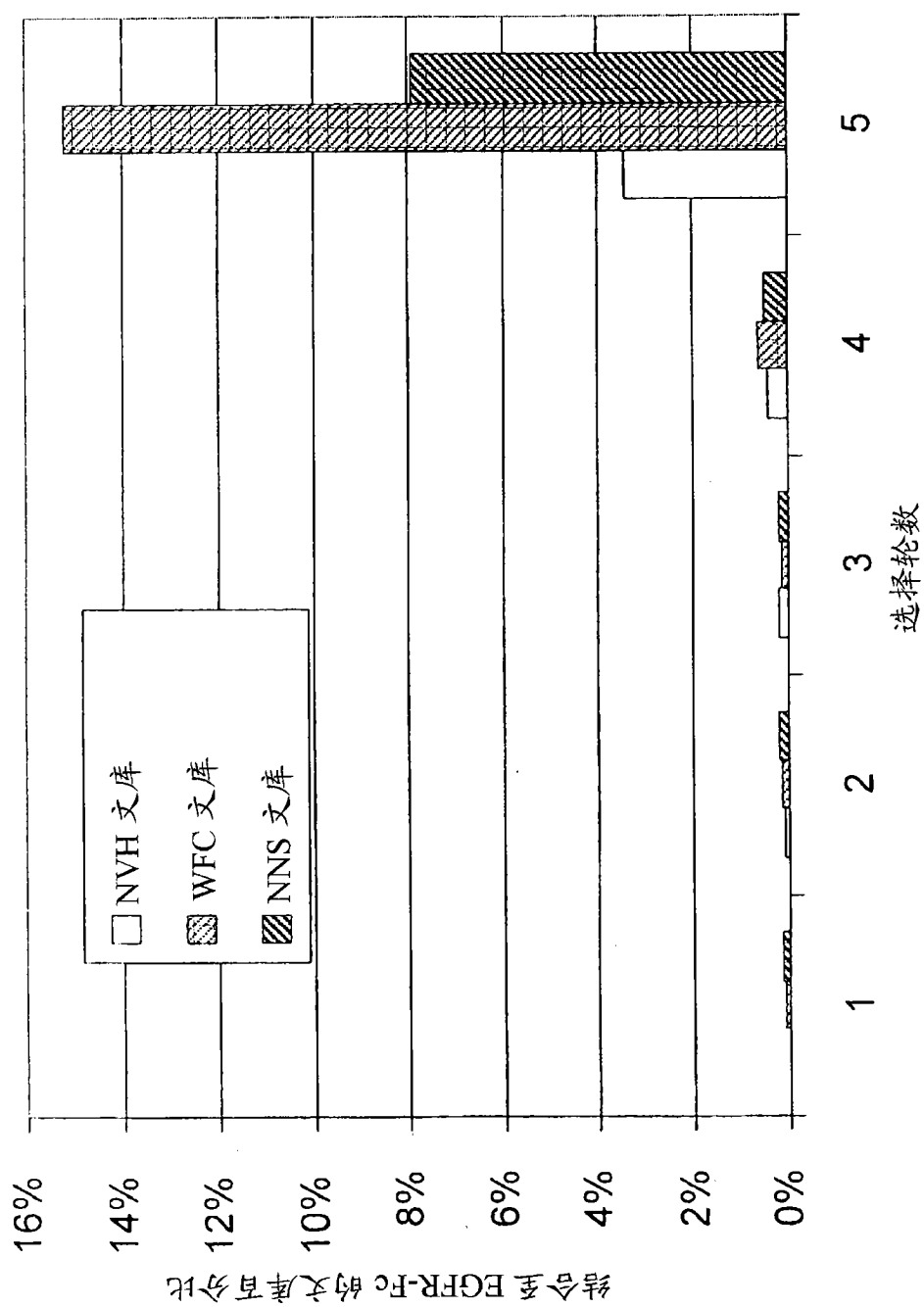


图 1

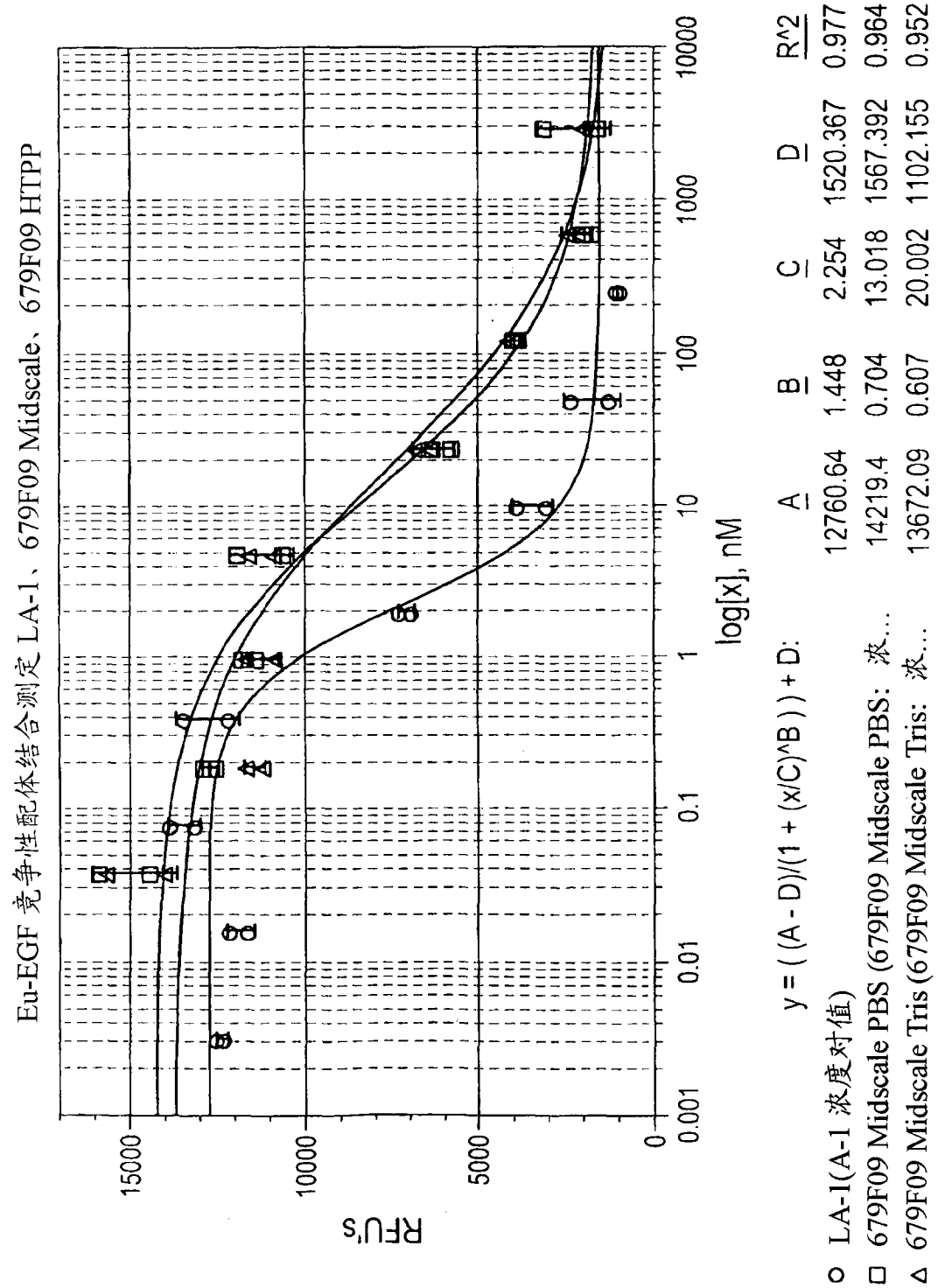


图 2

Eu-EGF 竞争性配体结合测定法: LA-1、679F09、867A01

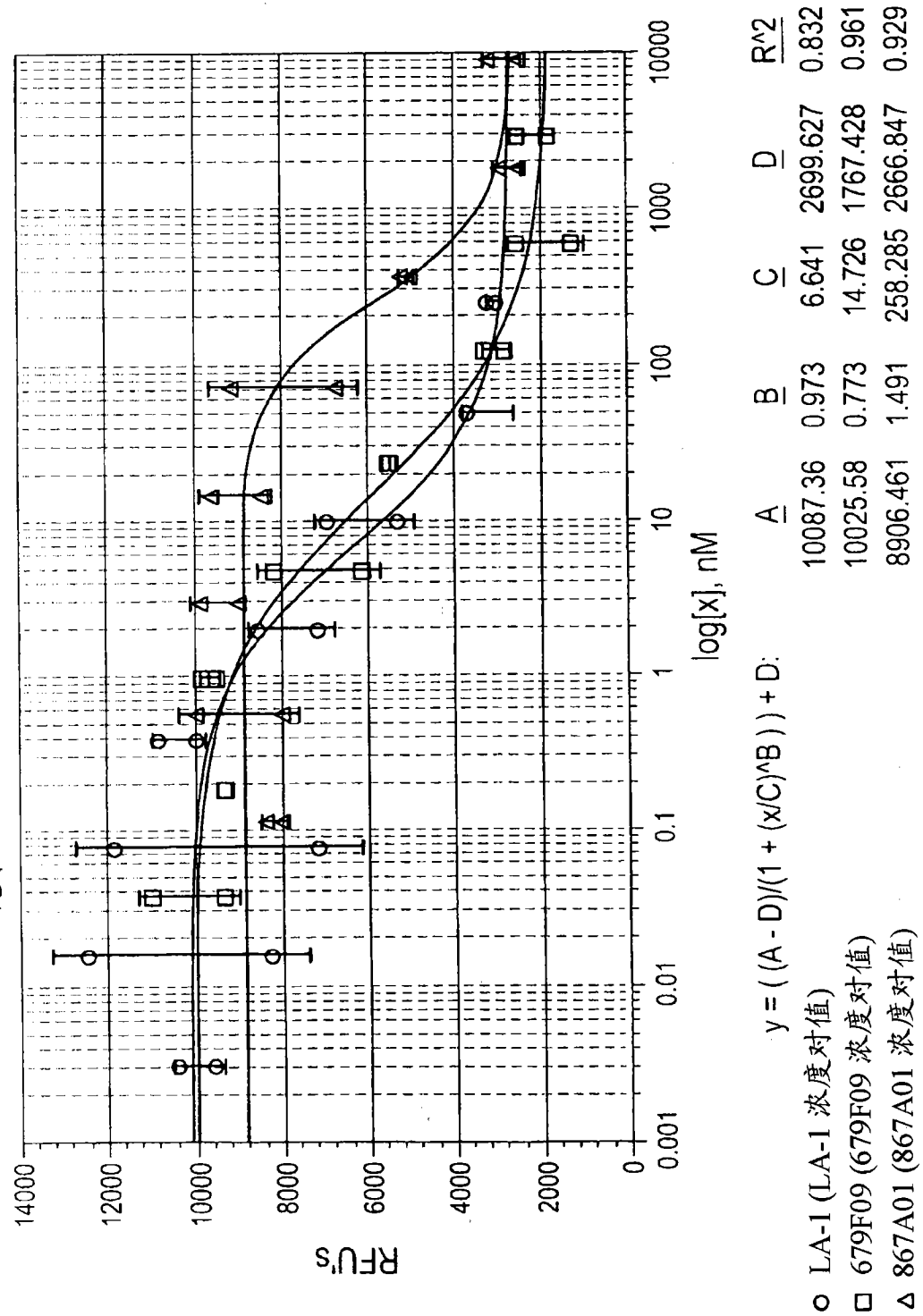
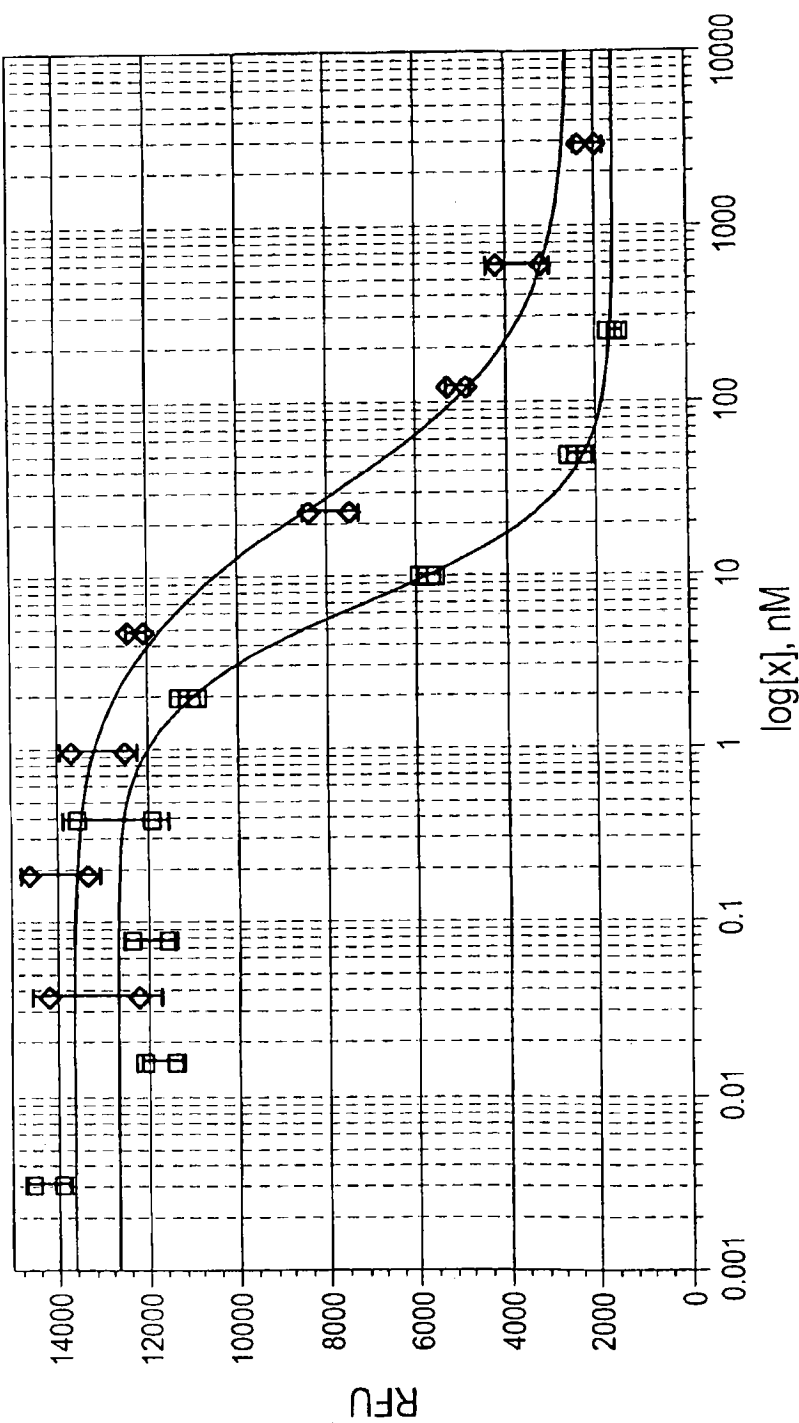


图 3

Eu-EGF 竞争性配体结合测定法: LA-1 和 679F03 Midscale



$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
□ LA-1(LA-1 新: 浓度对值)	12698.19	1.385	6.944	1583.689	0.97
◇ 679F03 (679F03 新: 浓度对值)	13681.82	0.903	26.847	2538.884	0.976

图 4

使用 PROfusion 及 100nM EGFR-Fc 优化具有一个随机环的文库

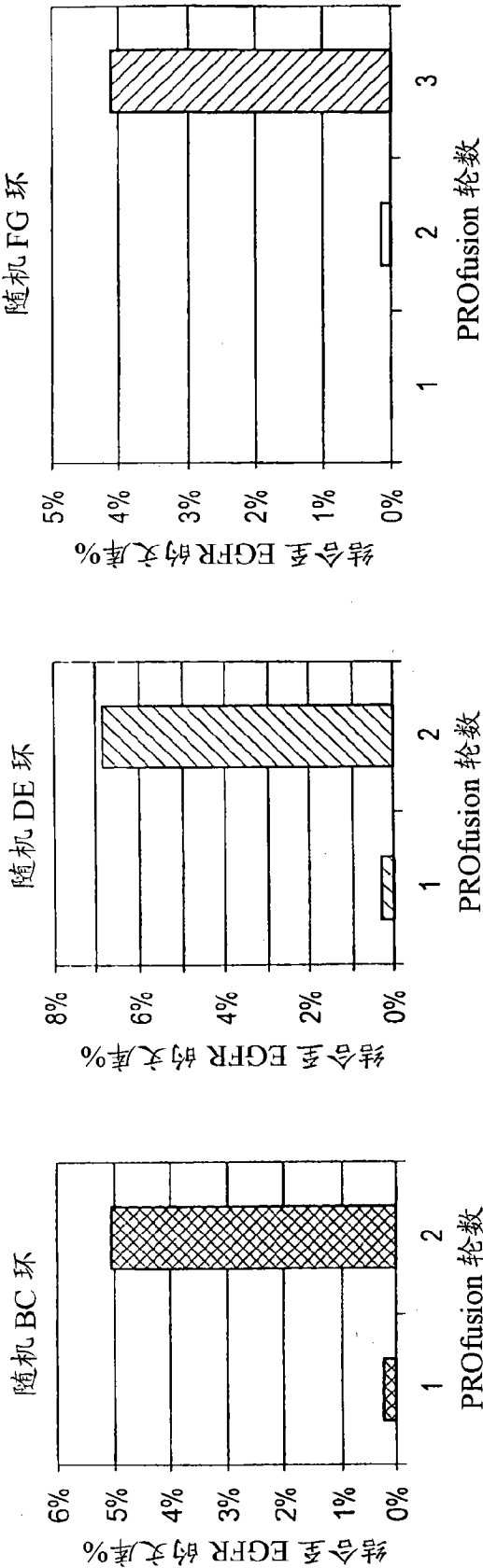


图 5A

扩增各环并重组成主文库

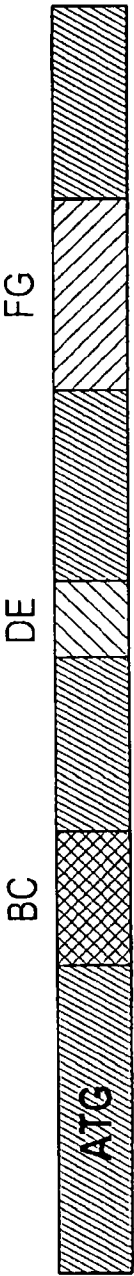


图 5B

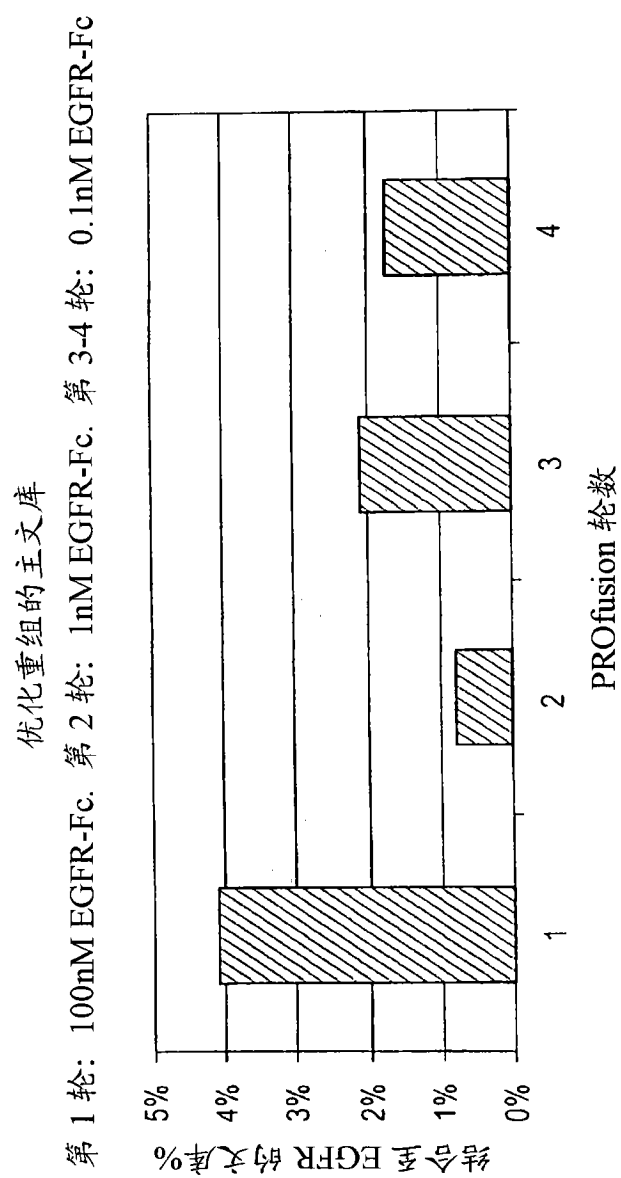


图 5C

BC 环	DE 环	FG 环	SEQ ID NO.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	DAVTVRRYRITYGETGGNSPVQEFV	RGSKSTATISGLKPGVDYITVYAVT	GRGESPASSKPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	RAARQNLRRYRITYGETGGNSPVQEFV	PLPNATISGLKPGVDYITVYAVT	VGVPFYDMLIGLLYPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	LPPEFVLRYYRITYGETGGNSPVQEFV	SRLLTATISGLKPGVDYITVYAVT	SSNGFYSKILSLWPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	GPHVLGSRYYRITYGETGGNSPVQEFV	PWERATATISGLKPGVDYITVYAVT	LRTGLPTLHSPGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	IFIPSTWRYYRITYGETGGNSPVQEFV	TMDDHATATISGLKPGVDYITVYAVT	LDHRSLLWPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	PTHYKVA RYYRITYGETGGNSPVQEFV	YHDHATATISGLKPGVDYITVYAVT	DYKMKPRNYGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	SYESYKY RYYRITYGETGGNSPVQEFV	AYYPTATISGLKPGVDYITVYAVT	EKGHYRYIYAPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	GSHLKVK RYYRITYGETGGNSPVQEFV	FTSRATATISGLKPGVDYITVYAVT	KERNYRPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	APYVRVA RYYRITYGETGGNSPVQEFV	TLSRTATISGLKPGVDYITVYAVT	TRNYGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	GSHLKVK RYYRITYGETGGNSPVQEFV	YTSRTATISGLKPGVDYITVYAVT	KSQHSRPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	SVEAMDC RYYRITYGETGGNSPVQEFV	EEPCTATISGLKPGVDYITVYAVT	TKYYLLVIEPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	DPHNQDP RYYRITYGETGGNSPVQEFV	AAYSATATISGLKPGVDYITVYAVT	DKEHHQYLLNPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	IGLDGLV RYYRITYGETGGNSPVQEFV	AEKQATATISGLKPGVDYITVYAVT	TDTGFIARLMSLIPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	IYVLHHI RYYRITYGETGGNSPVQEFV	SQHHATATISGLKPGVDYITVYAVT	ETRPYRYLMYPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	PPYL RVA RYYRITYGETGGNSPVQEFV	SSARATATISGLKPGVDYITVYAVT	PSNIIGRHYGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	GTHVKVP RYYRITYGETGGNSPVQEFV	YSDHATATISGLKPGVDYITVYAVT	DYDYKPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	SPYL RVA RYYRITYGETGGNSPVQEFV	SSARATATISGLKPGVDYITVYAVT	PSNIIGRHYGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	EVRYYPY RYYRITYGETGGNSPVQEFV	SKYSATATISGLKPGVDYITVYAVT	DYKMKPRNYGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	TTHFTVS RYYRITYGETGGNSPVQEFV	EVHYATATISGLKPGVDYITVYAVT	HRRRRYHPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	DHMPGG RYYRITYGETGGNSPVQEFV	SSYPATATISGLKPGVDYITVYAVT	YSYLYQYNHAPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	YNOPRRN RYYRITYGETGGNSPVQEFV	AYYPTATISGLKPGVDYITVYAVT	QTNMHYLMHYPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	GSKLLVQ RYYRITYGETGGNSPVQEFV	PLAKATATISGLKPGVDYITVYAVT	KMRDYRPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	IYRSYKR RYYRITYGETGGNSPVQEFV	SNYPATATISGLKPGVDYITVYAVT	QQYSSPTYSHPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	SPYL RVA RYYRITYGETGGNSPVQEFV	SAARATATISGLKPGVDYITVYAVT	ASLIIGRHYGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	NHTLKVQ RYYRITYGETGGNSPVQEFV	YTHSATATISGLKPGVDYITVYAVT	ERESYRYMHPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	SDTLRVK RYYRITYGETGGNSPVQEFV	YHSQATATISGLKPGVDYITVYAVT	PSMMNYRNYGPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	DNSFVVO RYYRITYGETGGNSPVQEFV	RYARATATISGLKPGVDYITVYAVT	ALNPRAYRPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	SSRLIVR RYYRITYGETGGNSPVQEFV	WGNRTATISGLKPGVDYITVYAVT	KMRDYRPIISINYRT
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSW	SSRLIVR RYYRITYGETGGNSPVQEFV	WGNRTATISGLKPGVDYITVYAVT	HTRPRNYGPIISINYRT

图 6(第 1 部分)

30. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGTGRLRVSRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPRSVE TATISGLKPGVDYITVYAVT LNSLRRYGPISINYRT
 31. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWEYDRPAGRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPSSYP TATISGLKPGVDYITVYAVT QTNMXYLMHYPISINYRT
 32. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSTHFTVSGRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPKVNYP TATISGLKPGVDYITVYAVT RTRNYGPISINYRT
 33. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWDKHAYYQRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPENHYP TATISGLKPGVDYITVYAVT DRTHSRIYHRPISINYRT
 34. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWPNNTSRGRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPASYP TATISGLKPGVDYITVYAVT ERVAYRYMHKPI
 35. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSHRLRVKRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPSHYQ TATISGLKPGVDYITVYAVT EKTSYRIMHSPISINYRT
 36. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWEYDGTAGRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPSSYP TATISGLKPGVDYITVYAVT YSYLYQYNHAPISINYRT
 37. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSHRLRVKRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPSHYQ TATISGLKPGVDYITVYAVT PAVYYSYNYGPISINYRT
 38. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWNHTLKVQRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPYTHS TATISGLKPGVDYITVYAVT NYKGPGRGYGPISINYRT
 39. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWDNNFLVQRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPRYAH TATISGLKPGVDYITVYAVT KMRDYPISINYRT
 40. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSDVFPAYRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPAHSP TATISGLKPGVDYITVYAVT PSMNRYRNYGPISINYRT
 41. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWFFQAVSNRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPAYPN TATISGLKPGVDYITVYAVT YMSGHRLHAPISINYRT
 42. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWYPSLILERYRIRITYGETGNSPVQEFVTPDLRL TATISGLKPGVDYITVYAVT DKKSRYRYHAPISINYRT
 43. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWYNDPRNRRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPAYYP TATISGLKPGVDYITVYAVT IKGLYQYTYHPISINYRT
 44. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWYNDPRNRRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPSSYP TATISGLKPGVDYITVYAVT YSYLYQYNHAPISINYRT
 45. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWQYNTSRGRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPASYP TATISGLKPGVDYITVYAVT ERVAYRYMHKPI
 46. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWPEVHRVVQRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPAGQF TATISGLKPGVDYITVYAVT LGKFRSYLPISINYRT
 47. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSYNMKPHRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPSSYP TATISGLKPGVDYITVYAVT DRYMYRMLHKPI
 48. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGTGRLRVSRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPRSVE TATISGLKPGVDYITVYAVT LNSLRRYGPISINYRT
 49. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGTVRRVARYRIRITYGETGNSPVQEFVTPALGT TATISGLKPGVDYITVYAVT RTRNYGPISINYRT
 50. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWYLDTRDRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPPYPM TATISGLKPGVDYITVYAVT ESQYRRIHRPISINYRT
 51. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWAPYVRVARYRIRITYGETGNSPVQEFVTPTLSR TATISGLKPGVDYITVYAVT RTRNYGPISINYRT
 52. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWYSEHDYRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPHNP TATISGLKPGVDYITVYAVT DHGQYRKMHSPI
 53. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWVQEFVTPRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPAYYP TATISGLKPGVDYITVYAVT QTNMXYLMHYPISINYRT
 54. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGRVSKHRRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPVPGT TATISGLKPGVDYITVYAVT REAPTGIPI
 55. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWKKKYHMDRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPDAY S TATISGLKPGVDYITVYAVT YDGIPI
 56. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWVNDPQNRRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPAYYP TATISGLKPGVDYITVYAVT YSHIKYLYHKPI
 57. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWEYDRAVKKRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPAYYP TATISGLKPGVDYITVYAVT EHSVVRMHVPI
 58. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWASQVIGHRYRIRITYGETGNSPVQEFVTPALPNTATISGLKPGVDYITVYAVT KMRDYPISINYRT

图 6(第 2 部分)

59. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWGLDDYYG RYYRITYGETGGNSPVQEFVPGSYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DRKEVMYVHEPISINYRT
 60. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWKYYGSRD RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESEYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DSRLRYTHAPISINYRT
 61. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSRAVRVR RYYRITYGETGGNSPVQEFVPEANMEPTATISGLKPGVDYITIVYAVT IPHYRNYKIPISINYRT
 62. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSYVYAPY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAHYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT EKTSYRIMHSPISINYRT
 63. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYMPHRN RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAHYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DQNYRYRHKIPISINYRT
 64. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTDYDAHKR RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT EKGSLKILHYIPISINYRT
 65. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWAPYVRVA RYYRITYGETGGNSPVQEFVPTLSRPTATISGLKPGVDYITIVYAVT SPSLRDYRIPISINYRT
 66. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWPEYVRN RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAHYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT TKGVHYLYHSPISINYRT
 67. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWPDIPIVA RYYRITYGETGGNSPVQEFVPEVGTPTATISGLKPGVDYITIVYAVT SSMLYIQIEPISINYRT
 68. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWAFSGYSY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESEYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DKNTYRYRHKIPISINYRT
 69. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDHSGSSY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESEYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DKNTYRYRHKIPISINYRT
 70. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHVTSDRN RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAHYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT IYKGHQIQYIPISINYRT
 71. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWIPYSGPS RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAHYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT QSVIVYKQAAIPISINYRT
 72. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSYDQSRY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAHYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DKNTYRYRHKIPISINYRT
 73. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWGEPLDARYYRITYGETGGNSPVQEFVPEHSDPTATISGLKPGVDYITIVYAVT AGSWLRIMIPISINYRT
 74. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWPKRPMNRYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT YLYATYVMHQIPISINYRT
 75. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSYDQSRY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAHYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT ERDRYSYMHIPISINYRT
 76. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWFEQAVSN RYYRITYGETGGNSPVQEFVPAFPNPTATISGLKPGVDYITIVYAVT KMRDYRIPISINYRT
 77. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYHDMHRS RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT KSGGYQVMHTIPISINYRT
 78. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYMYMGY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DRKHYYMYHHIPISINYRT
 79. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYMPHRN RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT NHHVHRLMHIIPISINYRT
 80. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHEDEPSTY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT DYHELVMYHHIPISINYRT
 81. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDEIEFPVRYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT MHYYLVRVWIPISINYRT
 82. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSTHFTVS RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT HSRPRHYHIPISINYRT
 83. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWGHKIRVS RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT VAYNYLRDYKIPISINYRT
 84. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSNLLVQRYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT PGHLRKYGIPISINYRT
 85. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDYDRSKY RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT QKDIYYIYIIPISINYRT
 86. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWGDELVAARYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT HLLGTLWLIPISINYRT
 87. VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLYLRVK RYYRITYGETGGNSPVQEFVPESSAYPTATISGLKPGVDYITIVYAVT SPSLRGYGPISINYRT

图 6(第 3 部分)

88. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYADMHRKRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSSYPATISGLKPGVDYITVYAVTSKYSGHYVHNPI SINYRT
 89. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWLDLSLKMRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSHHQATISGLKPGVDYITVYAVTEYAAVRMMHPI SINYRT
 90. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWGLILGRDRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPAFPPATISGLKPGVDYITVYAVTYRGFDITFFNPISINYRT
 91. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWLPSPAITIRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPDPLSATISGLKPGVDYITVYAVTYRYSTWPI SINYRT
 92. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWVYENNRQRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSYYPATISGLKPGVDYITVYAVTQSQHAYYHLPI SINYRT
 93. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWVEFEHKPDYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPAEQATISGLKPGVDYITVYAVTEYAAVRMMHPI SINYRT
 94. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWDEIEFPVRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPGPRGATISGLKPGVDYITVYAVTMHYLRVWPI SINYRT
 95. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSYNMKPQRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSSYPATISGLKPGVDYITVYAVTDYMYRMLHPI SINYRT
 96. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYEHIRGRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSSYPATISGLKPGVDYITVYAVTGYQYYYHSPI SINYRT
 97. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYNDPRNRRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPAYYPATISGLKPGVDYITVYAVTYRYSYQYHAPI SINYRT
 98. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYDDHAQRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSTYPATISGLKPGVDYITVYAVTVRGVYYYQPI SINYRT
 99. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWPTSCKNGRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSSYPATISGLKPGVDYITVYAVTEVQHYRYLHAPI SINYRT
 100. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWPTHYKVARRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPAYYPATISGLKPGVDYITVYAVTEHSHVRRMHVPI SINYRT
 101. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWLMKLYLERRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPPSYIATISGLKPGVDYITVYAVTYHESQEGAGHPI SINYRT
 102. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWEYVEYTHRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPAVHYATISGLKPGVDYITVYAVTYMDTSMYVSSPI SINYRT
 103. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWKYDSYSNRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSSYPATISGLKPGVDYITVYAVTYQSIYYMHSPISINYRT
 104. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWEYDGPAGRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSSYPATISGLKPGVDYITVYAVTQTNMHYLMHYPI SINYRT
 105. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWDYDRSKYRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPASYPATISGLKPGVDYITVYAVTQKDIYYIYNPI SINYRT
 106. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYMPHRNRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSTYPATISGLKPGVDYITVYAVTNHHVHRLMHPI SINYRT
 107. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSSHLPYDRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPKYKATISGLKPGVDYITVYAVTKGVHYLEFHSPI SINYRT
 108. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWQYDRSSYRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPASYPATISGLKPGVDYITVYAVTVGNMYSIVPI SINYRT
 109. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYTPYKYSRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPSHSATISGLKPGVDYITVYAVTVGTYQYXYLPI SINYRT
 110. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSDSLKVSRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPKQYHATISGLKPGVDYITVYAVTPSNIIGRHYGPI SINYRT
 111. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSARLKVARRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVYAVTKMRDYRPI SINYRT
 112. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSTALKVQRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPKHSHTATISGLKPGVDYITVYAVTKMRDYRPI SINYRT
 113. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWPTHYKVARRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPKHTYATISGLKPGVDYITVYAVTTTKGLRHYGPI SINYRT
 114. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSDKLVQRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPKHDRATISGLKPGVDYITVYAVTKMRDYRPI SINYRT
 115. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSKRLQVSRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPMNYKATISGLKPGVDYITVYAVTPSNIIGRHYGPI SINYRT
 116. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSNRLVVRRYRIRITYGETGGNSPVQEFVTPHOMKATISGLKPGVDYITVYAVTPGGYSGRNYGPI SINYRT

图 6(第 4 部分)

117. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSENLRVQRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSVSHVATISGLKPGVDYITVYAVTKMRDYRPISINYRT
 118. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSSNLVVKRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSKPSATISGLKPGVDYITVYAVTDYENKPRNYGPIISINYRT
 119. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWPTHYKVAIRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSKHESATISGLKPGVDYITVYAVTLNVAYSREVRPIISINYRT
 120. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWPDHVKVQRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSQHSRATISGLKPGVDYITVYAVTYTGCTERNYQPIISINYRT
 121. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWGSHLRVSGRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSDHSATISGLKPGVDYITVYAVTQGNRGRNYQPIISINYRT
 122. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWKGHLVWQRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSRGHYATISGLKPGVDYITVYAVTKMRDYRPISINYRT
 123. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWTTNLQVSGRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSKANTATISGLKPGVDYITVYAVTVSKGNRSYGPIISINYRT
 124. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWAEHLQVSGRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSRGVYATISGLKPGVDYITVYAVTPSNIIGRHYGPIISINYRT
 125. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWPQHLLRVQRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSRGSDATISGLKPGVDYITVYAVTKMRDYRPISINYRT
 126. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTEGPNERSLFIPIISINYRT
 127. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTEGPNERSLFIPIISINYRT
 128. GEVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYTEIDKPCQ
 129. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRT
 130. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTMGLYGHHELLTPIISINYRT
 131. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTDGNGQFLLVPIISINYRT
 132. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTMGPNDNELLTPIISINYRT
 133. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTAGWDDHELLFPIISINYRT
 134. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTSGHNDHMLMIPISINYRT
 135. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTAGYNDQILMTPIISINYRT
 136. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTFGLYKELLIPISINYRT
 137. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTTGPNDRLLFVPIISINYRT
 138. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTDVYNDHEIKTPIISINYRT
 139. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTDGKGRVLLTPIISINYRT
 140. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTEVHHDEIKTPIISINYRT
 141. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTQAPNDRVLYTPIISINYRT
 142. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTREENDHELLIPISINYRT
 143. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTVTHNGHPLMTPIISINYRT
 144. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTLAKGHHELLTPIISINYRT
 145. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTVAQNDELITPIISINYRT
 146. VSDVPRDLQEVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTMAQSGHELFTPIISINYRT
 147. EVVAAATPTSLLSISWRHHPFPTRYRIRITYGETGNSPVQEFVPSLPQPTATISGLKPGVDYITVYAVTVERNGRVLMTPIISINYRT

图 6(第 5 部分)

148. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVERNGRHMLTPIISINYRT
 149. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTLERNGRELMTPIISINYRT
 150. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTEERNGRTRLTPIISINYRT
 151. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVERNDRVLTPIISINYRT
 152. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVERNGRELMTPIISINYRT
 153. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTLERNGRELMTPIISINYRT
 154. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTDGRNDRKLMVPIISINYRT
 155. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTDQNGRLLNVPISINYRT
 156. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVHNGRELMTPIISINYRT
 157. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTEENGRVLMTPISINYRT
 158. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVERNGHTLMTPIISINYRT
 159. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVENGRQLMTPIISINYRT
 160. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTLERNQVLTPIISINYRT
 161. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVERNQVLYTPIISINYRT
 162. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTWYKDHELLIPISINYRT
 163. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTLGRNDRELLTPIISINYRT
 164. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTDGPNDRLLNIPISINYRT
 165. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTFARDGHEILLTPIISINYRT
 166. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTLEQNGRELMTPIISINYRT
 167. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTVEENGRVLTNTPIISINYRT
 168. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTLEPNGRYLMVPIISINYRT
 169. EVVAAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVDYITGYAVTEGRNGRELFIPISINYRT
 170. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTWERNGRELFTPIISINYRT
 171. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTKERNGRELFTPIISINYRT
 172. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTTERTGRELFTPIISINYRT
 173. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTKERSGRELFTPIISINYRT
 174. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTLERDGRELFTPIISINYRT
 175. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTKERNGRELFTPIISINYRT
 176. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTWERNGRELFTPIISINYRT
 177. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTLERNGRELFTPIISINYRT
 178. MGEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTDGRNGRLLSIPISINYRT
 179. MGEVVAATPTSLLSISWRHPPFPTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPAATISGLKPGVDYITGYAVTDGRNGRLLSIPISINYRT

图6(第6部分)

180. MVS DVPRDLEVVAAATPTSLLSWSRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPPTATISGLKPGVDYITVAVTDGNGRLLSIP-S-NYRTEIDKPSQ
 181. MGEVVAATPTSLLSWSRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPPTATISGLKPGVDYITVAVTDGNGRLLSIPISINYRT
 182. MGEVVAATPTSLLSWSRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPPTATISGLKPGVDYITVAVTEGPNERSLFIPISINYRT
 183. MVS DVPRDLEVVAAATPTSLLSWSRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPPTATISGLKPGVDYITVAVTEGPNERSLFIPISINYRT
 184. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTRFRDYQPIISINYRT
 185. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTRIRIDYGPISINYRT
 186. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTAYROYQPIISINYRT
 187. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTRERDYRPIISINYRT
 188. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTAVRDYRPIISINYRT
 189. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTELRNYGPIISINYRT
 190. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTSLRDYAPIISINYRT
 191. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTQLRDYSPISINYRT
 192. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTNLRDYGPISINYRT
 193. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTERRDYRPIISINYRT
 194. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTTLVRNYGPIISINYRT
 195. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTTRIDYRPIISINYRT
 196. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTLLRDYGPISINYRT
 197. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTLLTRDYKPIISINYRT
 198. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTVVRDYRPIISINYRT
 199. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTSYRDYWPISINYRT
 200. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTMSRDYGPISINYRT
 201. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTSLRDYGPISINYRT
 202. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTGVRNYGPIISINYRT
 203. GVS DVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTRFRDYQPIISINYTEIDKPCQ
 204. GVS DVPRDLEVVAAATPTSLLSWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITVAVTRFRDYQPIISINYTEIDKPSQ
 205. EVVAAATPTSLLSWSRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPPTATISGLKPGVDYITVAVTDGNGRLLSIPISINYTEIDKPSQ
 206. EVVAAATPTSLLSWSRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPPTATISGLKPGVDYITVAVTDGNGRLLSIPISINYTEIDKPCQ
 207. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWARYAGSDRYRITYGETGGNSPVQEFVDPVPTATISGLKPGVDYITVAVTMGHAPTVDIHWTPSPISINYRT
 208. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWARYAECGRYRITYGETGGNSPVQEFVDPVPTATISGLKPGVDYITVAVTLGKPLPGWVSGLDPIISINYRT
 209. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWDRMLSFLRYRITYGETGGNSPVQEFVPLIYPTATISGLKPGVDYITVAVTVQLDQCLRHGPIISINYRT
 210. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWLLLGAPCRYRITYGETGGNSPVQEFVPMWGLTATISGLKPGVDYITVAVTSEAPCVKWRCPISINYRT
 211. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSWMRWYAPRRYRITYGETGGNSPVQEFVPMWGLTATISGLKPGVDYITVAVTRGQSGGLGMPISINYRT

图6(第7部分)

212. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWRLTAPLGRYYRITYGETGNSPVQEFVDPDIPFTATISGLKPGVDYITVYAVTILSDAHGGLRDVPI SINYRT
 213. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSRYAPGGRRYYRITYGETGNSPVQEFVDPDPWTATISGLKPGVDYITVYAVTILSNVEYLARNPISIN YRT
 214. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWHYYSQSQRYYRITYGETGNSPVQEFVPEHYATATISGLKPGVDYITVYAVTDYAYKEYEYEPISIN YRT
 215. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWQVPRPMYQRYRITYGETGNSPVQEFVPGGVRTATISGLKPGVDYITVYAVTDMHSEYRQYPI SINYRT
 216. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSDYYDNRYRITYGETGNSPVQEFVPRYMMTATISGLKPGVDYITVYAVTYSYHDEPNMMPISIN YRT
 217. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWQQHTNRYRITYGETGNSPVQEFVPGRASTATISGLKPGVDYITVYAVTEHPYVGDPPI SINYRT
 218. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWIRRAKPGRYRITYGETGNSPVQEFVDPDPWTATISGLKPGVDYITVYAVTLDGVRVGYLDHPISIN YRT
 219. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYRHYPERYYRITYGETGNSPVQEFVDPDPSTATISGLKPGVDYITVYAVTYNHSSTPI SINYRT
 220. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSRYQSYRYRITYGETGNSPVQEFVPHASNTATISGLKPGVDYITVYAVTVDYTA VQVSYPI SINYRT
 221. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWESKYVUNRYRITYGETGNSPVQEFVPHLMTATISGLKPGVDYITVYAVTVGGDHMYSSLPI SINYRT
 222. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYRKYPGRYYRITYGETGNSPVQEFVDPDEHTTATISGLKPGVDYITVYAVTYDSPSQPI SINYRT
 223. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSRYQSYRYRITYGETGNSPVQEFVDPDEHTTATISGLKPGVDYITVYAVTVQVSYPI SINYRT
 224. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWNRHAMASRYRITYGETGNSPVQEFVDPDPFTATISGLKPGVDYITVYAVTMSDKAMDRTPSIGPI SINYRT
 225. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWHSNYVDYRYRITYGETGNSPVQEFVDPDPFTATISGLKPGVDYITVYAVTDMVRESYPPISIN YRT
 226. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWLSRVPAYDRYYRITYGETGNSPVQEFVPHYDHATATISGLKPGVDYITVYAVTVDYTA VQVSYPI SINYRT
 227. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYLSHSMRYRITYGETGNSPVQEFVDPDPWTATISGLKPGVDYITVYAVTLDSDMRVGVPI SINYRT
 228. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWYLSHSMRYRITYGETGNSPVQEFVDPVHYTATISGLKPGVDYITVYAVTSDKISVTVSGPI SINYRT
 229. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWKSUVVDYRYRITYGETGNSPVQEFVPHSNLTATISGLKPGVDYITVYAVTVYESYVANDSPISIN YRT
 230. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWHTYKDYRYRITYGETGNSPVQEFVPHMAYNTATISGLKPGVDYITVYAVTVMQALLYSIPI SINYRT
 231. VSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWQVPRPMYQRYRITYGETGNSPVQEFVPGGVRTATISGLKPGVDYITVYAVTDMHSEYRQYPI SINYRT
 232. PSTSTST
 233. EIDKPSQ
 234. GSGSGSGSGS
 235. EIDKPCQ
 236. GVSDVPRDLEVVAAATPTSLLSISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYITVYAVTRFRDYQPI SINYRT

图 6(第 8 部分)