(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113201073 A
(43)申请公布日 2021.08.03

(21)申请号 202110097790.X

(22)申请日 2013.11.21

(30)优先权数据
61/728912 2012.11.21 US
61/782550 2013.03.14 US
61/809541 2013.04.08 US
61/864717 2013.08.12 US
61/892797 2013.10.18 US

(62)分案原申请数据
201380071081.8 2013.11.21

(71)申请人 詹森生物科技公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 M·赵 S·莫雷斯 J·内斯森 P·帕伦 J·舒尔曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 黄希贵

(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 33/243(2019.01)
A61K 31/475(2006.01)
A61K 31/517(2006.01)
A61K 31/5377(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

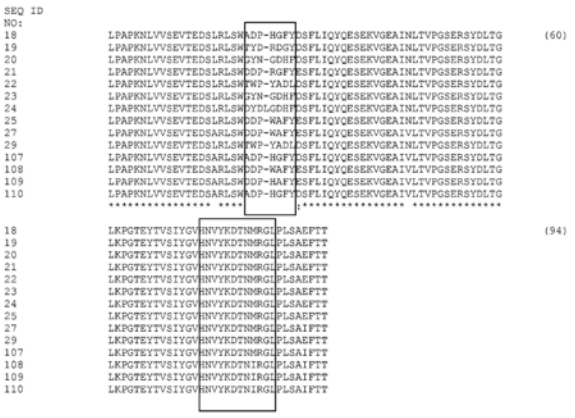
权利要求书5页 说明书120页
序列表163页 附图18页

(54)发明名称

双特异性EGFR/c-Met抗体

(57)摘要

本发明涉及双特异性EGFR/c-Met抗体及制备和使用所述分子的方法。表皮生长因子受体(EGFR、ErbBI或HERI)是由c-erbBI原癌基因编码的170kDa I型跨膜糖蛋白。EGFR是受体酪氨酸激酶(RTK)的人表皮生长因子受体(HER)家族的成员,所述家族包括HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4)。EGFR信号传导通过如下方式引发:配体结合,之后诱导构象变化,所述受体与其他ErbB家族成员的同源二聚化或异源二聚化。



CN 113201073 A

1.一种分离的双特异性表皮生长因子受体(EGFR)/肝细胞生长因子受体(c-Met)抗体,其包含:

a) 第一重链(HC1),其包含HC1恒定域3(HC1 CH3)和HC1可变区1(VH1);

b) 第二重链(HC2),其包含HC2恒定域3(HC2 CH3)和HC2可变区2(VH2);

c) 第一轻链(LC1),其包含轻链可变区1(VL1);和

d) 第二轻链(LC2),其包含轻链可变区2(VL2),

其中所述VH1和所述VL1配对以形成特异性结合EGFR的第一抗原结合位点,所述VH2和所述VL2配对以形成特异性结合c-Met的第二抗原结合位点,所述HC1在所述HC1 CH3中包含至少一个替换,并且所述HC2在所述HC2 CH3中包含至少一个替换,并且当根据EU索引对残基进行编号时,所述HC1 CH3中的替换和所述HC2 CH3中的替换在不同氨基酸残基位置处发生,其中

i) 所述VH1包含分别为SEQ ID NO: 210、211和212的重链互补决定区(HCDR)1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且

ii) 所述VL1包含分别为SEQ ID NO: 213、214和215的轻链互补决定区(LCDR)1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3氨基酸序列;

iii) 所述VH2包含分别为SEQ ID NO: 216、217和218的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且

iv) 所述VL2包含分别为SEQ ID NO: 219、220和221的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中:

a) 所述抗体为人抗体,和其中所述VH1、所述VL1、所述VH2和所述VL2分别包含SEQ ID NO: 189、190、193和194的氨基酸序列;和/或

b) 其中所述抗体抑制NCI-H292、NCI-H1975或SKMES-1细胞系中胞外信号相关激酶1和2(ERK1/2)的磷酸化,其中与用包含重链3(HC3)和轻链3(LC3)的对照单价EGFR抗体以及包含重链4(HC4)和轻链4(LC4)的对照单价c-Met抗体的混合物抑制NCI-H292、NCI-H1975或SKMES-1细胞系中ERK1/2的磷酸化的IC_{50}值相比,所述抗体的IC_{50}值小至少约10倍、小至少约20倍、小至少约30倍、小至少约40倍、小至少约50倍或小至少约60倍,其中

所述HC3与所述HC1、所述LC3与所述LC1、所述HC4与所述HC2、以及所述LC4与所述LC2分别具有相同的氨基酸序列,并且

通过夹心免疫测定法,将抗磷酸化ERK1/2抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的结合于非磷酸化和磷酸化ERK1/2的抗体用作检测抗体,在全细胞裂解物中测量ERK1/2的磷酸化;

任选其中:

i) 所述抗体以约2×10^{-9}M或更小、约1×10^{-9}M或更小、或约1×10^{-10}M或更小的IC_{50}值抑制ERK1/2的磷酸化;和/或

ii) ERK1在残基Thr202和Tyr204处被磷酸化,并且ERK2在残基Thr185和Tyr197处被磷酸化;和/或

c)所述抗体抑制NCI-H1975细胞系中蛋白激酶B(AKT)在Ser473处的磷酸化,其中与用包含所述HC3和所述LC3的对照单价EGFR抗体以及包含所述HC4和所述LC4的对照单价c-Met

抗体的混合物抑制NCI-H1975细胞系中AKT在Ser473处的磷酸化的IC_{50}值相比，所述抗体的IC_{50}值小至少约70倍，其中

所述HC3与所述HC1、所述LC3与所述LC1、所述HC4与所述HC2、以及所述LC4与所述LC2分别具有相同的氨基酸序列，并且

通过夹心免疫测定法，将结合于非磷酸化和磷酸化AKT的抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的抗磷酸化AKT Ser473抗体用作检测抗体，在全细胞裂解物中测量AKT在Ser473处的磷酸化；任选其中所述抗体以1×10^{-9}M或更小的IC_{50}值抑制AKT在Ser473处的磷酸化；和/或

d) 其中所述抗体抑制NCI-H1975细胞系中AKT在Thr308处的磷酸化，其中与用包含所述HC3和所述LC3的对照单价EGFR抗体以及包含所述HC4和所述LC4的对照单价c-Met抗体的混合物抑制NCI-H1975细胞系中AKT在Thr308处的磷酸化的IC_{50}值相比，所述抗体的IC_{50}值小至少约100倍，其中

所述HC3与所述HC1、所述LC3与所述LC1、所述HC4与所述HC2、以及所述LC4与所述LC2分别具有相同的氨基酸序列，并且

通过夹心免疫测定法，将结合于非磷酸化和磷酸化AKT的抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的抗磷酸化AKT Thr308抗体用作检测抗体，在全细胞裂解物中测量AKT在Thr308处的磷酸化；

任选其中所述抗体以1×10^{-9}M或更小的IC_{50}值抑制AKT在Thr308处的磷酸化；和/或

e) 其中所述双特异性抗体在EGFR残基K489、I491、K467和S492处结合具有以SEQ ID NO: 73示出的氨基酸序列的EGFR且在残基PEFRDSYPIKYVHAF(SEQ ID NO: 238)和FAQSKPDSAEPMDRSA(SEQ ID NO: 239)处结合c-Me；和/或

f) 其中所述抗体抑制NCI-H292或NCI-H1975细胞的生长，其中当NCI-H292或NCI-H1975细胞在低附着条件下生长时，与用西妥昔单抗抑制NCI-H292或NCI-H1975细胞的生长的IC_{50}值相比，所述抗体的IC_{50}值小至少约300倍、小至少约400倍、小至少约500倍、小至少约600倍、小至少约700倍或小至少约800倍；和/或

g) 其中所述抗体抑制SCID Beige小鼠中表达HGF的SKMES-1细胞瘤的生长，当所述双特异性抗体和西妥昔单抗以20mg/kg剂量施用时，与西妥昔单抗相比，在第36天，所述抗体的T/C百分比(%)值小至少500倍；和/或

h) 其中所述抗体中和EGFR与c-Met信号传导。

3.根据权利要求1或2所述的双特异性抗体，其中所述HC1和所述HC2属于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型，例如，，其中所述HC1和所述HC2属于IgG1同种型；任选其中当根据EU索引对残基进行编号时，在残基位置350、366、368、370、399、405、407或409处，所述HC1 CH3包含至少一、二、三、四、五、六、七或八个替换，并且所述HC2 CH3包含至少一、二、三、四、五、六、七或八个替换，例如，

a)其中在残基位置350、370、405或409处，所述HC1 CH3包含至少一、二、三或四个替换，并且所述HC2 CH3包含至少一、二、三或四个替换；

b) 其中在残基位置405或409处，所述HC1 CH3包含至少一个替换，并且所述HC2 CH3包含至少一个替换；

c) 其中所述HC1 CH3包含K409R或F405L替换，并且所述HC2 CH3包含K409R或F405L替

换;或

d) 其中所述HC1 CH3包含所述F405L替换,并且所述HC2 CH3包含所述K409R替换。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的双特异性抗体:

a) 其还包含所述HC1、所述LC1、所述HC2或所述LC2中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸替换;任选其包含所述HC1和/或所述HC2中的替换M252Y/S254T/T256E,其中根据EU索引对残基进行编号;和/或b)其中所述抗体具有岩藻糖含量约在1%至约15%之间的二天线聚糖结构。

5.一种药物组合物,其包含权利要求1-4中任一项所述的双特异性抗体和药学上可接受的载体。

6.权利要求1-4中任一项的双特异性抗体在制备治疗癌症的方法的药物中的用途,所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的所述的双特异性EGFR/c-Met抗体足以治疗所述癌的时间,任选其中:

a) 所述癌与EGFR激活突变、EGFR基因扩增、升高水平的循环HGF、c-Met激活突变、c-Met基因扩增或突变体KRAS相关,例如其中:

(i) 所述EGFR激活突变为G719A、G719X(X为任何氨基酸)、L861X(X为任何氨基酸)、L858R、E746K、L747S、E749Q、A750P、A755V、V765M、L858P或T790M替换、E746-A750的缺失、R748-P753的缺失、Ala(A)在M766与A767之间的插入、Ser、Val和Ala(SVA)在S768与V769之间的插入、以及Asn和Ser(NS)在P772与H773之间的插入;任选其中所述EGFR激活突变为L858R、del(E476,A750)和/或T790M替换;或

(ii) 所述突变体KRAS具有G12V或G12C替换;或

(iii) 所述受检者抵抗厄洛替尼、吉非替尼、阿法替尼、CO-1686、AZD9192或西妥昔单抗治疗,或已获得对所述治疗的抗性;或

(iv)所述癌为上皮细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、小细胞肺癌、结肠直肠癌、肛门癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、咽癌、鼻癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、舌癌、食道癌、阴道癌、宫颈癌、脾癌、睾丸癌、胃癌、胸腺癌、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肝细胞癌(HCC)、或散发性或遗传性乳头状肾细胞癌(PRCC);或

b) 所述受检者对于CD16的位置158处的苯丙氨酸为纯合的或对于CD16的位置158处的缬氨酸和苯丙氨酸为杂合的。

7.根据权利要求6(a)(iv)中介绍的用途,包括施用第二治疗剂;任选其中

a) 所述第二治疗剂为化学治疗剂或靶向抗癌疗法,例如其中i) 所述化学治疗剂为顺铂或长春碱;或ii) 所述化学治疗剂或所述靶向抗癌疗法为EGFR、c-Met、HER2、HER3、HER4或VEGFR的酪氨酸激酶抑制剂,任选其中所述酪氨酸激酶抑制剂为厄洛替尼、吉非替尼或阿法替尼;或

b)所述第二治疗剂同时地、顺序地或单独地施用。

8.权利要求1-4中任一项的双特异性抗体在制备抑制表达EGFR和/或c-Met的细胞的生长或增殖的药物中的用途。

9.权利要求1-4中任一项的双特异性抗体在制备抑制受检者中表达EGFR和/或c-Met的瘤或癌细胞的生长或转移的方法的药物中的用途,所述方法包括向所述受检者施用有效量的所述的双特异性抗体以抑制表达EGFR和/或c-Met的瘤或癌细胞的生长或转移,任选其中

所述表达EGFR和/或c-Met的瘤为上皮细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、小细胞肺癌、结肠直肠癌、肛门癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、咽癌、鼻癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、舌癌、食道癌、阴道癌、宫颈癌、脾癌、睾丸癌、胃癌、胸腺癌、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肝细胞癌(HCC)、或散发性或遗传性乳头状肾细胞癌(PRCC,例如其中所述表达EGFR和/或c-Met的瘤与EGFR激活突变、EGFR基因扩增、升高水平的循环HGF、c-Met激活突变、c-Met基因扩增或突变体KRAS相关,任选其中

a) 所述EGFR激活突变为G719A、G719X(X为任何氨基酸)、L861X(X为任何氨基酸)、L858R、E746K、L747S、E749Q、A750P、A755V、V765M、L858P或T790M替换、E746-A750的缺失、R748-P753的缺失、Ala(A)在M766与A767之间的插入、Ser、Val和Ala(SVA)在S768与V769之间的插入、以及Asn和Ser(NS)在P772与H773之间的插入;或

b) 所述突变体KRAS具有G12V或G12C替换。

10.权利要求1-4中任一项的双特异性抗体在制备治疗癌症的药物中的用途,任选其中癌症为上皮细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、小细胞肺癌、结肠直肠癌、肛门癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、咽癌、鼻癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、舌癌、食道癌、阴道癌、宫颈癌、脾癌、睾丸癌、胃癌、胸腺癌、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肝细胞癌(HCC)、或散发性或遗传性乳头状肾细胞癌(PRCC)。

11.根据权利要求10的用途,其中所述双特异性抗体可联合第二治疗剂同时地、顺序地或单独地施用,任选其中所述第二治疗剂是化学治疗剂,例如

a)烷化剂,诸如噻替哌和环磷酰胺;

b)烷基磺酸酯,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;

c)氮丙啶类,诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);

d)乙撑亚胺或甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;

e)氮芥,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、松龙苯芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;

f)亚硝基脲,诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;

g)抗生素,诸如阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、加利车霉素、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红菌素、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;

h)抗代谢药,诸如甲氨蝶呤和5-FU;

i)叶酸类似物,诸如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;

j)嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;

k)嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;

l)雄激素类,诸如二甲睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;

m)抗肾上腺类,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;

n)叶酸补充剂,诸如亚叶酸;

o)醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吖啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺;地吖醌;依氟鸟氨酸(elfornithine);依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇;硝氨丙吖啶;喷司他丁;苯来美特(phenamet);吡柔比星;足叶草酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK®;雷佐生;西索菲兰;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2″-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托星(gacytosine);阿拉伯糖苷;环磷酰胺或噻替哌;

p)紫杉类或紫杉烷家族的成员,诸如紫杉醇多西他赛及其类似物;苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;

q)铂类似物,诸如顺铂和卡铂;

r)长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;诺消灵;替尼泊苷;柔红霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸;艾司波霉素(esperamicins)或卡培他滨;

s)受体酪氨酸激酶和/或血管生成的抑制剂,包括索拉非尼、舒尼替尼、帕唑帕尼、托西尼布、凡德他尼、西地尼布、瑞格非尼、阿西替尼、来他替尼、厄洛替尼(TARCEVA®)、吉非替尼、BIBW 2992、拉帕替尼、来那替尼;

t)抗激素剂,其用于调节或抑制激素对瘤的作用,诸如抗雌激素类,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制芳香化酶的4(5)-咪唑类、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、可莫昔芬(keoxifene)、LY 117018、奥那司酮和托瑞米芬;或

u)抗雄激素类,诸如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;

以及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

双特异性EGFR/c-Met抗体

[0001] 本申请是与母案发明名称相同的分案申请，母案的中国申请号是201380071081.8，国际申请号是PCT/US2013/071288，申请日是2013年11 月21日。

技术领域

[0002] 本发明涉及双特异性EGFR/c-Met抗体及制备和使用所述分子的方法。

背景技术

[0003] 表皮生长因子受体(EGFR、ErbB1或HER1)是由c-erbB1原癌基因编码的170kDa I型跨膜糖蛋白。EGFR是受体酪氨酸激酶(RTK)的人表皮生长因子受体(HER)家族的成员，该家族包括HER2(ErbB2)、HER3 (ErbB3)和HER4(ErbB4)。EGFR信号传导通过如下方式引发：配体结合、之后诱导构象变化、受体与其他ErbB家族成员的同源二聚化或异源二聚化，以及受体的反式自磷酸化(Ferguson等人，Annu Rev Biophys，37: 353-73，2008)，这引发了信号转导级联，最终影响多种多样的细胞功能，包括细胞增殖和存活。EGFR的表达或激酶活性的增加与一系列人癌症有关，从而使EGFR成为治疗干预的有吸引力的靶标(Mendelsohn等人，Oncogene 19:6550-6565，2000；Grünwald等人，J Natl Cancer Inst 95:851- 67，2003；Mendelsohn等人，Semin Oncol 33:369-85，2006)。在非小细胞肺癌中，EGFR基因拷贝数和蛋白表达两者的增加与对EGFR酪氨酸激酶抑制剂IRESSA™(吉非替尼)的有利响应相关联(Hirsch等人，Ann Oncol 18:752-60，2007)。

[0004] EGFR疗法包括小分子和抗EGFR抗体两者，它们经批准用于治疗结肠直肠癌、胰腺癌、头颈癌和非小细胞肺癌(NSCLC)(Baselga和 Arteaga，J Clin Oncol 23:2445-2459(20005；Gill等人，J Biol Chem，259:7755-7760，1984；Goldstein等人，Clin Cancer Res，1:131 1-1318; 1995；Prewett等人，Clin Cancer Res，4:2957-2966，1998)。

[0005] 抗EGFR疗法的疗效可取决于瘤类型以及瘤中的EGFR突变/扩增状态。当前疗法的副作用可包括皮肤毒性(De Roock等人，Lancet Oncol 11:753-762，2010；Linardou等人，Nat Rev Clin Oncol，6:352-366, 2009；Li和Perez-Soler，Targ Oncol 4:107-119，2009)。EGFR酪氨酸激酶抑制剂(TKI)通常用作非小细胞肺癌(NSCLC)的二线疗法，但由于抗药途径的原因，通常会在十二个月内失效(Riely等人，Clin Cancer Res 12:839-44，2006)。

[0006] c-Met编码跨膜酪氨酸激酶受体。其在1984年在发现用致癌物处理产生了组成型活性融合蛋白TPR-MET之后，首次被鉴定为原癌基因(Cooper 等人，Nature 311:29-33，1984)。c-Met被其配体肝细胞生长因子(HGF) 激活会刺激多个细胞过程，包括生长、运动、侵袭、转移、上皮细胞-间充质转化、血管生成/创伤愈合以及组织再生(Christensen等人，Cancer Lett 225:1-26，2005；Peters和Adjei，Nat Rev Clin Oncol 9:314-26，2012)。c-Met被合成为单链蛋白质，该蛋白质被蛋白水解裂解成由二硫键连接的 50kDaα-和140kDaβ-亚基(Ma等人，Cancer and Metastasis Reviews，22: 309-325，2003)。c-Met在结构上类似于其他膜受体诸如RON和Sea。HGF:c-Met结合的准确化学计量尚不清楚，但普遍认为两

个HGF分子结合于两个c-Met分子,导致受体二聚化以及在1230、1234和1235位酪氨酸处自磷酸化(Stamos等人,The EMBO Journal 23:2325-2335,2004)。非配体依赖性c-Met自磷酸化也可由于基因扩增、突变或受体过表达而发生。

[0007] c-Met在多种类型的癌(包括胃癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、头颈癌、卵巢癌、前列腺癌、甲状腺癌、胰腺癌和CNS癌)中常常被扩增、突变或过表达。通常定位于激酶域的错义突变常见于遗传性乳头状肾细胞癌(PRCC)和13%的散发性PRCC(Schmidt等人,Oncogene 18: 2343-2350,1999)。定位于c-Met的臂板蛋白或近膜域的c-Met突变常见于胃癌、头颈癌、肝癌、卵巢癌、NSCLC和甲状腺癌(Ma等人,Cancer and Metastasis Reviews,22:309-325,2003;Sakakura等人,Chromosomes and Cancer,1999,24:299-305)。已在脑癌、结肠直肠癌、胃癌和肺癌中检测到c-Met扩增,这通常与疾病进展相关(Ma等人,Cancer and Metastasis Reviews,22:309-325,2003)。分别多至4%和20%的非小细胞肺癌(NSCLC)和胃癌表现出c-Met扩增(Sakakura等人,Chromosomes and Cancer,1999,24:299-305:Sierra和Tsao,Therapeutic Advances in Medical Oncology,3:S21-35,2011)。即使不存在基因扩增,肺癌中也常观察到c-Met过表达(Ichimura等人,Jpn J Cancer Res,87:1063-9, 1996)。此外,在临床样品中,将近一半的肺腺癌表现出高水平的c-Met 和HGF,这两者均与增强的瘤生长率、转移和不良预后相关(Sierra和 Tsao,Therapeutic Advances in Medical Oncology,3:S21-35,2011; Siegfried等人,Ann Thorac Surg 66:1915-8,1998)。

[0008] 抵抗EGFR酪氨酸激酶抑制剂的所有瘤中的将近60%增加c-Met表达、扩增c-Met或增加c-Met的唯一已知配体HGF(Turke等人,Cancer Cell,17:77-88,2010),表明存在通过c-Met对EGFR的补偿途径。在抵抗吉非替尼(一种EGFR激酶抑制剂)并经Her3途径表现出增强存活率的培养细胞中,c-Met扩增被首次鉴定(Engelman等人,Science,316:1039- 43,2007)。这进一步在临床样品中得到验证,其中具有对厄洛替尼或吉非替尼的获得性抗性的43名患者中有九名表现出c-Met扩增,与之相比的是,62名未治疗患者中仅两名有此表现。九名治疗患者中有四名也获得了 EGFR激活突变T790M,证实为同步抗性途径(Beat等人,Proc Natl Acad Sci U S A,104:20932-7,2007)。

[0009] EGFR和c-Met在癌中的单独作用已充分确立,使得这些靶标对于联合疗法具有吸引力。两个受体均通过相同的存活和抗凋亡途径(ERK和 AKT)传导信号;因此,联合抑制该对受体可限制补偿途径激活的可能性,从而改善总体疗效。在Tarceva®(厄洛替尼)与NSCLC的抗c-Met单价抗体联用(Spigel等人,2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011, Journal of Clinical Oncology:Chicago,IL.,第7505页)以及Tarceva(厄洛替尼)与ARQ-197(一种c-Met小分子抑制剂)联用(Adjei等人, Oncologist,16:788-99,2011)的临床试验中测试了靶向EGFR和c-Met的联合疗法。联合疗法或双特异性抗EGFR/c-Met分子已例如在如下专利中公开:国际专利公布WO2008/127710、WO2009/111691、WO2009/126834、WO2010/039248、WO2010/115551以及美国专利公布US2009/0042906。

[0010] 目前的拮抗EGFR和/或c-Met信号传导途径进行治疗的小分子和大分子治疗方法可能为次优的,这是由于可能缺少特异性、可能的脱靶活性以及小分子抑制剂可能遇到的剂量限制性毒性。典型的单特异性二价抗体可导致膜结合受体聚簇以及下游信号传导途径的非期望激活。具有全长重链 (半臂)的单价抗体对制造工艺带来了相当大的复杂性和成

本。

[0011] 因此,对另外的单特异性和双特异性EGFR和/或c-Met抑制剂存在需要,以用于治疗和诊断目的两者。

发明内容

[0012] 本发明的一个实施例是分离的双特异性表皮生长因子受体(EGFR)/ 肝细胞生长因子受体(c-Met)抗体,其包含:

[0013] 第一重链(HC1),其包含HC1恒定域3(HC1 CH3)和HC1可变区 1(VH1);

[0014] 第二重链(HC2),其包含HC2恒定域3(HC2 CH3)和HC2可变区 2(VH2);

[0015] 第一轻链(LC1),其包含轻链可变区1(VL1);和

[0016] 第二轻链(LC2),其包含轻链可变区2(VL2),其中VH1和VL1 配对以形成特异性结合EGFR的第一抗原结合位点,VH2和VL2配对以形成特异性结合c-Met的第二抗原结合位点,HC1在HC1 CH3中包含至少一个替换,并且HC2在HC2 CH3中包含至少一个替换,并且当根据EU索引对残基进行编号时,HC1 CH3中的替换和HC2 CH3中的替换在不同氨基酸残基位置处发生。

[0017] 在其他实施例中,本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体,其中该抗体抑制NCI-H292、NCI-H1975或SKMES-1细胞系中胞外信号相关激酶1 和2(ERK1/2)的磷酸化,并且与用包含重链3(HC3)和轻链3(LC3) 的对照单价EGFR抗体以及包含重链4(HC4)和轻链4(LC4)的对照单价c-Met抗体的混合物抑制NCI-H292、NCI-H1975或SKMES-1细胞系中 ERK1/2的磷酸化的IC_{50}值相比,其IC_{50}值小至少约10倍、小至少约20 倍、小至少约30倍、小至少约40倍、小至少约50倍或小至少约60倍,其中HC3与HC1、LC3与LC1、HC4与HC2以及LC4与LC2分别具有相同的氨基酸序列,其中使用夹心免疫测定法,将抗磷酸化ERK1/2抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的结合于非磷酸化和磷酸化ERK1/2的抗体用作检测抗体,在全细胞裂解物中测量ERK1/2的磷酸化。

[0018] 在其他实施例中,本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体,其中该抗体抑制NCI-H1975细胞系中蛋白激酶B(AKT)在Ser473处的磷酸化,并且与用包含HC3和LC3的对照单价EGFR抗体以及包含HC4和LC4的对照单价c-Met抗体的混合物抑制NCI-H1975细胞系中AKT在Ser473处的磷酸化的IC_{50}值相比,其IC_{50}值小至少约70倍,其中HC3与HC1、LC3 与LC1、HC4与HC2以及LC4与LC2分别具有相同的氨基酸序列,其中使用夹心免疫测定法,将结合于非磷酸化和磷酸化AKT的抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的抗磷酸化AKT Ser473抗体用作检测抗体,在全细胞裂解物中测量AKT在Ser473处的磷酸化。

[0019] 在其他实施例中,本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体,该抗体在 EGFR残基K489、I491、K467和S492处结合SEQ ID NO:73的EGFR,并且在残基PEFRDSYPIKYVHAF(SEQ ID NO:238)和 FAQSKPDSAEPMDRSA(SEQ ID NO:239)处结合c-Met。

[0020] 在其他实施例中,本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体,该抗体抑制NCI-H292或NCI-H1975细胞的生长,并且当NCI-H292或NCI-H1975 细胞在低附着条件下生长时,与用西妥昔单抗抑制NCI-H292或NCI-H1975 细胞的生长的IC_{50}值相比,其IC_{50}值小至少约300倍、小至少约400倍、小至少约500倍、小至少约600倍、小至少约700倍或小至少约800倍。

[0021] 在其他实施例中,本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体,该抗体抑制SCID Beige

小鼠中表达HGF的SKMES-1细胞瘤的生长，并且当双特异性抗体和西妥昔单抗以20mg/kg剂量施用时，与西妥昔单抗相比，在第36 天，其T/C百分比(%)值小至少500倍。

[0022] 在其他实施例中，本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体，其中HC1 CH3包含K409R或F405L替换，并且HC2 CH3包含K409R或F405L替换，其中根据EU索引对残基进行编号。

[0023] 在其他实施例中，本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体，该抗体包含特定重链和轻链CDR、VH1、VL1、VH2、VL2、HC1、LC1、HC2和 LC2序列。

[0024] 本发明的另一个实施例是分离的合成多核苷酸，其编码本发明的 HC1、HC2、LC1或LC2。

[0025] 本发明的另一个实施例是包含本发明多核苷酸的载体。

[0026] 本发明的另一个实施例是包含本发明载体的宿主细胞。

[0027] 本发明的另一个实施例是制备分离的双特异性EGFR/c-Met抗体的方法，所述方法包括：

[0028] 将包含SEQ ID NO:199的两条重链和SEQ ID NO:200的两条轻链的分离的单特异性二价抗EGFR抗体与包含SEQ ID NO:201的两条重链和 SEQ ID NO:202的两条轻链的分离的单特异性二价抗c-Met抗体以约1:1摩尔比组合在混合物中；

[0029] 将还原剂引入混合物中；

[0030] 将混合物温育约九十分钟至约六小时；

[0031] 移除还原剂;以及

[0032] 纯化双特异性EGFR/c-Met抗体，其包含SEQ ID NO:199的第一重链和SEQ ID NO:201的第二重链、SEQ ID NO:200的第一轻链和SEQ ID NO: 202的第二轻链，其中SEQ ID NO:199的第一重链与SEQ ID NO:200的第一轻链配对以形成特异性结合EGFR的第一结合域，并且SEQ ID NO:201 的第二重链与SEQ ID NO:202的第二轻链配对以形成特异性结合c-Met的第二结合域。

[0033] 本发明的另一个实施例是包含本发明双特异性抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0034] 本发明的另一个实施例是治疗患有癌的受检者的方法，所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的本发明双特异性EGFR/c-Met抗体足以治疗癌的时间。

[0035] 本发明的另一个实施例是抑制表达EGFR和/或c-Met的细胞的生长或增殖的方法，所述方法包括使细胞与本发明双特异性抗体接触。

[0036] 本发明的另一个实施例是抑制受检者中表达EGFR和/或c-Met的瘤或癌细胞的生长或转移的方法，所述方法包括向受检者施用有效量的本发明双特异性抗体以抑制表达EGFR和/或c-Met的瘤或癌细胞的生长或转移。

附图说明

[0037] 图1A和1B.结合EGFR的FN3域的氨基酸比对。在SEQ ID NO:18的第22-28位和第75-86位残基处对BC和FG环加框。一些变体包括改善热稳定性的L17A、N46K和E86I替换(残基根据Tencon SEQ ID NO:1编号)。

[0038] 图2.Tencon27支架(SEQ ID NO:99)与具有随机化C-CD-F-FG另选表面的TCL14文库(SEQ ID NO:100)的序列比对。对环残基加框。在序列的上方指示环和链。

[0039] 图3.结合c-Met的FN3域的序列比对。C环和CD链及F环和FG链被加框并且跨越第29-43位和第65-81位残基。

[0040] 图4.示出了在用包含单特异性或双特异性FN3域的分子预处理并用 HGF刺激的NCI-H292细胞中c-Met磷酸化的抑制。当与单独的单特异性的结合c-Met的FN3域(P114AR5P74-A5,图中以A5示出)或联用结合 EGFR的FN3域(P54AR4-83v2,图中以83v2示出)相比时,观察到双特异性EGFR/c-Met分子(ECB1)的效力的大幅提高。

[0041] 图5.在用包含单特异性或双特异性FN3域的分子预处理的细胞中的 EGFR和c-Met磷酸化的抑制。在表达高水平的EGFR的细胞系NCI-H292 (图5A)和H596(图5B)中,包含抗EGFR单特异性和双特异性FN3域的分子在减少EGFR磷酸化方面效力相同。在表达相对于c-Met而言低水平的EGFR的细胞系NCI-H441(图5C)中,与单独单特异性的结合EGFR 的FN3域相比,双特异性EGFR/c-Met分子改善了EGFR磷酸化的抑制效力。在具有相对于EGFR而言低水平的c-Met的细胞系NCI-H292(图 5D)和H596(图5E)中,与仅单特异性的结合c-Met的FN3域相比,双特异性EGFR/c-Met分子显著增强了c-Met磷酸化的抑制。该研究所用的分子是:双特异性ECB5(图中以17-A3示出)、单特异性的结合EGFR的 FN3域P53A1R5-17(图中以“17”示出)、双特异性EGFR/c-Met分子 ECB3(图中以83-H9示出)以及单特异性的结合c-Met的FN3域 P114AR7P93-H9(图中以H9示出)。

[0042] 图6.从用双特异性EGFR/c-Met分子给药6h或72h的小鼠分离的瘤中的药效信号传导。所有分子在6h和72h时显著减少了c-Met、EGFR和 ERK磷酸化,抑制的程度取决于FN3域对EGFR和/或c-Met的亲和力。双特异性分子通过如下方式生成:将具有高(图中的“83”是p54AR4- 83v2)或中等(图中的“17v2”是P53A1R5-17v2)亲和力的结合EGFR的 FN3域连接到具有高(图中的“A3”是P114AR7P94-A3)或中等(图中的“A5”是P114AR5P74-A5)亲和力的结合c-Met的FN3域。

[0043] 图7.示出了在IP给药后6h(左)和72h(右)连接到白蛋白结合域 (ABD)的可变亲和力的双特异性EGFR/cMet分子的血浆(顶部)和瘤 (底部)积聚。在用具有中等亲和力结合EGFR的FN3域(17v2)或高亲和力EGFR结合域(83v2)的双特异性分子给药的小鼠中,给药后六小时,瘤积聚达最大值。双特异性分子掺入了如下高或中等亲和力结合EGFR 或c-Met的FN3域:83v2-A5-ABD(ECB18;对EGFR/cMet的亲和力为高/ 中等)83v2-A3-ABD(ECB38;高/高)17v2-A5(ECB28;中等/中等) 17v2-A3-ABD(ECB39;中等/高)。在该图中,83v2是指p54AR4-83v2; 17v2是指p53A1R5-17v2;A3是指p114AR7P94-A3,并且A5是指 p114AR5P74-A5。

[0044] 图8.H292-HGF移植瘤被植入SCID Beige小鼠中。当瘤达到大约 80mm^{3}的平均体积时,每周用双特异性EGFR/c-Met分子(25mg/kg)或 PBS媒介物给予小鼠三次。所有双特异性分子降低了瘤生长,瘤生长抑制 (TGI)取决于分子对c-Met和EGFR的亲和力(高EGFR-高cMet是指 p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3(ECB38);高EGFR-中等cMet是指 p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5(ECB18);中等EGFR-高cMet是指 p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3(ECB39);中等EGFR-中等-cMet是指 p53A1R5-17-p114AR5P74-A 5(ECB28))。

[0045] 图9.H292-HGF移植瘤被植入SCID Beige小鼠中并且它们用不同疗法治疗。示出了疗法的抗瘤活性(双特异性EGFR/c-Met分子是指p54AR4- 83v2-p114AR7P94-A3-ABD(ECB38);其他疗法是克唑替尼、厄洛替尼、西妥昔单抗,以及克唑替尼与厄洛替尼的组合)。

[0046] 图10.SKMES-HGF移植瘤被植入SCID Beige小鼠中并且这些小鼠用不同疗法治疗。疗法的抗瘤活性以瘤尺寸(mm^3)随时间推移的变化示出。以20mg/kg、5mg/kg或1mg/kg一周两次腹膜内(i.p.)给予双特异性 EGFR/c-Met抗体EM1-mAb;以20mg/kg一周两次腹腔内给予西妥昔单抗。图中的箭头示出了施用天数。抗体后的数字指示施用剂量。

[0047] 图11.HCC827移植瘤被植入裸小鼠中并且这些小鼠用厄洛替尼或 EM1-mAb以所指示的剂量治疗。EM1-mAb以两周一次给予并且厄洛替尼以一天一次给予,共给予四周。图中的箭头示出了施用天数。疗法的抗瘤活性以瘤尺寸(mm^3)随时间推移的变化示出。

[0048] 图12.SNU-5移植瘤被植入CB17/SCID小鼠中并且这些小鼠用 10mg/kg西妥昔单抗或10mg/kg或1mg/kg EM1-mAb治疗。抗体以两周一次给予,共给予四周。图中的箭头示出了施用天数。疗法的抗瘤活性以瘤尺寸(mm^3)随时间推移的变化示出。

[0049] 图13.H1975-HGF移植瘤被植入裸小鼠中并且这些小鼠用10mg/kg西妥昔单抗、10mg/kg EM1-mAb、50mg/kg厄洛替尼、15mg/kg阿法替尼,或 10mg/kg EM1-mAb与15mg/kg阿法替尼的组合治疗。抗体以两周一次给予并且小分子以一天一次给予,共给予三周。图中的箭头示出了施用天数。疗法的抗瘤活性以瘤尺寸(mm^3)随时间推移的变化示出。

[0050] 图14.HCC827-ER1移植瘤被植入裸小鼠中并且这些小鼠用10mg/kg EM1-mAb、25mg/kg厄洛替尼,或这两种的组合治疗。EM1-mAb以两周一次给予并且厄洛替尼以一天一次给予,共给予19天。图中的箭头示出了施用天数。疗法的抗瘤活性以瘤尺寸(mm^3)随时间推移的变化示出。

[0051] 图15.在施用单剂量的20mg/kg EM1-mAb后从植入SCID Beige小鼠中的H1975 HGF移植瘤分离的瘤裂解物中的平均EGFR和c-Met水平。受体水平在所指示的治疗后时间以占PBS对照的百分比示出。

[0052] 图16.H1975-HGF移植瘤被植入裸小鼠中并且这些小鼠用10mg/kg EM1-mAb或10mg/kg不具有Fc受体结合功能并缺少效应子功能的EM1- mAb变体IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S治疗。抗体在所指示的天数以两周一次给予。疗法的抗瘤活性以瘤尺寸(mm^3)随时间推移的变化示出。

具体实施方式

[0053] 如本文所用,术语“III型纤连蛋白(FN3)域”(FN3域)指在蛋白质中频繁出现的域,该蛋白质包括纤连蛋白、腱生蛋白、胞内细胞骨架蛋白、细胞因子受体和原核酶(Bork和Doolittle,Proc Nat Acad Sci USA 89:8990-8994,1992;Meinke等人,J Bacteriol 175:1910-1918,1993;Watanabe等人,J Biol Chem 265:15659-15665,1990)。示例性的FN3域是存在于人腱生蛋白C中的15种不同的FN3域、存在于人纤连蛋白(FN) 中的15种不同的FN3域以及非天然的合成FN3域,如例如美国专利公布 2010/0216708中所述。单独的FN3域通过域编号和蛋白质名称来表示,例如,腱生蛋白的第3FN3域(TN3),或纤连蛋白的第10FN3域(FN10)。

[0054] 如本文所用,术语“替换”或“替换的”或“突变”或“突变的”指在多肽或多核苷酸序列中改变、缺失或插入一个或多个氨基酸或核苷酸以产生该序列的变体。

[0055] 如本文所用,术语“使随机化”或“随机化的”或“多样化的”或“使多样化”指在多核苷酸或多肽序列中进行至少一处替换、插入或缺失。

[0056] 如本文所用，“变体”指与参考多肽或参考多核苷酸差别在于一种或多种修饰，例如替换、插入或缺失的多肽或多核苷酸。

[0057] 如本文所用，术语“特异性地结合”或“特异性结合”是指FN3域、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂，或本发明的双特异性EGFR/c- Met抗体以约1×10^{-6}M或更小、例如约1×10^{-7}M或更小、约1×10^{-8}M或更小、约1×10^{-9}M或更小、约1×10^{-10}M或更小、约1×10^{-11}M或更小、约 1×10^{-12}M或更小或约1×10^{-13}M或更小的离解常数(K_D)结合预定抗原的能力。通常，如通过表面等离子共振使用例如Proteon仪器(BioRad)所测量，FN3域、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂，或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体以比其对非特异性抗原(例如BSA或酪蛋白)的 K_D小至少十倍的K_D结合预定抗原(即，EGFR或c-Met)。因此，包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体以至少约1×10^{-6}M或更小、例如约1×10^{-7}M或更小、约1×10^{-8}M或更小、约1×10^{-9}M或更小、约1×10^{-10}M 或更小、约1×10^{-11}M或更小、约1×10^{-12}M或更小或约1×10^{-13}M或更小的结合亲和力(K_D)特异性结合每个EGFR和c-Met。然而，特异性结合预定抗原的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性结合EGFR和c- Met的双特异性试剂或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可具有与其他相关抗原例如与来自其他种类的相同预定抗原(同源物)的交叉反应性。

[0058] 术语“文库”是指变体的集合。文库可由多肽或多核苷酸变体组成。

[0059] 如本文所用，术语“稳定性”指在生理条件下分子保持折叠状态以便其保持至少一种其正常功能活性例如结合于预定抗原诸如EGFR或c-Met 的能力。

[0060] 如此处所用，“表皮生长因子受体”或“EGFR”是指具有以SEQ ID NO:73和GenBank登录号NP_005219示出的氨基酸序列的人EGFR(也称为HER1或ErbB1(Ullrich等人，Nature 309:418-425，1984)以及其天然存在的变体。此类变体包括熟知的EGFRvIII和其他选择性剪接变体(例如，如通过如下SwissProt登录号标识：P00533-1(野生型；与SEQ ID NO: 73和NP_005219相同)、P00533-2(F404L/L405S)、P00533-3(628-705:CTGPGLEGCP...GEAPNQALLR→PGNESLKAML...SVIITASSCH且 706-1210缺失)、P00533-4(C628S和629-1210缺失)、变体GlnQ98、 R266、K521、I674、G962和P988(Livingston等人，NIEHS-SNPs，环境基因组计划，NIEHS ES15478)、T790M、L858R/T790M和del(E746， A750)。

[0061] 如本文所用，“EGFR配体”涵盖EGFR的所有(例如，生理)配体，包括EGF、TGFα、肝素结合EGF(HB-EGF)、双调蛋白(AR)和上皮调节蛋白(EPI)。

[0062] 如本文所用，“表皮生长因子”(EGF)是指具有以SEQ ID NO:74 示出的氨基酸序列的熟知53氨基酸人EGF。

[0063] 如本文所用，“肝细胞生长因子受体”或“c-Met”是指具有以SEQ ID NO:101或GenBank登录号NP_001120972示出的氨基酸序列的人c-Met 以及其天然变体。

[0064] 如本文所用，“肝细胞生长因子”(HGF)是指具有以SEQ ID NO: 102示出的氨基酸序列的熟知人HGF，其被裂解而形成由二硫键连接的α和β链的二聚体。

[0065] 如本文可互换使用的“阻碍结合”或“抑制结合”是指FN3域、包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂，或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体阻碍或抑制EGFR配体结合 (诸如EGF与EGFR结合和/或HGF与c-Met结合)的能力，并且涵盖部分和完全阻碍/抑制两者。FN3域、包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性

结合EGFR和c-Met的双特异性试剂或本发明的双特异性 EGFR/c-Met抗体对EGFR配体(诸如EGF与EGFR结合和/或HGF与c- Met结合)的阻碍/抑制,与EGFR配体结合于EGFR和/或HGF结合于c- Met而不受阻碍或抑制相比,部分或完全降低了EGFR信号传导和/或c-Met 信号传导的正常水平。当抑制为至少30%、35%、40%、45%、50%、 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、 94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%时,FN3域、包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体使EGFR配体(诸如EGF与EGFR结合和/或HGF与c-Met结合)“结合受阻”。结合的抑制可使用熟知的方法测量,例如使用FACS并且使用本文所述的方法测量暴露于FN3域、包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体的表达EGFR的A431细胞上生物素酰化EGF的结合的抑制,或使用熟知的方法和本文所述的方法测量 c-Met胞外域上生物素酰化HGF的结合的抑制。

[0066] 术语“EGFR信号传导”是指EGFR配体结合于EGFR所诱导的信号转导,导致EGFR中的至少一个酪氨酸残基的自磷酸化。示例性的EGFR 配体是EGF。

[0067] 如本文所用,“中和EGFR信号传导”是指FN3域、包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体将EGFR配体诸如EGF所诱导的 EGFR信号传导抑制至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、 96%、97%、98%、99%或100%的能力。

[0068] 术语“c-Met信号传导”是指HGF结合于c-Met所诱导的信号转导,导致c-Met中的至少一个酪氨酸残基的自磷酸化。通常,在HGF结合时,在位置1230、1234、1235或1349的至少一个酪氨酸残基被自磷酸化。

[0069] 如本文所用,“中和c-Met信号传导”是指FN3域、包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子、特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂或本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体将HGF所诱导的c-Met信号传导抑制至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、 99%或100%的能力。

[0070] 如本文可互换使用的“过表达”和“过表达的”是指与相同组织类型的正常细胞相比,癌细胞或恶性细胞在表面上具有可测量更高水平的EGFR 和/或c-Met。这种过表达可由基因扩增或由增加的转录或翻译引起。可使用熟知的测定法,利用例如ELISA、免疫荧光、流式细胞术或放射免疫测定法对活细胞或裂解细胞测量EGFR和/或c-Met表达和过表达。另选地或除此以外,可例如使用荧光原位杂交、DNA印迹或PCR技术在细胞中测量编码EGFR和/或c-Met的核酸分子的水平。当与正常细胞相比,细胞的表面上的EGFR和/或c-Met的水平高至少1.5倍时,EGFR和/或c-Met被过表达。

[0071] 如本文所用,“Tencon”是指具有以SEQ ID NO:1示出的序列并且在美国专利公布US2010/0216708中描述的合成的III型纤连蛋白(FN3)域。

[0072] 如本文所用,“癌细胞”或“瘤细胞”是指体内、离体或组织培养物中的癌变细胞、癌前细胞或转化细胞,其具有不一定涉及新遗传物质摄入的自发或诱导表型变化。虽然转化可由感染转化病毒和掺入新基因组核酸或摄入外源核酸引起,但也可自发引起或在暴露于

致癌物之后引起,从而使内源基因突变。转化/癌的例子有例如合适动物宿主诸如裸小鼠体外、体内和离体的形态学变化、细胞永生化、异常细胞控制、病灶形成、增殖、恶性化、瘤特异性标记水平、侵袭性、瘤生长或抑制(Freshney,Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique(第3版1994))。

[0073] 术语“载体”是指能够在生物系统内复制或可以在此类系统间移动的多核苷酸。载体多核苷酸通常含有诸如复制起点、聚腺苷酸化信号或选择标记之类的元件,其功能是促进这些多核苷酸在生物系统中的复制或保持。此类生物系统的例子可包括细胞、病毒、动物、植物和用能够复制载体的生物组分再造的生物系统。包含载体的多核苷酸可以是DNA或RNA 分子或这些分子的杂合分子。

[0074] 术语“表达载体”是指可用于在生物系统或再造生物系统中指导由存在于表达载体中的多核苷酸序列所编码的多肽的翻译的载体。

[0075] 术语“多核苷酸”是指包含由糖-磷酸主链或其它等同的共价化学方式所共价连接的核苷酸链的分子。双链DNA和单链DNA以及双链RNA和单链RNA是多核苷酸的典型例子。

[0076] “互补DNA”或“cDNA”是指具有存在于天然成熟mRNA种类中的序列元件的布置方式的熟知合成多核苷酸,其含有连续外显子,并且存在于基因组DNA中的间插内含子被移除。编码起始子甲硫氨酸的密码子可存在于或可不存在于cDNA中。cDNA可例如通过逆转录或合成基因组装来合成。

[0077] 如本文所用,“合成的”或“非天然的”或“人工的”是指多核苷酸或多肽分子不存在于自然界。

[0078] 术语“多肽”或“蛋白质”是指包含至少两个由肽键连接以形成多肽的氨基酸残基的分子。少于约50个氨基酸的小多肽可以称作“肽”。

[0079] 如本文所用,术语“双特异性EGFR/c-Met分子”或“包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子”是指包含结合EGFR的FN3域和不同的结合c- Met的FN3域的分子,这两个域直接或经由接头共价连接在一起。示例性的结合EGFR/c-Met的双特异性分子包含特异性结合EGFR的第一FN3域以及特异性结合c-Met的第二FN3域。

[0080] 如本文所用,“价”是指分子中存在对抗原具有特异性的指定数量的结合位点。因此,术语“单价”、“二价”、“四价”和“六价”是指分子中分别存在对抗原具有特异性的一个、两个、四个和六个结合位点。

[0081] 如本文所用,“混合物”是指未共价连接在一起的两个或更多个FN3 域的样品或制备物。混合物可由两个或更多个相同的FN3域或不同的FN3 域组成。如本文所用,混合物也是指单价指向EGFR和/或单价指向c-Met 的两个或更多个单价抗体的样品或制备物。

[0082] 如本文所用,术语“特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂”是指包含特异性结合EGFR的第一域和特异性结合c-Met的第二域的分子。示例性的特异性结合EGFR和c-Met的试剂是双特异性抗体。另一个示例性的特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂是包含结合EGFR的FN3 域和不同的结合c-Met的FN3域的分子。特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂可由单种多肽或不止一种多肽构成。

[0083] 如本文所用,术语“双特异性抗EGFR/c-Met抗体”或“双特异性 EGFR/c-Met抗体”是指具有特异性结合EGFR的第一域和特异性结合c- Met的第二域的双特异性抗体。特异性结合EGFR和c-Met的域通常为 VH/VL对,并且双特异性抗EGFR/c-Met抗体就结合于EGFR和

c-Met而言是单价的。

[0084] 如本文所用,术语“抗体”含义广泛且包括:免疫球蛋白分子,包括多克隆抗体;单克隆抗体,包括鼠、人、人适应性、人源化和嵌合单克隆抗体;抗体片段;双特异性或多特异性抗体;二聚体、四聚体或多聚体抗体;以及单链抗体。

[0085] 免疫球蛋白可根据重链恒定域氨基酸序列被指定为五种主要种类,即 IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgA和IgG进一步亚分类为同种型IgA_1、 IgA_2、IgG_1、IgG_2、IgG_3和IgG_4。任何脊椎动物种类的抗体轻链可基于其恒定域的氨基酸序列被指定至两种明显不同类型之一,即κ(κ)和λ(λ)。

[0086] 术语“抗体片段”是指免疫球蛋白分子的一部分,其保留重链和/或轻链抗原结合位点,诸如重链互补决定区(HCDR)1、2和3,轻链互补决定区(LCDR)1、2和3,重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)。抗体片段包括Fab片段,即由VL、VH、CL和CHI域组成的单价片段;$F(ab)_2$片段,即包含通过铰链区二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;由VH 和CHI域组成的Fd片段;由抗体的单条臂的VL和VH域组成的Fv片段;由VH域组成的域抗体(dAb)片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546)。VH和VL域可经工程改造并经由合成接头连接在一起以形成各种类型的单链抗体设计,其中在VH和VL域由单独的单链抗体构建体表达的情况下,VH/VL域在分子内或分子间配对,以形成单价抗原结合位点,诸如单链Fv(scFv)或双价抗体(diabody);如例如在PCT国际公布 WO1998/44001、WO1988/01649、WO1994/13804和WO1992/01047中所述。使用本领域的技术人员已知的熟知技术获得这些抗体片段,并筛选出效用方式与全长抗体相同的片段。

[0087] 短语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体或抗体片段(例如,分离的特异性结合EGFR和c-Met的双特异性抗体基本上不含特异性结合除人EGFR和c-Met之外的抗原的抗体)。然而,分离的特异性结合EGFR和c-Met的抗体可具有与其他抗原的交叉反应性,其他抗原诸如为人EGFR和/或c-Met的直系同源物,诸如食蟹猴(Macacafascicularis)(猕猴)EGFR和/或c-Met。此外,分离的抗体可基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0088] 抗体可变区由插入有三个“抗原结合位点”的“框架”区组成。使用不同术语来定义抗原结合位点:(i)三个在VH(HCDR1、HCDR2、 HCDR3)中且三个在VL(LCDR1、LCDR2、LCDR3)中的互补决定区 (CDR)是基于序列变异性(Wu和Kabat,J Exp Med 132:211- 50,1970;Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md., 1991)。(ii)三个在VH(H1、H2、H3)中且三个在VL(L1、L2、 L3)中的“超变区”、“HVR”或“HV”是指抗体可变域中的在结构上超变的区域,如Chothia和Lesk所定义(Chothia和Lesk,Mol Biol 196:901- 17,1987)。其他术语包括“IMGT-CDR”(Lefranc等人,Dev Comparat Immunol 27:55-77,2003)和“Specificity Determining Residue Usage” (SDRU)(Almagro,Mol Recognit 17:132-43,2004)。International ImMunoGeneTics(IMGT)数据库(http://www_imgt_org)提供了抗原结合位点的标准化编号和定义。CDR、HV与IMGT划分之间的对应性描述于 Lefranc等人,Dev Comparat Immunol 27:55-77,2003。

[0089] 如本文所用,“Chothia残基”是抗体VL和VH残基,其根据Al- Lazikani来编号(Al-Lazikani等人,J Mol Biol 273:927-48,1997)。

[0090] “框架”或“框架序列”是可变区的除了被定义为抗原结合位点的那些序列之外的其余序列。因为抗原结合位点可以由如上所述的不同术语定义，所以框架的精确氨基酸序列取决于如何定义抗原结合位点。

[0091] “人源化抗体”是指其中抗原结合位点来源于非人种类且可变区框架来源于人免疫球蛋白序列的抗体。人源化抗体在框架区中可包括替换，因此该框架可能不是表达的人免疫球蛋白或种系基因序列的精确拷贝。

[0092] “人适应性”抗体或“人框架适应性(HFA)”抗体是指根据美国专利公布US2009/0118127所述的方法调整的人源化抗体。通过如下方式将人适应性抗体人源化：基于CDR1和CDR2环及一部分轻链CDR3环的最大 CDR与FR相似性、长度相容性和序列相似性，来选择受体人框架。

[0093] “人抗体”是指具有其中框架和抗原结合位点两者来源于人源序列的重链可变区和轻链可变区的抗体。如果抗体包含恒定区，则恒定区也来源于人源序列。

[0094] 如果抗体的可变区得自使用人胚系免疫球蛋白或重排免疫球蛋白基因的系统，则人抗体包含“来源于”人源序列的重链可变区或轻链可变区。此类系统包括噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库，以及转基因非人动物诸如本文所述携带人免疫球蛋白基因文库的小鼠。当与人胚系或重排免疫球蛋白序列相比时，由于例如天然存在的体细胞突变或者框架或抗原结合位点中替换的有意引入，“人抗体”可包含氨基酸差异。通常，“人抗体”在氨基酸序列方面与由人胚系或重排免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、 89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或 100％相同。在一些情况下，“人抗体”可包含来源于人框架序列分析的共有框架序列，例如如Knappik等人，J Mol Biol 296:57-86，2000所述，或包含掺入噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库中的合成HCDR3，例如如 Shi等人，J Mol Biol 397:385-96，2010和国际专利公布WO2009/085462中所述。“人抗体”的定义并不包括抗原结合位点来源于非人种类的抗体。

[0095] 分离的人源化抗体可为合成的。人抗体虽然来源于人免疫球蛋白序列，但可使用系统诸如噬菌体展示掺入性合成CDR和/或合成框架生成，或可经受体外诱变以改善抗体性质，从而产生不天然存在于体内人抗体胚系库(repertoire)内的抗体。

[0096] 如本文所用，术语“重组抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有抗体，诸如从对于人免疫球蛋白基因而言转基因或转染色体的动物(例如，小鼠)或由其制备的杂交瘤(下文将进一步描述)分离的抗体，从经转化而表达抗体的宿主细胞分离的抗体，从重组的组合抗体文库分离的抗体，以及通过涉及将人免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列剪接在一起的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体，或使用Fab臂交换体外生成的抗体。

[0097] 如本文所用，术语“单克隆抗体”是指单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力，或在双特异性单克隆抗体而言，显示出对于两个不同表位的双重结合特异性。

[0098] 如本文所用，术语“基本上相同”意指所比较的两个抗体可变区氨基酸序列是相同的或具有“非实质差异”。非实质差异是在抗体可变区序列中不会不利地影响抗体特性的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、 13、14或15个氨基酸的替换。与本文所公开的可变区序列基

本上相同的氨基酸序列在本发明范围内。在一些实施例中，序列同一性可以是约90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高。可使用 Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen,Carlsbad,CA)的AlignX模块的默认设置，例如通过逐对比对来测定百分比同一性。本发明的蛋白质序列可用作执行公共或专利数据库检索的查询序列，以例如识别相关序列。用于执行此类检索的示例性程序为使用默认设置的XBLAST或BLASTP程序(http_//www_ncbi_nlm/nih_gov)或GenomeQuest™(GenomeQuest, Westborough,MA)套件。

[0099] 如本文所用，术语“表位”是指抗体特异性结合的抗原部分。表位通常由化学活性的(诸如极性、非极性或疏水性)表面部分组而组成，诸如氨基酸或多糖侧链，并且可具有特定的三维结构特征，以及特定的电荷特征。表位可由形成构象空间单元的连续和/或不连续氨基酸构成。对于不连续表位而言，抗原线性序列不同部分的氨基酸，通过蛋白质分子的折叠，在三维空间中紧密靠近。

[0100] 如本文所用，术语“联用”是指两种或更多种治疗剂可以在混合物中、作为单一药剂同时地或作为单一药剂以任何顺序先后地共同向受检者施用。

[0101] 除非另有明确规定，否则在本说明书通篇中，抗体恒定区中的氨基酸残基的编号根据EU索引进行，如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，(1991)中所述。

[0102] 物质的组成

[0103] 本发明提供特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂。本发明提供多肽和编码本发明双特异性试剂的多核苷酸或其互补核酸、载体、宿主细胞以及制备和使用它们的方法。

[0104] 包含单特异性和双特异性EGFR和/或c-Met FN3域的结合分子

[0105] 包含单特异性EGFR FN3域的结合分子

[0106] 本发明提供III型纤连蛋白(FN3)域，其特异性结合于表皮生长因子受体(EGFR)并阻碍表皮生长因子(EGF)结合于EGFR，从而可广泛用于治疗和诊断应用。本发明提供编码本发明FN3域的多核苷酸或其互补核酸、载体、宿主细胞以及制备和使用它们的方法。

[0107] 本发明的FN3域以高亲和力结合EGFR并抑制EGFR信号传导，并且可提供与小分子EGFR抑制剂相比在特异性和降低的脱靶毒性方面的有益效果，以及与常规抗体治疗剂相比改善的组织渗透性。

[0108] 本发明的一个实施例是特异性结合表皮生长因子受体(EGFR)并阻碍表皮生长因子(EGF)结合于EGFR的分离的III型纤连蛋白(FN3)域。

[0109] 在采用A431细胞并在与或不与本发明FN3域一起温育的情况下使用 600nM链霉亲和素-藻红蛋白缀合物检测来自A431细胞上的结合生物素酰化EGF的荧光量的竞争测定法中，本发明的FN3域可以小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M、小于约1×10^{-10}M、小于约1×10^{-11}M或小于约1×10^{-12}M的IC_{50}值阻碍EGF结合于EGFR。示例性的FN3域可以约 1×10^{-9}M至约1×10^{-7}M之间的IC_{50}值阻碍EGF结合于EGFR，诸如具有 SEQ ID NO:18-29、107-110或122-137的氨基酸序列的结合EGFR的FN3 域。与在不存在本发明FN3域的情况下使用相同测定法条件时EGF对 EGFR的结合相比，本发明的FN3域可将EGF对EGFR的结合阻碍至少 30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、 85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或 100％。

[0110] 与在不存在本发明FN3域的情况下使用相同测定法条件时的信号传导水平相比，本发明的FN3域可将EGFR信号传导抑制至少30％、35％、 40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、 91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。

[0111] 配体诸如EGF与EGFR的结合刺激受体二聚化、自磷酸化、受体的内部细胞质酪氨酸激酶域的激活，以及多个参与DNA合成(基因激活)和细胞周期进程或分裂的调控的信号转导和反式激活途径的引发。EGFR信号传导的抑制可导致一个或多个EGFR下游信号传导途径受抑制，因此中和EGFR可具有各种效应，包括细胞增殖和分化、血管生成、细胞运动和转移的抑制。

[0112] EGFR信号传导可使用各种熟知的方法测量，例如测量受体在酪氨酸 Y1068、Y1148和Y1173任一者处的自磷酸化(Downward等人，Nature 311:483-5，1984)和/或天然或合成底物的磷酸化。磷酸化可使用熟知的方法检测，诸如采用磷酸化酪氨酸特异性抗体的ELISA测定法或蛋白质印迹。示例性的测定法可见于Panek等人，J Pharmacol Exp Thera 283:1433- 44，1997和Batley等人，Life Sci 62:143-50，1998以及本文所述的测定法。

[0113] 在一个实施例中，当在A431细胞中使用50ng/mL人EGF测量时，本发明的FN3域以小于约2.5×10^{-6}M，例如小于约1×10^{-6}M、小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M、小于约1×10^{-10}M、小于约1×10^{-11}M 或小于约1×10^{-12}M的IC_{50}值抑制在EGFR残基位置第1173位酪氨酸处 EGF诱导的EGFR磷酸化。

[0114] 在一个实施例中，当在A431细胞中使用50ng/mL人EGF测量时，本发明的FN3域以在约1.8×10^{-8}M至约2.5×10^{-6}M之间的IC_{50}值抑制在EGFR 残基位置第1173位酪氨酸处EGF诱导的EGFR磷酸化。此类示例性的 FN3域是具有SEQ ID NO:18-29、107-110或122-137的氨基酸序列的那些。

[0115] 在一个实施例中，如通过表面等离子共振或Kinexa方法所测定，如本领域技术人员所实践，本发明的FN3域以小于约1×10^{-8}M，例如小于约 1×10^{-9}M、小于约1×10^{-10}M、小于约1×10^{-11}M、小于约1×10^{-12}M或小于约 1×10^{-13}M的离解常数(K_D)结合人EGFR。在一些实施例中，本发明的 FN3域以约2×10^{-10}至约1×10^{-8}M之间的K_D结合人EGFR。FN3域对EGFR 的亲和力可使用任何合适的方法通过实验测定。(参见例如，Berzofsky等人，“Antibody-Antigen Interactions”，载于Fundamental Immunology, Paul，W.E.编辑，Raven Press:New York，NY(1984)；Kuby，Janis Immunology，W.H.Freeman and Company:New York，NY(1992)；以及本文所述的方法)。如果在不同的条件(例如，同渗容摩、pH)下测量，特定FN3域-抗原相互作用的测量亲和力可变化。因此，亲和力和其他抗原结合参数(例如，K_D、K_{on}、K_{off})的测量优选地用蛋白质支架和抗原的标准化溶液，以及标准化缓冲液，诸如本文所述的缓冲液进行。

[0116] 示例性的结合EGFR的本发明FN3域包括SEQ ID NO:18-29、107-110 或122-137的FN3域。

[0117] 在一个实施例中，特异性结合EGFR的FN3域包含与SEQ ID NO:27 的氨基酸序列至少87％相同的氨基酸序列。

[0118] 在一个实施例中，特异性结合EGFR的FN3域包含：

[0119] FG环，该FG环包含序列HNVYKDTNX_9RGL(SEQ ID NO:179)或序列LGSYVFEHDVML(SEQ

ID NO:180)，其中X_9为M或I；和

[0120] BC环，该BC环包含序列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:181)；

[0121] 其中

[0122] X_1为A、T、G或D；

[0123] X_2为A、D、Y或W；

[0124] X_3为P、D或N；

[0125] X_4为L或不存在；

[0126] X_5为D、H、R、G、Y或W；

[0127] X_6为G、D或A；

[0128] X_7为A、F、G、H或D；并且

[0129] X_8为Y、F或L。

[0130] 特异性结合EGFR并抑制EGFR的自磷酸化的本发明FN3域可包含作为结构特征的FG环，该FG环包含序列HNVYKDTNX_9RGL(SEQ ID NO: 179)或序列LGSYVFEHDVML(SEQ ID NO:180)，其中X_9为M或I。此类FN3域还可包含8或9个氨基酸长并由序列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:181)限定的BC环，并且当在A431细胞中使用50ng/mL人EGF测量时，以小于约2.5×10^{-6}M的IC_{50}值，或在约1.8×10^{-8}M至约2.5×10^{-6}M之间的IC_{50}值抑制EGFR自磷酸化。

[0131] 特异性结合EGFR并抑制EGFR的自磷酸化的本发明FN3域还包含如下序列：

[0132] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$DSFLIQYQESEKVGEAI NLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX_9RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO:182)，或序列

[0133] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$DSFLIQYQESEKVGEAI NLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO:183)，

[0134] 其中

[0135] X_1为A、T、G或D；

[0136] X_2为A、D、Y或W；

[0137] X_3为P、D或N；

[0138] X_4为L或不存在；

[0139] X_5为D、H、R、G、Y或W；

[0140] X_6为G、D或A；

[0141] X_7为A、F、G、H或D；

[0142] X_8为Y、F或L；并且

[0143] X_9为M或I

[0144] 可使用熟知的方法和本文所述的方法生成结合EGFR的FN3域并测试其抑制EGFR自磷酸化的能力。

[0145] 本发明的另一个实施例是特异性结合EGFR的分离的FN3域，其中 FN3域包含以SEQ ID NO:18-29、107-110或122-137示出的序列。

[0146] 在一些实施例中，结合EGFR的FN3域包含连接到特定FN3域N-末端的起始子甲硫氨酸(Met)或连接到C-末端的半胱氨酸(Cys)，例如以有利于半衰期延长分子的表达和/或缀合。

[0147] 本发明的另一个实施例是特异性结合EGFR并阻碍EGF结合于EGFR 的分离的III型

纤连蛋白(FN3)域,其中FN3域分离自基于SEQ ID NO:1 的Tencon序列而设计的文库。

[0148] 包含单特异性c-Met FN3域的结合分子

[0149] 本发明提供III型纤连蛋白(FN3)域,其特异性结合于肝细胞生长因子受体(c-Met)并阻碍肝细胞生长因子(HGF)结合于c-Met,从而可广泛用于治疗和诊断应用。本发明提供编码本发明FN3域的多核苷酸或其互补核酸、载体、宿主细胞以及制备和使用它们的方法。

[0150] 本发明的FN3域以高亲和力结合c-Met并抑制c-Met信号传导,并且可提供与小分子c-Met抑制剂相比在特异性和降低的脱靶毒性方面的有益效果,以及与常规抗体治疗剂相比改善的组织渗透性。本发明的FN3域是单价的,因此防止了其他二价分子可能出现的不期望的受体聚簇和激活。

[0151] 本发明的一个实施例是特异性结合肝细胞生长因子受体(c-Met)并阻碍肝细胞生长因子(HGF)结合于c-Met的分离的III型纤连蛋白(FN3) 域。

[0152] 在检测在存在本发明FN3域的情况下对生物素酰化HGF结合于c-Met- Fc融合蛋白的抑制的测定法中,本发明的FN3域可以小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M、小于约1×10^{-10}M、小于约1×10^{-11}M或小于约1×10^{-12}M的IC_{50}值阻碍HGF结合于c-Met。示例性的FN3域可以约 2×10^{-10}M至约6×10^{-8}M之间的IC_{50}值阻碍HGF结合于c-Met。与在不存在本发明的FN3域的情况下使用相同测定法条件时HGF对c-Met的结合相比,本发明的FN3域可将HGF结合于c-Met阻碍至少30%、35%、40%、 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0153] 与在不存在本发明FN3域的情况下使用相同测定法条件时的信号传导水平相比,本发明的FN3域可将c-Met信号传导抑制至少30%、35%、 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0154] HGF与c-Met的结合刺激受体二聚化、自磷酸化、受体的内部细胞质酪氨酸激酶域的激活,以及多个参与DNA合成(基因激活)和细胞周期进程或分裂的调控的信号转导和反式激活途径的引发。c-Met信号传导的抑制可导致一个或多个c-Met下游信号传导途径受抑制,因此中和c-Met可具有各种效应,包括细胞增殖和分化、血管生成、细胞运动和转移的抑制。

[0155] c-Met信号传导可使用各种熟知的方法测量,例如测量受体在至少一个酪氨酸残基Y1230、Y1234、Y1235或Y1349上的自磷酸化和/或天然或合成底物的磷酸化。可例如在ELISA测定法中或在蛋白质印迹上使用对磷酸化酪氨酸具有特异性的抗体来检测磷酸化。酪氨酸激酶活性的测定法描述于例如:Panek等人,J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44,1997和Batley等人,Life Sci 62:143-50,1998以及本文所述的测定法。

[0156] 在一个实施例中,当在NCI-H441细胞中使用100ng/mL重组人HGF 测量时,本发明的FN3域以小于约1×10^{-6}M、小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M、小于约1×10^{-10}M、小于约1×10^{-11}M或小于约 1×10^{-12}M的IC_{50}值抑制在c-Met残基位置1349处HGF诱导的c-Met磷酸化。

[0157] 在一个实施例中,当在NCI-H441细胞中使用100ng/mL重组人HGF 测量时,本发明的FN3域以在约4×10^{-9}M至约1×10^{-6}M之间的IC_{50}值抑制在c-Met酪氨酸Y1349处HGF诱导的

c-Met磷酸化。

[0158] 在一个实施例中,如通过表面等离子共振或Kinexa方法所测定,如本领域技术人员所实践,本发明的FN3域以等于或小于约1×10^{-7}M、1×10^{-8}M、1×10^{-9}M、1×10^{-10}M、1×10^{-11}M、1×10^{-12}M、1×10^{-13}M、1×10^{-14}M或1×10^{-15}M 的离解常数(K_D)结合人c-Met。在一些实施例中,本发明的FN3域以约 3×10^{-10}M至约5×10^{-8}M之间的K_D结合人c-Met。FN3域对c-Met的亲和力可使用任何合适的方法通过实验测定。(参见例如,Berzofsky等人,"Antibody-Antigen Interactions",载于Fundamental Immunology,Paul, W.E.编辑,Raven Press:New York,NY(1984);Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,NY(1992);以及本文所述的方法)。如果在不同的条件(例如,同渗容摩、pH)下测量,特定FN3域-抗原相互作用的测量亲和力可变化。因此,亲和力和其他抗原结合参数(例如,K_D、K_{on}、K_{off})的测量优选地用蛋白质支架和抗原的标准化溶液,以及标准化缓冲液,诸如本文所述的缓冲液进行。

[0159] 示例性的结合c-Met的本发明FN3域包括具有SEQ ID NO:32-49或 111-114的氨基酸序列的FN3域。

[0160] 在一个实施例中,特异性结合c-Met的FN3域包含与SEQ ID NO:41 的氨基酸序列至少83%相同的氨基酸序列。

[0161] 在一个实施例中,特异性结合c-Met的FN3域包含:

[0162] C链和CD环,该C链和CD环包含序列DSFX_{10}IRYX_{11}E $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$(SEQ ID NO:184),其中

[0163] X_{10}为W、F或V;

[0164] X_{11}为D、F或L;

[0165] X_{12}为V、F或L;

[0166] X_{13}为V、L或T;

[0167] X_{14}为V、R、G、L、T或S;

[0168] X_{15}为G、S、A、T或K;并且

[0169] X_{16}为E或D;和

[0170] F链和FG环,该F链和FG环包含序列TEYX_{17}VX_{18}I$X_{19}X_{20}$V KGG$X_{21}X_{22}SX_{23}$(SEQ ID NO:185),其中

[0171] X_{17}为Y、W、I、V、G或A;

[0172] X_{18}为N、T、Q或G;

[0173] X_{19}为L、M、N或I;

[0174] X_{20}为G或S;

[0175] X_{21}为S、L、G、Y、T、R、H或K;

[0176] X_{22}为I、V或L;并且

[0177] X_{23}为V、T、H、I、P、Y或L。

[0178] 特异性结合c-Met并抑制c-Met的自磷酸化的本发明FN3域还包含如下序列:

[0179] LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX_{10}IRYX_{11}E $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$

[0180] AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX_{17}VX_{18}I$X_{19}X_{20}$VKGG$X_{21}X_{22}SX_{23}$PLSAE FTT(SEQ ID NO:186),

[0181] 其中

[0182] X_{10}为W、F或V;并且

[0183] X_{11}为D、F或L;

[0184] X_{12}为V、F或L;

[0185] X_{13}为V、L或T;

[0186] X_{14}为V、R、G、L、T或S;

[0187] X_{15}为G、S、A、T或K;

[0188] X_{16}为E或D;

[0189] X_{17}为Y、W、I、V、G或A;

[0190] X_{18}为N、T、Q或G;

[0191] X_{19}为L、M、N或I;

[0192] X_{20}为G或S;

[0193] X_{21}为S、L、G、Y、T、R、H或K;

[0194] X_{22}为I、V或L;并且

[0195] X_{23}为V、T、H、I、P、Y或L。

[0196] 本发明的另一个实施例是特异性结合c-Met的分离的FN3域,其中FN3域包含以SEQ ID NO:32-49或111-114示出的序列。

[0197] 本发明的另一个实施例是特异性结合c-Met并阻碍HGF结合于c-Met 的分离的III型纤连蛋白(FN3)域,其中FN3域分离自基于SEQ ID NO:1 的Tencon序列而设计的文库。

[0198] EGFR或c-Met FN3域从基于Tencon序列的文库的分离

[0199] Tencon(SEQ ID NO:1)是由来自人腱生蛋白-C的十五个FN3域的共有序列而设计的非天然存在的III型纤连蛋白(FN3)域(Jacobs等人, Protein Engineering,Design,and Selection,25:107-117,2012;美国专利公布2010/0216708)。Tencon的晶体结构显示连接七条β-链的六个表面外露的环,这是FN3域所特有的,该β-链称为A、B、C、D、E、F和G,并且该环称为AB、BC、CD、DE、EF和FG环(Bork和Doolittle,Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992,1992;美国专利6,673,901)。这些环或每个环内的所选残基可被随机化以便构建III型纤连蛋白(FN3)域的文库,该文库可用于选择结合EGFR或c-Met的新型分子。表1示出了Tencon (SEQ ID NO:1)中的每个环和β-链的位置和序列。

[0200] 基于Tencon序列而设计的文库可因此具有随机化FG环或随机化BC 和FG环,诸如如下所述的文库TCL1或TCL2。Tencon BC环为7个氨基酸长,因此在BC环处多样化并基于Tencon序列而设计的文库中,1、2、 3、4、5、6或7个氨基酸可被随机化。Tencon FG环为7个氨基酸长,因此在FG环处多样化并基于Tencon序列而设计的文库中,1、2、3、4、5、 6或7个氨基酸可被随机化。在Tencon文库中的环处的进一步多样性可通过环处的残基的插入和/或缺失来实现。例如,FG和/或BC环可延伸1-22 个氨基酸,或减少1-3个氨基酸。Tencon中的FG环的长度为7个氨基酸,而抗体重链中相应环的范围为4-28个残基。为提供最大的多样性,FG环可在序列以及长度方面被多样化以对应于4-28个残基的抗体CDR3长度范围。例如,FG环可进一步通过将环延伸另外1、2、3、4或5个氨基酸而在长度方面被多样化。

[0201] 基于Tencon序列而设计的文库也可具有随机化另选表面,该表面形成于FN3域的侧面上并且包含两条或更多条β链以及至少一个环。一种此类另选表面由C和Fβ-链及CD和

FG环中的氨基酸形成(C-CD-F-FG表面)。基于Tencon另选C-CD-F-FG表面的文库设计示于图1中,并且此类文库的详细生成描述于美国专利公布US2013/0226834。

[0202] 基于Tencon序列而设计的文库也包括基于Tencon变体而设计的文库,该Tencon变体诸如为在残基位置11、14、17、37、46、73或86(残基编号对应于SEQ ID NO:1)处具有替换的Tencon变体,并且该变体表现出改善的热稳定性。示例性的Tencon变体描述于美国专利公布 2011/0274623,并且包括与SEQ ID NO:1的Tencon相比具有替换E11R、L17A、N46V和E86I的Tencon27(SEQ ID NO:99)。

[0203] 表1.

[0204]

FN3域	Tencon(SEQ ID NO:1)
A链	1-12
AB环	13-16
B链	17-21
BC环	22-28
C链	29-37
CD环	38-43
D链	44-50
DE环	51-54
E链	55-59
EF环	60-64
F链	65-74
FG环	75-81
G链	82-89

[0205] 可使用随机或限定组的氨基酸在所选残基位置处将基于Tencon和其他 FN3序列的文库随机化。例如,可使用NNK密码子(其编码所有20种天然存在的氨基酸)产生具有随机替换的文库中的变体。在其它多样化方案中,DVK密码子可用于编码氨基酸Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、 Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly和Cys。另选地,NNS密码子可用于产生所有20种氨基酸残基并同时降低终止密码子的频率。可例如使用Slonomics® technology (http:_//www_sloning_com)来合成在待多样化的位置具有偏向氨基酸分布的FN3域。这种技术使用预先制备的双链三体的文库,其用作对于成千上万的基因合成工艺而言为足够的通用构建模块。该三体文库代表对构建任何期望的DNA分子所必需的所有可能的序列组合。密码子命名根据熟知的IUB密码。

[0206] 本发明的特异性结合EGFR或c-Met的FN3域可通过如下方式产生 FN3文库诸如Tencon文库来分离:使用顺式展示将编码支架蛋白质的DNA 片段连接到编码RepA的DNA片段以生成体外翻译后形成的蛋白质-DNA 复合物集合(pool),其中每种蛋白质与编码其的DNA稳定相关联(美国专利7,842,476;Odegrip等人,Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2806-2810, 2004),并且通过本领域已知及实例中所述的任何方法测定文库对EGFR 和/或c-Met的特异性结合。可使用的示例性熟知的方法为ELISA、夹心免疫测定法和竞争性和非竞争性测定法(参见例如,Ausubel等人编辑, 1994,Current Protocols in Molecular

Biology,第1卷,John Wiley&Sons, Inc.,New York)。使用本文所述的方法,针对其阻碍EGFR配体诸如 EGF结合于EGFR或HGF结合于c-Met的能力以及其抑制EGFR和/或c- Met信号传导的能力,进一步表征了所鉴定的特异性结合EGFR或c-Met的 FN3域。

[0207] 可通过如下方式生成本发明的特异性结合于EGFR或c-Met的FN3 域:使用任何FN3域作为模板来生成文库,以及使用本文中提供的方法从文库筛选特异性结合EGFR或c-Met的分子。可使用的示例性FN3域是腱生蛋白C的第三FN3域(TN3)(SEQ ID NO:75)、Fibcon(SEQ ID NO: 76)以及纤连蛋白的第十FN3域(FN10)(SEQ ID NO:77)。标准的克隆和表达技术用于将文库克隆进载体或合成文库的双链cDNA盒以在体外表达或翻译文库。例如,可使用核糖体展示(Hanes和Pluckthun,Proc Natl Acad Sci USA,94,4937-4942,1997)、mRNA展示(Roberts和Szostak, Proc NatlAcad Sci USA,94,12297-12302,1997)或其他无细胞系统(美国专利5,643,768)。FN3域变体的文库可表达为展示在例如任何合适的噬菌体的表面上的融合蛋白。用于在噬菌体的表面上展示融合多肽的方法是熟知的 (美国专利公布2011/0118144;国际专利公布WO2009/085462;美国专利 6,969,108;美国专利6,172,197;美国专利5,223,409;美国专利6,582,915;美国专利6,472,147)。

[0208] 本发明的特异性结合EGFR或c-Met的FN3域可被修饰以改善其性质,诸如改善热稳定性以及热折叠和解折叠的可逆性。多种方法已应用于增加蛋白质和酶的表观热稳定性,包括基于与高度相似的热稳定序列比较的合理设计、稳定二硫桥的设计、增加α-螺旋倾向的突变、对盐桥进行工程改造、蛋白质表面电荷的改变、定向进化和共有序列的构成(Lehmann 和Wyss,Curr Opin Biotechnol,12,371-375,2001)。高度的热稳定性可增加所表达蛋白的产量、改善溶解度或活性、降低免疫原性并且使生产中对冷链的需要最小化。可被替换而改善Tencon(SEQ ID NO:1)的热稳定性的残基是残基位置11、14、17、37、46、73或86,并且描述于美国专利公布2011/0274623。对应于这些残基的替换可被掺入本发明的FN3域或包含双特异性FN3域的分子中。

[0209] 本发明的另一个实施例是特异性结合EGFR并阻碍EGF结合于EGFR 的分离的FN3域,其包含以SEQ ID NO:18-29、107-110、122-137示出的序列,还包含在与Tencon(SEQ ID NO:1)的位置11、14、17、37、46、 73和86对应的一个或多个残基位置处的替换。

[0210] 本发明的另一个实施例是特异性结合c-Met并阻碍HGF结合于c-Met 的分离的FN3域,其包含以SEQ ID NO:32-49或111-114示出的序列,还包含在与Tencon(SEQ ID NO:1)的位置11、14、17、37、46、73和86 对应的一个或多个残基位置处的替换。

[0211] 示例性的替换是替换E11N、E14P、L17A、E37P、N46V、G73Y和 E86I(根据SEQ ID NO:1编号)。

[0212] 在一些实施例中,本发明的FN3域包含与Tencon(SEQ ID NO:1)中的替换L17A、N46V和E86I对应的替换。

[0213] 特异性结合EGFR的FN3域(图1)具有与Tencon(SEQ ID NO:1) 相比延伸的FG环。因此,与Tencon(SEQ ID NO:1)中的残基11、14、 17、37、46、73和86对应的残基是图1A和1B所示的EGFR FN3域中的残基11、14、17、37、46、73和91,但例外的是SEQ ID NO:24的FN3 域,其中对应残基是残基11、14、17、38、74和92,这是由于BC环中插入了一个氨基酸。

[0214] 本发明的另一个实施例是特异性结合EGFR并阻碍EGF结合于EGFR 的分离的FN3域,其包含以SEQ ID NO:18-29、107-110或122-137示出的氨基酸序列,任选地具有与

Tencon(SEQ ID NO:1)中的替换L17A、N46V和E86I对应的替换。

[0215] 本发明的另一个实施例是特异性结合c-Met并阻碍HGF结合于c-Met 的分离的FN3域,其包含以SEQ ID NO:32-49或111-114示出的氨基酸序列,任选地具有与Tencon(SEQ ID NO:1)中的替换L17A、N46V和E86I 对应的替换。

[0216] 蛋白稳定性和蛋白易变性的测量可视为蛋白完整性的相同或不同方面。蛋白对由热、由紫外线或电离辐射、环境同渗容摩和pH(如果在液体溶液中)的变化、由小孔径过滤施加的机械剪切力、紫外线辐射、电离辐射(诸如由γ辐射)、化学或热脱水或任何其它可造成蛋白结构破坏的作用或力引起的变性敏感或“易变”。可使用标准方法测定分子的稳定性。例如,可通过使用标准方法测量热解链(“TM”)温度,即一半的分子变为解折叠的以摄氏度(℃)表示的温度来测定分子的稳定性。通常,TM越高,分子越稳定。除了热之外,化学环境也改变蛋白的稳定性以保持特定的三维结构。

[0217] 在一个实施例中,由TM的增加所测量,与工程改造之前的相同域相比,本发明的结合EGFR或c-Met的FN3域表现出稳定性增加至少5%、 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或更多。

[0218] 可通过多种方法同样地测量化学变性。化学变性剂包括盐酸胍、硫氰酸胍、脲、丙酮、有机溶剂(DMF、苯、乙腈)、盐(硫酸铵、溴化锂、氯化锂、溴化钠、氯化钙、氯化钠);还原剂(例如二硫苏糖醇、β-巯基乙醇、二硝基硫苯和氢化物,诸如硼氢化钠)、非离子和离子型去污剂、酸(例如盐酸(HCl)、乙酸(CH_3COOH)、卤代乙酸)、疏水分子(例如,磷脂)和靶向变性剂。变性程度的定量可依赖于功能特性的丧失,诸如结合靶分子的能力,或通过物理化学特性定量,诸如聚集的趋势、先前溶剂不可及残基的暴露或二硫键的破坏或形成。

[0219] 在一个实施例中,如通过使用盐酸胍作为化学变性剂所测量,与工程改造之前的相同支架相比,本发明的结合EGFR或c-Met的FN3域表现出稳定性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或更多。使用熟知的方法,在用增加浓度的盐酸胍处理后,增加的稳定性可测量为降低的色氨酸荧光的函数。

[0220] 本发明的FN3域可作为单体、二聚体或多聚体产生,例如作为增加化合价和因此靶分子结合的亲和力的手段,或产生同时结合两种或多种不同的靶分子双特异性或多特异性支架的手段。二聚体和多聚体可通过连接单特异性、双特异性或多特异性蛋白质支架来产生,例如,通过纳入氨基酸接头,例如含有聚甘氨酸、甘氨酸和丝氨酸或丙氨酸和脯氨酸的接头。示例性的接头包括$(GS)_2$、(SEQ ID NO:78)、$(GGGGS)_5$(SEQ ID NO:79)、$(AP)_2$(SEQ ID NO:80)、$(AP)_5$(SEQ ID NO:81)、$(AP)_{10}$(SEQ ID NO:82)、 $(AP)_{20}$(SEQ ID NO:83)和A$(EAAAK)_5$AAA(SEQ ID NO:84)接头。二聚体和多聚体可彼此以N到C方向连接。使用天然存在的以及人工肽接头将多肽连接成新型连接的融合多肽在文献中为熟知的(Hallewell等人,J Biol Chem 264,5260-5268,1989;Alfthan等人,Protein Eng.8,725-731, 1995;Robinson&Sauer,Biochemistry 35,109-116,1996;美国专利 5,856,456)。

[0221] 特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂

[0222] 本发明的特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂可提供与小分子 EGFR和/或c-Met抑制剂相比在特异性和降低的脱靶毒性方面的有益效果。本发明至少部分地基于这样令人惊讶的发现:当与结合EGFR和结合 c-Met的单特异性试剂的混合物相比时,特异性结

合EGFR和c-Met的双特异性试剂提供显著改善的协同抑制效应。分子可被调制为对于EGFR和c- Met两者具有特定亲和力,以使瘤渗透和潴留最大化。与西妥昔单抗(Erbitux®)相比,特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂提供EGFR 和/或c-Met信号传导途径的更有效抑制并更有效地抑制瘤生长。

[0223] 特异性结合EGFR和c-Met的双特异性试剂可由包含EGFR结合域和c-Met结合域的任何多肽或多聚多肽形成。EGFR和c-Met结合域可为抗体的抗原结合位点、抗体的VH/VL对,或另一种类型的结合分子,诸如基于 III型纤连蛋白(FN3)域、IX型纤连蛋白(FN9)域或它们的任何组合的域。

[0224] EGFR和c-Met结合多肽可来源于既有的单特异性EGFR和c-Met结合多肽,或者可从头分离。

[0225] 包含双特异性EGFR/c/Met FN3域的分子

[0226] 本发明的一个实施例是分离的包含双特异性FN3域的分子,其包含第一III型纤连蛋白(FN3)域和第二FN3域,其中第一FN3域特异性结合表皮生长因子受体(EGFR)并阻碍表皮生长因子(EGF)结合于EGFR,并且第二FN3域特异性结合肝细胞生长因子受体(c-Met)并阻碍肝细胞生长因子(HGF)结合于c-Met。

[0227] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子可通过如下方式生成:将本发明的任何结合EGFR的FN3域和任何结合c-Met的FN3域直接地或经由接头共价连接。因此,双特异性分子的第一FN3域可具有如上对于结合EGFR的FN3域所述的特性,并且双特异性分子的第二FN3域可具有如上对于结合c-Met的FN3域所述的特性。

[0228] 在一个实施例中,当在A431细胞中使用50ng/mL人EGF测量时,包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的第一FN3域以小于约2.5×10^{-6}M的 IC_{50}值抑制在EGFR残基第1173位酪氨酸处EGF诱导的EGFR磷酸化,并且当在NCI-H441细胞中使用100ng/mL人HGF测量时,包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子的第二FN3域以小于约1.5×10^{-6}M的IC_{50}值抑制在c-Met残基第1349位酪氨酸处HGF诱导的c-Met磷酸化。

[0229] 在另一个实施例中,当在A431细胞中使用50ng/mL人EGF测量时,包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的第一FN3域以在约1.8×10^{-8}M至约2.5×10^{-6}M之间的IC_{50}值抑制在EGFR残基第1173位酪氨酸处EGF诱导的EGFR磷酸化,并且当在NCI-H441细胞中使用100ng/mL人HGF测量时,包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的第二FN3域以在约4×10^{-9}M 至约1.5×10^{-6}M之间的IC_{50}值抑制在c-Met残基第1349位酪氨酸处HGF诱导的c-Met磷酸化。

[0230] 在另一个实施例中,包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的第一 FN3域以小于约1×10^{-8}M的离解常数(K_D)结合人EGFR,并且包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的第二FN3域以小于约5×10^{-8}M的K_D结合人c-Met。

[0231] 在结合EGFR和c-Met两者的双特异性分子中,第一FN3域以约2×10^{-10}至约1×10^{-8}M之间的K_D结合人EGFR,并且第二FN3域以约3×10^{-10}至约 5×10^{-8}M之间的K_D结合人c-Met。

[0232] 双特异性EGFR/c-Met分子对EGFR和c-Met的亲和力可如上对于单特异性分子所述而测定。

[0233] 在采用A431细胞并在与或不与第一FN3域一起温育的情况下使用 600nM链霉亲和素-藻红蛋白缀合物检测来自A431细胞上的结合生物素酰化EGF的荧光量的测定法中,本发

明双特异性EGFR/c-Met分子中的第一 FN3域可以在约1×10^{-9}M至约1.5×10^{-7}M之间的IC_{50}值阻碍EGF结合于 EGFR。与在不存在第一FN3域的情况下使用相同测定法条件时EGF对EGFR的结合相比，本发明的双特异性EGFR/c-Met分子中的第一FN3域可将EGF对EGFR的结合阻碍至少30％、35％、40％、45％、50％、55％、 60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、 95％、96％、97％、98％、99％或100％。

[0234] 在检测在存在第二FN3域的情况下对生物素酰化HGF结合于c-Met-Fc 融合蛋白的抑制的测定法中，本发明的双特异性EGFR/c-Met分子中的第二 FN3域可以在约2×10^{-10}M至约6×10^{-8}M之间的IC_{50}值阻碍HGF结合于c- Met。与在不存在第二FN3域的情况下使用相同测定法条件时HGF对c- Met的结合相比，双特异性EGFR/c-Met分子中的第二FN3域可将HGF对 c-Met的结合阻碍至少30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、 70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、 97％、98％、99％或100％。

[0235] 与在不存在本发明的双特异性EGFR/c-Met分子的情况下使用相同测定法条件时信号传导的水平相比，本发明的双特异性EGFR/c-Met分子可将 EGFR和/或c-Met信号传导抑制至少30％、35％、40％、45％、50％、 55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、 94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。

[0236] 可使用如上对于单特异性分子所述的各种熟知方法测量EGFR和c-Met 信号传导。

[0237] 与第一和第二FN3域的混合物所观察到的协同抑制相比，包含特异性结合EGFR的第一FN3域和特异性结合c-Met的第二FN3域的本发明双特异性EGFR/c-Met分子提供EGFR和c-Met信号传导及瘤细胞增殖的显著增强的协同抑制。可例如通过测量包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子及两种单特异性分子(一种结合EGFR，另一种结合c-Met)的混合物对ERK 磷酸化的抑制，来评估协同抑制。本发明的双特异性EGFR/c-Met分子可以与两种单特异性FN3域的混合物的IC_{50}值相比小至少约100倍、例如小至少500、1000、5000或10,000倍的IC_{50}值抑制ERK磷酸化，指示与两种单特异性FN3域的混合物相比，包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子效力增强至少100倍。示例性的包含双特异性EGFR-c-Met FN3域的分子可以约5×10^{-9}M或更小的IC_{50}值抑制ERK磷酸化。可使用标准方法和本文所述的方法测量ERK磷酸化。

[0238] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子可以与第一FN3域和第二FN3的混合物对NCI-H292细胞生长的抑制的IC_{50}值相比小至少30 倍的IC_{50}值抑制NCI-H292细胞增殖，其中用包含10％的FBS且补充有 7.5ng/mL的HGF的培养基诱导细胞增殖。本发明的双特异性分子可以与第一FN3域和第二FN3域的混合物对瘤细胞增殖的抑制的IC_{50}值相比小约30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、 700、800或约1000倍的IC_{50}值抑制瘤细胞增殖。可使用标准方法和本文所述的方法测量瘤细胞增殖的抑制。

[0239] 本发明的另一个实施例是包含双特异性FN3域的分子，其包含第一III 型纤连蛋白(FN3)域和第二FN3域，其中第一FN3域特异性结合表皮生长因子受体(EGFR)并阻碍表皮生长因子(EGF)结合于EGFR，并且第二FN3域特异性结合肝细胞生长因子受体(c-Met)，并阻碍肝细胞生长因子(HGF)结合于c-Met，其中

[0240] 第一FN3域包含：

[0241] FG环，该FG环包含序列HNVYKDTNX_9RGL(SEQ ID NO: 179)或序列LGSYVFEHDVML(SEQ ID NO:180)，其中X_9为M或 I；和

[0242] BC环，该BC环包含序列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO: 181)，

[0243] 其中

[0244] X_1为A、T、G或D；

[0245] X_2为A、D、Y或W；

[0246] X_3为P、D或N；

[0247] X_4为L或不存在；

[0248] X_5为D、H、R、G、Y或W；

[0249] X_6为G、D或A；

[0250] X_7为A、F、G、H或D；并且

[0251] X_8为Y、F或L；并且

[0252] 第二FN3域包含：

[0253] C链和CD环，该C链和CD环包含序列DSFX_{10}IRYX_{11}E $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$(SEQ ID NO: 184)，其中

[0254] X_{10}为W、F或V；

[0255] X_{11}为D、F或L；

[0256] X_{12}为V、F或L；

[0257] X_{13}为V、L或T；

[0258] X_{14}为V、R、G、L、T或S；

[0259] X_{15}为G、S、A、T或K；并且

[0260] X_{16}为E或D；和

[0261] F链和FG环，该F链和FG环包含序列TEYX_{17}VX_{18}I$X_{19}X_{20}$V KGG$X_{21}X_{22}SX_{23}$(SEQ ID NO: 185)，其中

[0262] X_{17}为Y、W、I、V、G或A；

[0263] X_{18}为N、T、Q或G；

[0264] X_{19}为L、M、N或I；

[0265] X_{20}为G或S；

[0266] X_{21}为S、L、G、Y、T、R、H或K；

[0267] X_{22}为I、V或L；并且

[0268] X_{23}为V、T、H、I、P、Y或L。

[0269] 在另一个实施例中，双特异性分子包含结合具有如下序列的EGFR的第一FN3域：

[0270] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$DSFLIQYQESEKVGEAI NLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX_9RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO:182)，或序列

[0271] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$

[0272] DSFLIQYQESEKVGEAINLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO:183)，

[0273] 其中在SEQ ID NO:182和183中；

[0274] X_1为A、T、G或D；

[0275] X_2为A、D、Y或W；

[0276] X_3为P、D或N；

[0277] X_4为L或不存在；

[0278] X_5为D、H、R、G、Y或W；

[0279] X_6为G、D或A；

[0280] X_7为A、F、G、H或D；

[0281] X_8为Y、F或L；并且

[0282] X_9为M或I。

[0283] 在另一个实施例中，双特异性分子包含结合具有如下序列的c-Met的第二FN3域：

[0284] LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX_{10}IRYX_{11}E $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$GX_{16} AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX_{17}VX_{18}I$X_{19}X_{20}$VKGG$X_{21}X_{22}$SX_{23}PLSAEFTT(SEQ ID NO:186)，

[0285] 其中

[0286] X_{10}为W、F或V；并且

[0287] X_{11}为D、F或L；

[0288] X_{12}为V、F或L；

[0289] X_{13}为V、L或T；

[0290] X_{14}为V、R、G、L、T或S；

[0291] X_{15}为G、S、A、T或K；

[0292] X_{16}为E或D；

[0293] X_{17}为Y、W、I、V、G或A；

[0294] X_{18}为N、T、Q或G；

[0295] X_{19}为L、M、N或I；

[0296] X_{20}为G或S；

[0297] X_{21}为S、L、G、Y、T、R、H或K；

[0298] X_{22}为I、V或L；并且

[0299] X_{23}为V、T、H、I、P、Y或L。

[0300] 示例性的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子包含以SEQ ID NO: 50-72、106、118-121或138-167示出的氨基酸序列。

[0301] 本发明的双特异性EGFR/c-Met分子具有与其功能特性(诸如抑制 EGFR自磷酸化)相关的某些结构特性，诸如结合EGFR的第一FN3域的 FG环，其包含序列HNVYKDTNX_9RGL(SEQ ID NO:179)或序列 LGSYVFEHDVML(SEQ ID NO:180)，其中X_9为M或I。

[0302] 在一个实施例中，本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子。

[0303] 当在H292细胞中使用50ng/mL人EGF测量时，以小于约8×10^{-7}M的 IC_{50}值抑制在EGFR残基第1173位酪氨酸处EGF诱导的EGFR磷酸化；

[0304] 当在NCI-H441细胞中使用100ng/mL人HGF测量时，以小于约 8.4×10^{-7}M的IC_{50}值抑制在c-Met残基第1349位酪氨酸处HGF诱导的c- Met磷酸化；

[0305] 以小于约9.5×10^{-6}M的IC_{50}值抑制HGF诱导的NCI-H292细胞增殖，其中用包含7.5ng的HGF的10％的FBS诱导细胞增殖；

[0306] 以小于约2.0×10^{-8}M的K_D结合EGFR；或

[0307] 以小于约2.0×10^{-8}M的K_D结合c-Met。

[0308] 在另一个实施例中，本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子当在H292细

胞中使用50ng/mL人EGF测量时，以在约4.2×10^{-9}M与 8×10^{-7}M之间的IC_{50}抑制EGFR残基第1173位酪氨酸处EGF诱导的EGFR 磷酸化；

[0309] 当在NCI-H441细胞中使用100ng/mL人HGF测量时，以在约2.4×10^{-8}M至约8.4×10^{-7}M之间的IC_{50}值抑制在c-Met残基第1349位酪氨酸处HGF 诱导的c-Met磷酸化；

[0310] 以在约2.3×10^{-8}M至约9.5×10^{-6}M之间的IC_{50}值抑制HGF诱导的NCI- H292细胞增殖，其中用包含7.5ng的HGF的10％的FBS诱导细胞增殖；

[0311] 以在约2×10^{-10}M至约2.0×10^{-8}M之间的K_D结合EGFR；或

[0312] 以在约1×10^{-9}M至约2.0×10^{-8}M之间的K_D结合c-Met。

[0313] 在一个实施例中，双特异性EGFR/c-Met分子包含具有如下序列的结合EGFR的FN3域：

[0314] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKVGEAI NLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV HNVYKDTNX$_9$RGL PLSAEFTT(SEQ ID NO:182)，其中

[0315] X$_1$为D；

[0316] X$_2$为D；

[0317] X$_3$为P；

[0318] X$_4$不存在；

[0319] X$_5$为H或W；

[0320] X$_6$为A；

[0321] X$_7$为F

[0322] X$_8$为Y；并且

[0323] X$_9$为M或I；和

[0324] 包含如下序列的结合c-Met的FN3域：

[0325] LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX$_{10}$IRYX$_{11}$E X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$ AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX$_{17}$VX$_{18}$IX$_{19}$X$_{20}$VKGGX$_{21}$X$_{22}$SX$_{23}$ PLSAEFTT(SEQ ID NO:186)，

[0326] 其中

[0327] X$_{10}$为W；

[0328] X$_{11}$为F；

[0329] X$_{12}$为F；

[0330] X$_{13}$为V或L；

[0331] X$_{14}$为G或S；

[0332] X$_{15}$为S或K；

[0333] X$_{16}$为E或D；

[0334] X$_{17}$为V；

[0335] X$_{18}$为N；

[0336] X$_{19}$为L或M；

[0337] X$_{20}$为G或S；

[0338] X$_{21}$为S或K；

[0339] X$_{22}$为I；并且

[0340] X$_{23}$为P。

[0341] 示例性的双特异性EGFR/c-Met分子是具有以SEQ ID NO:57、61、62、63、64、65、66、67和68示出的序列的那些。

[0342] 本发明的双特异性分子还可包含在第一FN3域和/或第二FN3域中的与如上所述的Tencon(SEQ ID NO:1)中的位置11、14、17、37、46、73 和86对应的一个或多个残基位置处的替换,以及位置29处的替换。示例性的替换是替换E11N、E14P、L17A、E37P、N46V、G73Y、E86I和 D29E(根据SEQ ID NO:1编号)。本领域的技术人员将认识到其他氨基酸可用于替换,诸如如下文所述在其侧链中相关的氨基酸的家族内的氨基酸。可使用本文的方法测试所生成的变体的稳定性及其对EGFR和/或c- Met的结合。

[0343] 在一个实施例中,包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子包含特异性结合EGFR的第一FN3域和特异性结合c-Met的第二FN3域,其中第一 FN3域包含如下序列:

[0344] LPAPKNLVVSX$_{24}$VTX$_{25}$DSX$_{26}$RLSWDDPX$_{27}$AFYX$_{28}$SFLIQYQX$_{29}$SEKVGE AIX$_{30}$LTVPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSIYX$_{31}$VHNVYKDTNX$_{32}$RGLPLSA X$_{33}$FTT(SEQ ID NO:187),其中

[0345] X$_{24}$为E、N或R;

[0346] X$_{25}$为E或P;

[0347] X$_{26}$为L或A;

[0348] X$_{27}$为H或W;

[0349] X$_{28}$为E或D;

[0350] X$_{29}$为E或P;

[0351] X$_{30}$为N或V;

[0352] X$_{31}$为G或Y;

[0353] X$_{32}$为M或I;并且

[0354] X$_{33}$为E或I;

[0355] 并且第二FN3域包含如下序列:

[0356] LPAPKNLVVSX$_{34}$VTX$_{35}$DSX$_{36}$RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX$_{37}$FX$_{38}$X$_{39}$X$_{40}$G X$_{41}$AIX$_{42}$LTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNIX$_{43}$X$_{44}$VKGGX$_{45}$ISPPLSAX$_{46}$F TT(SEQ ID NO:188);其中

[0357] X$_{34}$为E、N或R;

[0358] X$_{35}$为E或P;

[0359] X$_{36}$为L或A;

[0360] X$_{37}$为E或P;

[0361] X$_{38}$为V或L;

[0362] X$_{39}$为G或S;

[0363] X$_{40}$为S或K;

[0364] X$_{41}$为E或D;

[0365] X$_{42}$为N或V;

[0366] X$_{43}$为L或M;

[0367] X$_{44}$为G或S;

[0368] X$_{45}$为S或K;并且

[0369] X$_{46}$为E或I。

[0370] 在其他实施例中,包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子包含具有与SEQ ID NO:

27的氨基酸序列至少87％、88％、89％、90％、91％、 92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列的第一FN3域，以及具有与SEQ ID NO:41的氨基酸序列至少83％、84％、 85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列的第二FN3域。

[0371] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子可被调制为对于 EGFR和c-Met具有特定亲和力以使瘤积聚最大化。

[0372] 本发明的另一个实施例是分离的包含双特异性FN3域的分子，其包含第一III型纤连蛋白(FN3)域和第二FN3域，其中第一FN3域特异性结合表皮生长因子受体(EGFR)并阻碍表皮生长因子(EGF)结合于EGFR，并且第二FN3域特异性结合肝细胞生长因子受体(c-Met)并阻碍肝细胞生长因子(HGF)结合于c-Met，其中第一FN3域和第二FN3域分离自基于 SEQ ID NO:1的Tencon序列而设计的文库。

[0373] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子可通过如下方式生成：使用熟知的方法将本发明的结合EGFR的FN3域和结合c-Met的FN3 域共价偶联。FN3域可经由接头连接，例如包含聚甘氨酸、甘氨酸和丝氨酸或丙氨酸和脯氨酸的接头。示例性的接头包括$(GS)_2$、(SEQ ID NO:78)、$(GGGGS)_5$(SEQ ID NO:79)、$(AP)_2$(SEQ ID NO:80)、$(AP)_5$(SEQ ID NO: 81)、$(AP)_{10}$(SEQ ID NO:82)、$(AP)_{20}$(SEQ ID NO:83)、A$(EAAAK)_5$AA(SEQ ID NO:84)接头。使用天然存在的以及人工肽接头将多肽连接成新型连接的融合多肽在文献中为熟知的(Hallewell等人，J Biol Chem 264，5260-5268，1989；Alfthan等人，Protein Eng.8，725-731， 1995；Robinson&Sauer，Biochemistry 35，109-116，1996；美国专利 5,856,456)。本发明的双特异性EGFR/c-Met分子可从第一FN3域的C-末端到第二FN3域的N-末端或从第二FN3域的C-末端到第一FN3域的N-末端连接在一起。任何结合EGFR的FN3域可共价连接到结合c-Met的FN3 域。示例性的结合EGFR的FN3域是具有以SEQ ID NO:18-29、107-110和 122-137示出的氨基酸序列的域，并且示例性的结合c-Met的FN3域是具有以SEQ ID NO:32-49和111-114示出的氨基酸序列的域。要偶联到双特异性分子的结合EGFR的FN3域可另外在其N-末端包含起始子甲硫氨酸 (Met)。

[0374] 包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的变体在本发明的范围内。例如，可在包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子中作出替换，以及当与亲本分子相比时，所得变体保留对于EGFR和c-Met的相似选择性和效力。示例性的修饰是例如将产生具有与亲本分子类似特性的变体的保守替换。保守替换是在其侧链中相关的氨基酸家族内发生的那些。基因编码的氨基酸可被分成四个家族：(1)酸性(天冬氨酸、谷氨酸)；(2)碱性 (赖氨酸、精氨酸、组氨酸)；(3)非极性(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)；以及(4)不带电极性(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被共同分类为芳族氨基酸。另选地，氨基酸库(repertoire)可被分组为(1)酸性(天冬氨酸、谷氨酸)； (2)碱性(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)，(3)脂族(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸)，并且丝氨酸和苏氨酸任选地被单独分组为脂族-羟基；(4)芳族(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)；(5)酰胺(天冬酰胺、谷氨酰胺)；以及(6)含硫(半胱氨酸和甲硫氨酸)(Stryer编辑，Biochemistry，第2版，WH Freeman and Co.， 1981)。可对包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子作出非保守替换，其涉及不同种类氨基酸之间的氨基酸残基的替换，以改善双特异性分子的性质。可以

使用本文描述的测定通过评估修饰的多肽或片段以类似于未经修饰的多肽或片段的方式产生应答的能力,容易地测定多肽或其片段的氨基酸序列中的变化是否导致功能同源物。其中已发生超过一个替换的肽、多肽或蛋白质可以容易地以相同方式进行测试。

[0375] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子可作为二聚体或多聚体生成,例如作为增加化合价和因此靶分子结合的亲合力的手段。多聚体可通过如下方式生成:例如通过使用熟知方法引入氨基酸接头,而将一个或多个结合EGFR的FN3域和一个或多个结合c-Met的FN3域连接,以形成包含对于EGFR或c-Met具有至少双特异性的至少三个单独的FN3域的分子。

[0376] 本发明的另一个实施例是包含双特异性FN3域的分子,其包含第一III 型纤连蛋白(FN3)域和第二FN3域,其中第一FN3域特异性结合表皮生长因子受体(EGFR)并阻碍表皮生长因子(EGF)结合于EGFR,并且第二FN3域特异性结合肝细胞生长因子受体(c-Met),并阻碍肝细胞生长因子(HGF)结合于c-Met,并且包含以SEQ ID NO:50-72、106或138-165 示出的氨基酸序列。

[0377] 半衰期延长部分

[0378] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子或单特异性结合 EGFR或c-Met的FN3域可例如经由共价相互作用掺入其他亚基。在本发明的一个方面,本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子还包含半衰期延长部分。示例性的半衰期延长部分是白蛋白、白蛋白变体、白蛋白结合蛋白质和/或域、转铁蛋白及其片段和类似物,以及Fc区域。示例性的白蛋白结合域以SEQ ID NO:117示出。

[0379] 抗体恒定区的全部或一部分可连接至本发明的分子以赋予抗体样特性,特别是与Fc区域相关的那些特性,例如Fc效应子功能诸如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)、吞噬作用,细胞表面受体(例如,B细胞受体; BCR)的下调,并且可通过修饰促成这些活性的Fc中的残基来进一步修饰 (对于综述,参见Strohl,Curr Opin Biotechnol.20,685-691,2009)。

[0380] 另外的部分可掺入到本发明的双特异性分子,诸如用于期望特性的聚乙二醇(PEG)分子,诸如PEG5000或PEG20,000;不同链长的脂肪酸和脂肪酸酯,例如,月桂酸酯、肉豆蔻酸酯,硬脂酸酯、花生酸酯、山嵛酸酯、油酸酯、花生四烯酸、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等、聚赖氨酸、辛烷、糖类(葡聚糖、纤维素、寡糖或多糖)。这些部分可与蛋白质支架编码序列直接融合并且可通过标准的克隆和表达技术产生。另选地,熟知的化学偶联方法可用于将这些部分连接至本发明的重组制备的分子。

[0381] 聚乙二醇化(pegyl)部分可通过如下方式例如被添加到本发明的双特异性或单特异性分子:使用熟知的方法,将半胱氨酸残基掺入到分子的C- 末端,以及将聚乙二醇化基团连接到半胱氨酸。具有C-末端半胱氨酸的示例性双特异性分子是具有以SEQ IN NO:170-178示出的氨基酸序列的那些分子。

[0382] 可通过若干熟知测定法比较掺入另外部分的本发明单特异性和双特异性分子的功能性。例如,由于掺入Fc域和/或Fc域变体而导致的单特异性和/或双特异性分子的改变的特性可在Fc受体结合测定法中使用该受体的可溶形式来测定,该受体的可溶形式诸如FcγRI、FcγRII、FcγRIII或FcRn受体,或使用熟知的测量例如ADCC或CDC的基于细胞的测定法,或在体内模型中评价本发明分子的药代动力学特性。

[0383] 多核苷酸、载体、宿主细胞

[0384] 本发明提供编码结合EGFR或结合c-Met的FN3域或本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的核酸，作为分离的多核苷酸或作为表达载体的部分或作为线性DNA序列的部分，包括用于体外转录/翻译的线性 DNA序列、与其组合物或定向诱变剂的原核、真核或丝状噬菌体表达、分泌和/或展示相容的载体。本文公开了某些示例性的多核苷酸，然而，其他多核苷酸也在本发明的范围内，考虑到给定表达系统中遗传密码的简并性或密码子偏好，其他多核苷酸编码结合EGFR或结合c-Met的FN3域或本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子。

[0385] 本发明的一个实施例是分离的多核苷酸，其编码具有SEQ ID NO:18- 29、107-110或122-137的氨基酸序列的特异性结合EGFR的FN3域。

[0386] 本发明的一个实施例是分离的多核苷酸，其包含SEQ ID NO:97-98或 168-169的多核苷酸序列。

[0387] 本发明的一个实施例是分离的多核苷酸，其编码具有以SEQ ID NO: 32-49或111-114示出的序列的氨基酸序列的特异性结合c-Met的FN3域。

[0388] 本发明的一个实施例是分离的多核苷酸，其编码具有SEQ ID NO:50- 72、106、118-121或138-165的氨基酸序列的包含双特异性EGFR/-c-Met FN3域的分子。

[0389] 本发明的一个实施例是分离的多核苷酸，其包含SEQ ID NO:115-116 或166-167的多核苷酸序列。

[0390] 本发明的多核苷酸可以通过化学合成(诸如在自动化多核苷酸合成仪上的固相多核苷酸合成)来制备，并装配成完整的单链或双链分子。另选地，本发明的多核苷酸可以通过其他技术来制备，诸如PCR之后进行常规克隆。制备或获得具有给定的已知序列的多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0391] 本发明的多核苷酸可包含至少一个非编码序列，诸如启动子或增强子序列、内含子、聚腺苷酸化信号、促进RepA结合的顺式序列等。多核苷酸序列还可包含编码另外的氨基酸的另外序列，其编码例如标记或标签序列，诸如组氨酸标签或HA标签以促进蛋白质的纯化或检测;信号序列;融合蛋白伴侣诸如RepA、Fc;或噬菌体外壳蛋白诸如pIX或pIII。

[0392] 本发明的另一个实施例是包含本发明的至少一种多核苷酸的载体。此类载体可以是质粒载体、病毒载体、杆状病毒表达载体、基于转座子的载体或任何其它适用于通过任何手段将本发明的多核苷酸引入给定生物体或遗传背景的载体。此类载体可以是包含可控制、调节、引起或允许由这种载体编码的多肽的表达的核酸序列元件的表达载体。此类元件可包含转录增强子结合位点、RNA聚合酶起始位点、核糖体结合位点以及有利于被编码多肽在给定表达系统中的表达的其它位点。此类表达系统可以是本领域熟知的基于细胞的系统或无细胞系统。

[0393] 本发明的另一个实施例是包含本发明载体的宿主细胞。单特异性结合 EGFR或结合c-Met的FN3域或本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子可任选地由细胞系、混合细胞系、永生化细胞或永生化细胞的无性系群体产生，如本领域熟知的。参见例如，Ausubel等人编辑，Current Protocols in Molecular Biology，John Wiley&Sons，Inc.，NY，NY(1987- 2001);Sambrook等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，第2 版，Cold Spring Harbor，NY(1989);Harlow和Lane，Antibodies，a Laboratory Manual，Cold

Spring Harbor,NY(1989);Colligan等人编辑, Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,NY(1994- 2001);Colligan等人,Current Protocols in Protein Science,John Wiley& Sons,NY,NY(1997-2001)。

[0394] 选择用于表达的宿主细胞可以是哺乳动物起源的或可选自COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、He G2、SP2/0、HeLa、骨髓瘤、淋巴瘤、酵母、昆虫或植物细胞,或它们的任何衍生物、永生化细胞或转化的细胞。另选地,宿主细胞可选自不能够使多肽糖基化的种类或生物体,例如原核细胞或生物体,诸如BL21、BL21(DE3)、BL21-GOLD (DE3)、XL1-Blue、JM109、HMS174、HMS174(DE3)以及任何天然或工程改造的大肠杆菌属(E.coli spp)、克雷伯氏菌属(Klebsiella spp.) 或假单胞菌属(Pseudomonas spp)菌株。

[0395] 本发明的另一个实施例是产生分离的本发明的特异性结合EGFR或c- Met的FN3域或分离的本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子的方法,所述方法包括在一定条件下培养分离的本发明的宿主细胞,使得分离的特异性结合EGFR或c-Met的FN3域或分离的包含双特异性EGFR/c- Met FN3域的分子被表达,以及纯化该域或分子。

[0396] 特异性结合EGFR或c-Met的FN3域或分离的本发明的包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子可通过熟知的方法从重组细胞培养物中纯化,例如通过蛋白质A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟基磷灰石色谱法和凝集素色谱法,或高效液相色谱法(HPLC)。

[0397] 双特异性EGFR/c-Met抗体

[0398] 双特异性EGFR/c-Met抗体可从头生成或可根据既有单特异性抗EGFR 和抗c-Met抗体来工程改造。

[0399] 可用于工程改造双特异性分子的示例性抗EGFR抗体是例如帕尼单抗 (ABX-EGF)、尼妥珠单抗、奈昔木单抗(necitumumab)、马妥珠单抗以及例如如下专利中所述的那些:美国专利US7,595,378、美国专利 US7,247,301、美国专利公布US2011/0256142、美国专利US5,891,996、美国专利US5,212,290、美国专利US5,558,864或美国专利US7,589,180。例如,可使用具有以SEQ ID NO:189或191示出的氨基酸序列的抗体VH域以及具有以SEQ ID NO:190或192示出的氨基酸序列的抗体VL域。

[0400] 可用于工程改造双特异性分子的示例性抗c-Met抗体是例如利妥木单抗(Rilotumumab)、奥纳珠单抗(Onartuzumab)、非妥珠单抗 (Ficlatuzumab)以及例如如下专利中所述的那些:PCT国际公布 WO2011/110642、美国专利公布US2004/0166544、PCT国际公布 WO2005/016382或PCT国际公布WO2006/015371。例如,可使用具有以 SEQ ID NO:193或195示出的氨基酸序列的抗体VH域以及具有以SEQ ID NO:194或196示出的氨基酸序列的抗体VL域。由其美国采用药名 (USAN)标识的抗体的重链和轻链氨基酸序列可经由美国医学协会 (American Medical Association)在http://_www_ama-assn_org处获得或经由CAS登记号获得。

[0401] 单特异性结合EGFR和c-Met的可变域可从例如噬菌体展示文库从头选择,其中噬菌体被工程改造以表达人免疫球蛋白或其部分,诸如Fab、单链抗体(scFv)或未配对或配对的抗体可变区(Knappik等人,J Mol Biol 296:57-86,2000;Krebs等人,J Immunol Meth 254:67-84,2001;Vaughan 等人,Nature Biotechnology 14:309-314,1996;Sheets等人,PITAS (USA)95:6157-6162,1998;Hoogenboom和Winter,J Mol Biol 227:381,1991;Marks

等人,J Mol Biol 222:581,1991)并且随后被工程改造成双特异性形式。单特异性结合EGFR和c-Met的可变域可例如从以与噬菌体pIX外壳蛋白的融合蛋白的形式表达抗体重链和轻链可变区的噬菌体展示文库分离,如Shi等人,(2010)J.Mol.Biol.397:385-96和PCT国际公布WO09/085462所述。针对与人EGFR或c-Met胞外域的结合来筛选抗体文库,并进一步表征所得的阳性克隆,从克隆裂解物分离Fab。此类用于分离人抗体的噬菌体展示法在本领域是成熟的。参见例如:美国专利 5,223,409;美国专利5,403,484;以及美国专利5,571,698、美国专利 5,427,908、美国专利5,580,717、美国专利5,969,108、美国专利6,172,197、美国专利5,885,793;美国专利6,521,404;美国专利6,544,731;美国专利 6,555,313;美国专利6,582,915和美国专利6,593,081。使用本文所述的方法将从头获得的结合EGFR或c-Met的可变区工程改造成双特异性形式。

[0402] 双特异性抗体形式

[0403] 本发明的抗体具有两个或更多个抗原结合位点并且是双特异性的。本发明的双特异性抗体包括具有全长抗体结构的抗体。

[0404] 如本文所用,“全长抗体”是指具有两条全长抗体重链和两条全长抗体轻链的抗体。全长抗体重链(HC)由熟知的重链可变域VH和恒定域 CH1、CH2和CH3组成。全长抗体轻链(LC)由熟知的轻链可变域VL和恒定域CL组成。全长抗体可能在一条或两条重链中缺少C-末端赖氨酸 (K)。

[0405] 术语“Fab臂”或“半分子”是指特异性结合抗原的一个重链-轻链对。

[0406] 本发明的全长双特异性抗体可例如使用两个单特异性二价抗体之间的 Fab臂交换(或半分子交换)通过如下方式生成:在每个半分子中的重链 CH3界面处引入替换以有利于具有不同特异性的两个抗体半分子在体外无细胞环境中或使用共表达进行的异源二聚体形成。Fab臂交换反应是CH3 域的二硫键异构化反应和离解-缔合的结果。亲本单特异性抗体的铰链区中的重链二硫键被还原。亲本单特异性抗体之一的所得游离半胱氨酸与第二亲本单特异性抗体分子的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲本抗体的CH3域通过离解-缔合而释放和重新形成。Fab臂的CH3域可被工程改造以有利于异源二聚化而不利于同源二聚化。所得产物是具有各自结合不同表位(即EGFR上的表位和c-Met上的表位)的两个Fab臂或半分子的双特异性抗体。

[0407] 如本文所用,“同源二聚化”是指具有相同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“同源二聚体”是指包含具有相同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0408] 如本文所用,“异源二聚化”是指具有不同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“异源二聚体”是指包含具有不同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0409] “杵臼”策略(参见例如PCT国际公布WO 2006/028936)可用于生成全长双特异性抗体。简而言之,可在影响CH3域相互作用的位置处使形成人IgG中CH3域的界面的所选氨基酸突变,以促进异源二聚体形成。将具有小侧链(臼)的氨基酸引入特异性结合第一抗原的抗体的重链中,并且将具有大侧链(杵)的氨基酸引入特异性结合第二抗原的抗体的重链中。在这两种抗体共表达之后,由于具有“臼”的重链与具有“杵”的重链的优先相互作用,而形成异源二聚体。形成杵和臼的示例性CH3替换对是(表达为第一重链的第一CH3域中的修饰位置/第二重链的第二CH3域中的修饰位置):T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和 T366W/T366S_L368A_Y407V。

[0410] 可使用其他策略,诸如使用静电相互作用通过替换一个CH3表面处的带正电残基和第二CH3表面处的带负电残基来促进重链异源二聚化,如美国专利公布US2010/0015133;美国专利公布US2009/0182127;美国专利公布US2010/028637或美国专利公布US2011/0123532中所述。在其他策略中,可通过下列替换来促进异源二聚化(表达为第一重链的第一CH3域中的修饰位置/第二重链的第二CH3域中的修饰位置):L351Y_F405A_Y407V/T394W、T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V、T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V、L351Y_Y407A/T366A_K409F、L351Y_Y407A/T366V_K409F、Y407A/T366A_K409F,或T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W,如美国专利公布US2012/0149876或美国专利公布US2013/0195849中所述。

[0411] 除上述方法之外,本发明的双特异性抗体还可通过如下方式在体外无细胞环境中生成:根据国际专利公布WO2011/131746中所述的方法,在两种单特异性同源二聚抗体的CH3区中引入非对称突变,并且在允许二硫键异构化的还原条件下由两种亲本单特异性同源二聚抗体形成双特异性异源二聚抗体。在所述方法中,第一单特异性二价抗体(例如,抗c-Met抗体)和第二单特异性二价抗体(例如,抗EGFR抗体)被工程改造以在CH3域处具有促进异源二聚体稳定性的某些替换;将这些抗体在足以允许铰链区中的半胱氨酸进行二硫键异构化的还原条件下一起温育;从而通过Fab臂交换生成双特异性抗体。温育条件可优选地恢复为非还原条件。可使用的示例性还原剂是2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羰基乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇,优选地为选自如下的还原剂:2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羰基乙基)膦。例如,可使用在存在至少25mM的2-MEA的情况下或在存在至少0.5mM的二硫苏糖醇的情况下在5-8的pH下例如在7.0的pH或7.4的pH下以至少20℃的温度温育至少90分钟。

[0412] 双特异性EGFR/c-Met抗体

[0413] 本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可提供与小分子EGFR和/或c-Met抑制剂相比在特异性和降低的脱靶毒性方面的有益效果。本发明至少部分地基于这样令人惊讶的发现:当与结合EGFR和结合c-Met的单特异性抗体的混合物或已公布的双特异性EGFR/c-Met抗体相比时,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体提供显著改善的协同抑制效应。根据该测定法,所观察到的协同效应在约14倍至超过约800倍之间变化。与西妥昔单抗(Erbitux®)相比,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体提供EGFR和c-Met信号传导途径的更有效抑制并更有效地抑制瘤生长。本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体抑制具有EGFR激活突变和/或具有EGFR中已知产生对酪氨酸激酶抑制剂(诸如吉非替尼)治疗的抗性的突变的瘤和/或瘤细胞系中的EGFR信号传导,并且抑制c-Met信号传导途径,即在癌诸如NSCLC中被鉴定为上调并且用EGFR酪氨酸激酶抑制剂治疗时提供补偿信号传导的途径。本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体除了直接抑制EGFR和c-Met信号传导外,还通过增强的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)以及EGFR和c-Met受体的降解而展示出抗瘤活性。与当前的EGFR疗法(西妥昔单抗和帕尼单抗)相反,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体经由增强的ADCC来诱导具有KRAS突变的瘤细胞的杀伤。

[0414] 国际专利公布WO2010/115551描述了使用结合EGFR的西妥昔单抗VH/VL对及结合c-Met的抗体5D5(MetMab,奥纳珠单抗)VH/VL对以IgG-scFv形式工程改造的、当前处于III期试验的双特异性EGFR/c-Met抗体(BSAB01)。BSAB01展现出与亲本抗体相比时A431细胞增

殖的大约两倍(加性)增强的抑制(WO2010/115551中的实例7、图8b),以及与两种亲本抗体的组合相比时Ovarc-8细胞增殖的适度加性抑制(15%相对于 10%抑制)(WO2010/115551中的图10a、实例16)。因此,令人惊讶且出人意料的是,本发明提供双特异性EGFR/c-Met抗体,其展现出EGFR和 c-Met信号传导、癌细胞存活和瘤生长的抑制的显著协同效应。不希望受任何理论的约束,据信本发明的双特异性抗体的显著协同效应至少部分地由EGFR和c-Met结合臂两者的表位特异性所引起,从而可能不仅通过EGFR 和c-Met同源二聚体而且通过EGFR/HERx异源二聚体来抑制信号传导。

[0415] 本发明的一个实施例是分离的双特异性表皮生长因子受体(EGFR)/ 肝细胞生长因子受体(c-Met)抗体,其包含:

[0416] a)第一重链(HC1),该第一重链包含HC1恒定域3(HC1 CH3) 和HC1可变区1(VH1);

[0417] b)第二重链(HC2),该第二重链包含HC2恒定域3(HC2 CH3) 和HC2可变区2(VH2);

[0418] c)第一轻链(LC1),该第一轻链包含轻链可变区1(VL1);和

[0419] 第二轻链(LC2),该第二轻链包含轻链可变区2(VL2),其中VH1 和VL1配对以形成特异性结合EGFR的第一抗原结合位点,并且VH2和 VL2配对以形成特异性结合c-Met的第二抗原结合位点,其中HC1在HC1 CH3中包含至少一个替换,并且HC2在HC2 CH3中包含至少一个替换,其中当根据EU索引对残基进行编号时,HC1 CH3中的替换和HC2 CH3中的替换在不同氨基酸残基位置处发生。

[0420] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体抑制NCI- H292、NCI-H1975或SKMES-1细胞系中的胞外信号相关激酶1和2 (ERK1/2)的磷酸化,并且与用包含重链3(HC3)和轻链3(LC3)的对照单价EGFR抗体以及包含重链4(HC4)和轻链4(LC4)的对照单价c- Met抗体的混合物抑制NCI-H292、NCI-H1975或SKMES-1细胞系中 ERK1/2的磷酸化的IC_{50}值相比,其IC_{50}值小至少约10倍、小至少约20 倍、小至少约30倍、小至少约40倍、小至少约50倍或小至少约60倍,其中HC3与HC1、LC3与LC1、HC4与HC2以及LC4与LC2分别具有相同的氨基酸序列,并且使用夹心免疫测定法,将抗磷酸化ERK1/2抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的结合于非磷酸化和磷酸化ERK1/2的抗体用作检测抗体,在全细胞裂解物中测量ERK1/2的磷酸化。当通过 ERK1/2磷酸化的抑制来评估抑制时,与单特异性EGFR抗体和单特异性c- Met抗体的组合相比,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体提供EGFR和c-Met信号传导的协同性更明显的抑制。此类示例性的双特异性EGFR/c-Met 抗体是本发明的抗体EM1-mAb。

[0421] 如本文所用,“对照单特异性EGFR抗体”是指这样的抗体,其具有结合EGFR的第一Fab臂,该第一Fab臂在氨基酸序列方面与待测试的双特异性EGFR/c-Met抗体的结合EGFR的Fab臂相同,并且具有第二Fab 臂,该第二Fab臂是“惰性的”并且结合无关/不相关抗原人免疫缺陷病毒 (HIV)gp120。在待测试的双特异性EGFR/c-Met抗体中的结合EGFR的 Fab臂包含F405L替换的情形中,第二Fab臂包含具有SEQ ID NO:209序列的轻链和具有SEQ ID NO:198序列的重链。在待测试的双特异性EGFR/c-Met抗体中的结合EGFR的Fab臂包含K409R替换的情形中,第二 Fab臂包含具有SEQ ID NO:209序列的轻链和具有SEQ ID NO:197序列的重链。

[0422] 如本文所用,“对照单特异性c-Met抗体”是指这样的抗体,其具有结合c-Met的第一Fab臂,该第一Fab臂在氨基酸序列方面与待测试的双特异性EGFR/c-Met抗体的结合c-

Met的Fab臂相同，并且具有第二Fab臂，该第二Fab臂是“惰性的”并且结合无关/不相关抗原HIV gp120。在待测试的双特异性EGFR/c-Met抗体中的结合c-Met的Fab臂包含F405L替换的情形中，第二Fab臂包含具有SEQ ID NO:209序列的轻链和具有SEQ ID NO:198序列的重链。在待测试的双特异性EGFR/c-Met抗体中的结合c- Met的Fab臂包含K409R替换的情形中，第二惰性Fab臂包含具有SEQ ID NO:209序列的轻链和具有SEQ ID NO:197序列的重链。

[0423] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体以约2×10^{-9}M 或更小、约1×10^{-9}M或更小，或约1×10^{-10}M或更小的IC_{50}值抑制ERK1/2 的磷酸化。

[0424] 在本文所述的一些实施例中，ERK1在残基Thr202和Tyr204处被磷酸化，并且ERK2在残基Thr185和Tyr197处被磷酸化。

[0425] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体抑制NCI- H1975细胞系中蛋白激酶B(AKT)在Ser473处的磷酸化，并且与用包含 HC3和LC3的对照单价EGFR抗体以及包含HC4和LC4的对照单价c-Met 抗体的混合物抑制NCI-H1975细胞系中AKT在Ser473处的磷酸化的IC_{50}值相比，其IC_{50}值小至少约70倍，其中HC3与HC1、LC3与LC1、HC4 与HC2以及LC4与LC2分别具有相同的氨基酸序列，其中使用夹心免疫测定法，将结合于非磷酸化和磷酸化AKT的抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的抗磷酸化AKT Ser473抗体用作检测抗体，在全细胞裂解物中测量AKT在Ser473处的磷酸化。

[0426] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体抑制NCI- H1975细胞系中蛋白激酶B(AKT)在Thr308处的磷酸化，并且与用包含 HC3和LC3的对照单价EGFR抗体以及包含HC4和LC4的对照单价c-Met 抗体的混合物抑制NCI-H1975细胞系中AKT在Thr308处的磷酸化的IC_{50}值相比，其IC_{50}值小至少约100倍，其中HC3与HC1、LC3与LC1、HC4 与HC2以及LC4与LC2分别具有相同的氨基酸序列，其中使用夹心免疫测定法，将结合于非磷酸化和磷酸化AKT的抗体用作捕获抗体并将与电化学发光化合物缀合的抗磷酸化AKT Thr308抗体用作检测抗体，在全细胞裂解物中测量AKT在Thr308处的磷酸化。

[0427] 当通过AKT磷酸化的抑制来评估抑制时，与单特异性EGFR抗体和单特异性c-Met抗体的组合相比，本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体提供 EGFR和c-Met信号传导的协同性更明显的抑制。此类示例性的双特异性 EGFR/c-Met抗体是本发明的抗体EM1-mAb。

[0428] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体以约1×10^{-9}M 或更小的IC_{50}值抑制AKT在Ser473处或在Thr308处的磷酸化。

[0429] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体在EGFR残基K489、I491、K467和S492处结合SEQ ID NO:73的EGFR，并且在残基PEFRDSYPIKYVHAF(SEQ ID NO:238)和FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID NO:239)处结合c-Met。此类示例性的双特异性抗体是EM1-mAb。当与如上文和国际专利公布WO2010/115551中所述的抗体BSAB01 相比时，双特异性EM-1抗体在不同表位处结合EGFR和c-Met。BSAB01 的亲本EGFR结合臂(西妥昔单抗)结合成熟EGFR中的EGFR氨基酸残基R353、Q384、Q408、H409、F412、S418、S440、K443、K465、I467、S468和N473，对应于SEQ ID NO:73的全长EGFR的残基R367、Q408、 Q432、H433、F436、S442、S464、K467、K489、I491、S492和N497(Li 等人，Cancer Cell 7:301-311，2005)。BSAB01(mAb 5D5)的亲本c-Met 结合臂结合c-Met残基325-340PGAQLARQIGASLNDD(SEQ ID NO: 240)。EM1-mAb的结合EGFR的亲本抗体(2F8)的表位作图描述于美国专利公布US2011/0256142A1。西妥昔单抗和亲本2F8抗体结合部分重叠但不同的表位。

[0430] 可使用标准方法进行表位作图。例如，当两种各个组分的结构均已知时，可进行计算机芯片上的(in silico)蛋白质-蛋白质对接，以鉴定相互作用的相容位点。可使用抗原和抗体复合物进行氢-氘(H/D)交换以标测抗原上可能受到该抗体结合的区域。可使用抗原的片段和点诱变来定位对于抗体结合而言重要的氨基酸。

[0431] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体中和EGFR 和c-Met信号传导。

[0432] 与在不存在本发明的双特异性EGFR/c-Met分子的情况下使用相同测定法条件时信号传导的水平相比，本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可将 EGFR和c-Met信号传导中和至少30％、35％、40％、45％、50％、55％、 60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、 95％、96％、97％、98％、99％或100％。

[0433] 配体诸如EGF与EGFR的结合刺激受体二聚化、自磷酸化、受体的内部细胞质酪氨酸激酶域的激活，以及多个参与DNA合成(基因激活)和细胞周期进程或分裂的调控的信号转导和反式激活途径的引发。EGFR信号传导的中和可导致一个或多个EGFR下游信号传导途径受抑制，因此中和 EGFR可具有各种效应，包括细胞增殖和分化、血管生成、细胞运动和转移的抑制，以及下游信号传导途径的抑制。

[0434] EGFR信号传导及EGFR信号传导的中和可使用各种熟知的方法测量，例如测量受体在酪氨酸Y1068、Y1148和Y1173任一者处的自磷酸化 (Downward等人，Nature 311:483-5，1984)和/或天然或合成底物的磷酸化，以及本发明的双特异性抗体对天然或合成底物的自磷酸化和/或磷酸化的抑制。磷酸化可使用熟知的方法检测，诸如采用磷酸化酪氨酸特异性抗体的ELISA测定法或蛋白质印迹。示例性的测定法可见于Panek等人，J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44，1997和Batley等人，Life Sci 62:143- 50，1998并且如本文所述。

[0435] HGF与c-Met的结合刺激受体二聚化、自磷酸化、受体的细胞质酪氨酸激酶域的激活，以及多个参与DNA合成(基因激活)和细胞周期进程或分裂的调控的信号转导和反式激活途径的引发。c-Met信号传导的抑制可导致一个或多个c-Met下游信号传导途径受抑制，因此中和c-Met可具有各种效应，包括细胞增殖和分化、血管生成、细胞运动和转移的抑制。

[0436] c-Met信号传导及c-Met信号传导的中和可使用各种熟知的方法测量，例如测量受体在至少一个酪氨酸残基Y1230、Y1234、Y1235或Y1349上的自磷酸化和/或天然或合成底物的磷酸化。可例如在ELISA测定法中或在蛋白质印迹上使用对磷酸化酪氨酸具有特异性的抗体来检测磷酸化。示例性的测定法可见于Panek等人，J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44，1997和 Batley等人，Life Sci 62:143-50，1998并且如本文所述。

[0437] EGFR和c-Met信号传导可使用如本文所述的各种熟知方法测量，诸如测量ERK1/2和AKT磷酸化的抑制。在Thr202和Tyr204处的ERK1磷酸化及在Thr185和Tyr187处的ERK2磷酸化的抑制以及AKT在Ser473或 Thr308处的抑制可例如在NCI-H1975细胞裂解物中利用采用包被在固相载体上的捕获抗体和与电化学发光化合物诸如Meso Scale Discover(MSD) SULFO-TAG标签缀合的检测抗体的夹心测定法测量，然后用读板机检测信号。

[0438] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体抑制NCI- H292或NCI-H1975细胞的生长，并且当NCI-H292或NCI-H1975细胞在低附着条件下生长时，与用西妥昔单抗抑制NCI-H292或NCI-H1975细胞的生长的IC_{50}值相比，其IC_{50}值小至少约300倍、小至少约400倍、小至少约500倍、小至少约600倍、小至少约700倍或小至少约800倍。

[0439] 细胞生长的抑制可通过已知的方法评估。例如,可将细胞接种在涂布有水凝胶或仿生聚合物的平板(Corning制造的超低附着性平板(Ultra Low Attachment plate))中以防止或减少细胞附着,并且可在温育72小时后通过使用标准方法测量细胞活力百分比来评估抗体对7.5ng/mL HGF诱导的细胞生长的效应。

[0440] 与单特异性EGFR抗体和单特异性c-Met抗体的组合相比并与标准治疗西妥昔单抗相比,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体提供表达EGFR和 /或c-Met的癌细胞的协同性更明显的抑制。此类示例性的双特异性 EGFR/c-Met抗体是本发明的抗体EM1-mAb。本发明的双特异性EGFR/c- Met抗体抑制表达野生型EGFR和野生型c-Met的癌细胞,并且还抑制表达EGFR L858R/T790M突变体的癌细胞,该突变被鉴定为起到抵抗小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI)诸如吉非替尼治疗的作用。因此,与西妥昔单抗和 TKI相比,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可在更广泛患者群体中提供有益效果。

[0441] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体抑制SCID Beige小鼠中表达HGF的SKMES-1细胞瘤的生长,并且当双特异性抗体和西妥昔单抗以20mg/kg剂量施用时,与西妥昔单抗相比,在第36天,其 T/C百分比(%)值小至少500倍。

[0442] 使用SCID Beige小鼠的移植瘤模型是熟知的。可使用标准方法来工程改造SKMES-1细胞以表达人HGF。通常,SCID Beige小鼠可皮下接种表达人HGF的SKMES-1细胞,该细胞包埋于每只动物背侧的胞外基质诸如 Culturex中。植入后一周,小鼠可被分为具有相等瘤体积的组,之后以例如每周三次给予本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体、对照或基准抗体或小分子。可每周记录两次瘤体积,并且可通过计算T/C百分比(%)值来观察瘤生长抑制(TGI)。T/C%值指示抗瘤疗效。T和C分别是在给定天的处理组和对照组的平均体积。

[0443] 与标准治疗西妥昔单抗相比,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体提供在体内瘤杀伤方面显著改善的疗效,因此与西妥昔单抗相比,可在患者群体中提供有益效果。

[0444] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含IgG1、 IgG2、IgG3或IgG4同种型的HC1和HC2。

[0445] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含IgG1同种型的HC1和HC2。

[0446] 在本文所述的一些实施例中,当根据EU索引对残基进行编号时,在残基位置350、366、368、370、399、405、407或409处,双特异性 EGFR/c-Met抗体HC1 CH3包含至少一、二、三、四、五、六、七或八个替换,并且HC2 CH3包含至少一、二、三、四、五、六、七或八个替换。

[0447] 在本文所述的一些实施例中,当根据EU索引对残基进行编号时,在残基位置350、370、405或409处,双特异性EGFR/c-Met抗体HC1 CH3 包含至少一、二、三或四个替换,并且HC2 CH3包含至少一、二、三或四个替换。

[0448] 抗体域和编号是熟知的。当两个CH3域(或CH3区)彼此相差至少一个氨基酸替换时,它们不相同。IgG1 CH3区通常由IgG1上的第341-446 位残基组成(根据EU索引对残基进行编号)。示例性的IgG1恒定区以 SEQ ID NO:203示出。CH3域跨越SEQ ID NO:203的第224-329位残基,并且对应于根据EU索引的第341-446位残基。

[0449] 在本文所述的一些实施例中,当根据EU索引对残基进行编号时,在残基位置405或409处,双特异性EGFR/c-Met抗体HC1 CH3包含至少一个替换,并且HC2 CH3包含至少一个替换。

[0450] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体HC1 CH3包含K409R或F405L替换，并且HC2 CH3包含K409R或F405L替换，其中根据EU索引对残基进行编号。

[0451] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体HC1 CH3包含F405L替换，并且HC2 CH3包含K409R替换。

[0452] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3和HC2 CH3替换是在位置 366、368、370、399、405、407或409(根据EU索引进行编号)处的替换。这些位置分别对应于SEQ ID NO:203和204的重链恒定区中的线性残基位置248、250、252、281、287、289和291。

[0453] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3位置409具有除Lys、Leu或 Met之外的氨基酸替换，并且HC2 CH3位置405具有除Phe之外的氨基酸替换。

[0454] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3位置405具有除Phe之外的氨基酸替换，并且HC2 CH3位置409具有除Lys、Leu或Met之外的氨基酸替换。

[0455] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3位置409具有除Lys、Leu或 Met之外的氨基酸替换，并且HC2 CH3位置405具有除Phe、Arg或Gly之外的氨基酸替换。

[0456] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3位置405具有除Phe、Arg或 Gly之外的氨基酸替换，并且HC2 CH3位置409具有除Lys、Leu或Met之外的氨基酸替换。

[0457] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且HC2 CH3具有在位置405处的除Phe之外的氨基酸以及在位置409处的Lys。

[0458] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的除Phe之外的氨基酸以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置405处的 Phe以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0459] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且HC2 CH3具有在位置405处的除Phe、Arg或Gly之外的替换以及在位置409处的Lys。

[0460] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的除Phe、 Arg或Gly之外的替换以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0461] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且HC2 CH3具有在位置405处的Leu以及在位置409处的Lys。

[0462] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的Leu以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置 409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0463] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的Arg，并且HC2 CH3具有在位置405处的除Phe、Arg或 Gly之外的氨基酸以及在位置409处的Lys。

[0464] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置405处的除Phe、 Arg或Gly之外的氨基酸以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的Arg。

[0465] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的Arg,并且HC2 CH3具有在位置405处的Leu以及在位置 409处的Lys。

[0466] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置405处的Leu以及在位置409处的Lys,并且HC2 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置 409处的Arg。

[0467] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置409处的Lys,并且HC2 CH3具有在位置405处的Leu以及在位置 409处的Arg。

[0468] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置405处的Leu以及在位置409处的Arg,并且HC2 CH3具有在位置405处的Phe以及在位置 409处的Lys。

[0469] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸,并且HC2 CH3具有在位置409处的Lys、在位置370处的Thr以及在位置405处的Leu。

[0470] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的Lys、在位置370处的Thr以及在位置405处的Leu,并且HC2 CH3具有在位置 409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0471] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的Arg,并且HC2 CH3具有在位置409处的Lys、在位置370处的Thr以及在位置405 处的Leu。

[0472] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的Lys、在位置370处的Thr以及在位置405处的Leu,并且HC2 CH3具有在位置 409处的Arg。

[0473] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置370处的Lys、在位置405处的Phe以及在位置409处的Arg,并且HC2 CH3具有在位置 409处的Lys、在位置370处的Thr以及在位置405处的Leu。

[0474] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的Lys、在位置370处的Thr以及在位置405处的Leu,并且HC2 CH3具有在位置 370处的Lys、在位置405处的Phe以及在位置409处的Arg。

[0475] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸,并且HC2 CH3具有在位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸。

[0476] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸,并且HC2 CH3具有在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0477] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸,并且HC2 CH3具有在位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp。

[0478] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp,并且HC2 CH3具有在位置 409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0479] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸,并且HC2 CH3具有在位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp。

[0480] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp,并且HC2 CH3具有在位置409处的除Lys、Leu或 Met之外的氨基酸。

[0481] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸,并且HC2 CH3具有在位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、

Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸以及在位置409处的Lys。

[0482] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸以及在位置409 处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的除 Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0483] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且HC2 CH3具有在位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp以及在位置409处的Lys。

[0484] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的除Lys、Leu或 Met之外的氨基酸。

[0485] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且HC2 CH3具有在位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp以及在位置409处的Lys。

[0486] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0487] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的Arg，并且HC2 CH3具有在位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸以及在位置409处的 Lys。

[0488] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸以及在位置409 处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的 Arg。

[0489] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的Arg，并且HC2 CH3具有在位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp以及在位置409处的Lys。

[0490] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的Arg。

[0491] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的Arg，并且HC2 CH3具有在位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp以及在位置409处的Lys。

[0492] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp以及在位置409处的Lys，并且HC2 CH3具有在位置407处的Tyr以及在位置409处的Arg。

[0493] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且HC2 CH3具有(i)在位置368处的除 Phe、Leu和Met之外的氨基酸，或(ii)在位置370处的Trp，或(iii)在位置399处的除Asp、Cys、Pro、Glu或Gln之外的氨基酸。

[0494] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有(i)在位置368处的除 Phe、Leu和Met之外的氨基酸，或(ii)在位置370处的Trp，或(iii)在位置399处的除Asp、Cys、Pro、Glu或Gln之外的氨基酸，并且HC2 CH3 具有在位置409处的除Lys、Leu或Met之外的氨基酸。

[0495] 在本文所述的一些实施例中，HC1 CH3具有在位置409处的Arg、Ala、His或Gly，并

且HC2 CH3具有(i)在位置368处的Lys、Gln、 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、Val或Trp,或 (ii)在位置370处的Trp,或(iii)在位置399处的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、Arg或Tyr。

[0496] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有(i)在位置368处的 Lys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、Val或 Trp,或(ii)在位置370处的Trp,或(iii)在位置399处的Ala、Gly、 Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、Arg或Tyr,并且 HC2 CH3具有在位置409处的Arg、Ala、His或Gly。

[0497] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有在位置409处的Arg,并且HC2 CH3具有(i)在位置368处的Asp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、 Thr、Val或Trp,或(ii)在位置370处的Trp,或(iii)在位置399处的 Phe、His、Lys、Arg或Tyr。

[0498] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3具有(i)在位置368处的 Asp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、Val或Trp,或(ii)在位置370处的Trp,或(iii)在位置399处的Phe、His、Lys、Arg或Tyr,并且HC2 CH3具有在位置409处的Arg。

[0499] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3包含K409R替换或F405L替换,并且HC2 CH3包含K409R替换或F405L替换,其中根据EU索引对残基进行编号。

[0500] 在本文所述的一些实施例中,HC1 CH3包含F405L替换,并且HC2 CH3包含K409R替换。

[0501] 通常使用标准方法在DNA水平对分子诸如抗体的恒定域作出替换。

[0502] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含VH1和 VL1,其中

[0503] VH1包含分别为SEQ ID NO:210、211和212的重链互补决定区 (HCDR)1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3氨基酸序列;并且

[0504] VL1包含分别为SEQ ID NO:213、214和215的轻链互补决定区 (LCDR)1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3氨基酸序列。

[0505] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含VH2和 VL2,其中

[0506] VH2包含分别为SEQ ID NO:216、217和218的HCDR1、HCDR2和 HCDR3氨基酸序列;并且

[0507] VL2包含分别为SEQ ID NO:219、220和221的LCDR1、LCDR2和 LCDR3氨基酸序列。

[0508] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含分别为 SEQ ID NO:189、190、193和194的VH1、VL1、VH2和VL2氨基酸序列。

[0509] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含分别为 SEQ ID NO:199、200、201和202的HC1、LC1、HC2和LC2氨基酸序列,任选地从HC1、HC2、或HC1和HC2两者移除C-末端赖氨酸。

[0510] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含VH1和 VL1,其中

[0511] VH1包含分别为SEQ ID NO:222、223和224的HCDR1、HCDR2和 HCDR3氨基酸序列;并且

[0512] VL1包含分别为SEQ ID NO:225、226和227的LCDR1、LCDR2和 LCDR3氨基酸序列。

[0513] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体包含VH2和 VL2,其中

[0514] VH2包含分别为SEQ ID NO:228、229和230的HCDR1、HCDR2和 HCDR3氨基酸序列;并且

[0515] VL2包含分别为SEQ ID NO:231、232和233的LCDR1、LCDR2和 LCDR3氨基酸序列。

[0516] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体包含分别为 SEQ ID NO:191、192、195和196的VH1、VL1、VH2和VL2氨基酸序列。

[0517] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体包含分别为 SEQ ID NO:234、235、236和237的HC1、LC1、HC2和LC2氨基酸序列，任选地从HC1、HC2、或HC1和HC2两者移除C-末端赖氨酸。

[0518] 在本文所述的一些实施例中，在采用包被于平板上并且与或不与本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体一起温育的重组人EGFR或重组人c-Met胞外域的竞争测定法中，双特异性EGFR/c-Met抗体可以小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M、小于约1×10^{-10}M、小于约1×10^{-11}M或小于约1×10^{-12}M的 IC_{50}值阻碍EGF结合于EGFR以及HGF结合于c-Met。与在不存在本文所述本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体的情况下使用相同测定法条件时EGF 对EGFR的结合以及HGF对c-Met的结合相比，本文所述双特异性 EGFR/c-Met抗体可将EGF结合于EGFR以及HGF结合于c-Met阻碍至少 30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、 85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或 100％。

[0519] 在本文所述的一些实施例中，双特异性EGFR/c-Met抗体包含HC1、 LC1、HC2和LC2，其中HC1、LC1、HC2和LC2由分别包含SEQ ID NO: 205、206、207和208的序列的合成多核苷酸编码。

[0520] 本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可使用本文所述的技术生成，诸如利用CH3工程改造并使用体外Fab臂交换来生成抗体。示例性的双特异性抗体可通过如下方式由两种单特异性抗体生成：将约1-20mg/mL的每种抗体以1:1摩尔比组合在具有75mM的终浓度的2-巯基乙醇胺(2-MEA) 的缓冲液中的pH 7.0-7.4的PBS中，在25-37℃下温育2-6小时，然后经由透析、透滤、切向流过滤和旋转细胞过滤来移除2-MEA。双特异性抗体的收率可大于约80％、大于约90％、大于约91％、92％、93％、94％、95％、 96％、97％、98％或99％。

[0521] 本文所述的一些实施例提供制备分离的双特异性EGFR/c-Met抗体的方法，所述方法包括：

[0522] 将包含SEQ ID NO:199的两条重链和SEQ ID NO:200的两条轻链的分离的单特异性二价抗EGFR抗体与包含SEQ ID NO:201的两条重链和 SEQ ID NO:202的两条轻链的分离的单特异性二价抗c-Met抗体以约1:1摩尔比组合在混合物中；

[0523] 将还原剂引入混合物中；

[0524] 将混合物温育约九十分钟至约六小时；

[0525] 移除还原剂；以及

[0526] 纯化双特异性EGFR/c-Met抗体，该双特异性EGFR/c-Met抗体包含 SEQ ID NO:199的第一重链和SEQ ID NO:201的第二重链、SEQ ID NO: 200的第一轻链和SEQ ID NO:202的第二轻链，其中SEQ ID NO:199的第一重链与SEQ ID NO:200的第一轻链配对以形成特异性结合EGFR的第一结合域，并且SEQ ID NO:201的第二重链与SEQ ID NO:202的第二轻链配对以形成特异性结合c-Met的第二结合域。

[0527] 在本文所述的一些实施例中，还原剂是2-巯基乙醇胺(2-MEA)。

[0528] 在本文所述的一些实施例中，2-MEA以约25mM至约75mM的浓度存在。

[0529] 在本文所述的一些实施例中，温育步骤在约25℃至约37℃的温度下进行。

[0530] 本文所述的一些实施例提供分离的双特异性EGFR/-c-Met抗体,其包含HC1、LC1、HC2和LC2,其中HC1包含SEQ ID NO:199的序列,LC1 包含SEQ ID NO:200的序列,HC2包含SEQ ID NO:201的序列,并且 LC2包含SEQ ID NO:202的序列,其中HC1、LC1、HC2和/或LC2还包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸替换。

[0531] 本文所述的一些实施例提供分离的双特异性EGFR/-c-Met抗体,其包含HC1、LC1、HC2和LC2,其中HC1包含SEQ ID NO:234的序列,LC1 包含SEQ ID NO:235的序列,HC2包含SEQ ID NO:236的序列,并且 LC2包含SEQ ID NO:237的序列,其中HC1、LC1、HC2和/或LC2还包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸替换。

[0532] 其HC1、LC1、HC2和LC2氨基酸序列与本文所公开的那些抗体非实质性差异的双特异性EGFR/c-Met抗体涵盖在本发明的范围内。通常,这涉及采用在抗原结合位点或框架中具有类似电荷、疏水或立体化学特性的氨基酸的一个或多个保守氨基酸替换,而不会不利地改变抗体的性质。也可作出保守替换以改善抗体性质,例如稳定性或亲和力。可例如对VH1、 VL1、VH2和/或VL2作出1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、 13、14或15个氨基酸替换。例如,“保守氨基酸替换”可涉及天然氨基酸残基受到非天然残基的替换,从而使该位置的氨基酸残基的极性或电荷几乎无影响或无影响。此外,多肽中的任何天然残基还可以用丙氨酸来替换,如此前对于丙氨酸扫描诱变所述(MacLennan等人,Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67,1998;Sasaki等人,Adv Biophys 35:1-24,1998)。所期望的氨基酸替换可由本领域的技术人员在需要此类替换时来决定。例如,可使用氨基酸替换来鉴定分子序列的重要残基,或用于提高或降低本文所述分子的亲和性。示例性的保守氨基酸替换在上文描述。

[0533] 氨基酸替换可例如通过PCR诱变来进行(美国专利4,683,195)。变体的文库可使用熟知的方法生成,例如使用随机(NNK)或非随机密码子,例如DVK密码子,其编码11个氨基酸(Ala、Cys、Asp、Glu、Gly、 Lys、Asn、Arg、Ser、Tyr、Trp),并且筛选文库中具有所需性质的变体。

[0534] 在本文所述的一些实施例中,可对抗体的恒定区作出氨基酸替换。例如,可在本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体中使用不同的IgG1同种异型,诸如熟知的G1m17同种异型、G1m3同种异型或G1m1同种异型,或它们的组合。

[0535] 在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体的药代动力学性质可通过Fc域中调节抗体半衰期的替换来增强。在本文所述的一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体在HC1和/或HC2中包含替换 M252Y/S254T/T256E,其中根据EU索引对残基进行编号。M252Y/S254T/T256E替换已示出延长抗体半衰期(Dall'Acqua等人,J Biol Chem 281:23514-24,2006)。

[0536] 使用本文所述的方法,测试在其Fc区中具有保守替换和/或另外的替换的双特异性EGFR/c-Met抗体的特性。

[0537] 在本文所述的某个实施例中,可通过本领域技术人员已知的技术进行的Fc修饰来增强或沉默双特异性EGFR/c-Met抗体的免疫效应子性质。例如,Fc效应子功能诸如C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP)、细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等,可通过修饰促成这些活性的Fc中的残基来提供和/或控制。

[0538] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达Fc受

体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并且随后引起靶细胞的裂解。

[0539] 单克隆抗体诱导ADCC的能力可通过工程改造其寡糖组分来增强。用熟知的二天线G0、G0F、G1、G1F、G2或G2F形式的大多数聚糖在 Asn297处对人IgG1或IgG3进行N-糖基化。由非工程改造的CHO细胞所产生的抗体通常具有约至少85%的聚糖岩藻糖含量。核心岩藻糖从连接到 Fc区的二天线复合物型寡糖的移除经由改善的FcγRIIIa结合来增强抗体的ADCC,而不改变抗原结合或CDC活性。此类mAb可使用据报道引起具有二天线复合物型Fc寡糖的相对较高去岩藻糖基化抗体的成功表达的不同方法实现,诸如培养渗透压度的控制(Konno等人,Cytotechnology 64(:249- 65,2012)、变体CHO系Lec13作为宿主细胞系的应用(Shields等人,J Biol Chem 277:26733-26740,2002)、变体CHO系EB66作为宿主细胞系的应用(Olivier等人,MAbs;2(4),2010;刊载之前的电子版; PMID:20562582)、大鼠杂交瘤细胞系YB2/0作为宿主细胞系的应用 (Shinkawa等人,J Biol Chem 278:3466-3473,2003)、特异性针对α1,6- 岩藻糖基转移酶(FUT8)基因的小干扰RNA的引入(Mori等人,Biotechnol Bioeng 88:901-908,2004)或β-1,4-N-乙酰葡糖胺基转移酶III和高尔基体α-甘露糖苷酶II或强效α-甘露糖苷酶I抑制剂几夫碱的共表达 (Ferrara等人,J Biol Chem 281:5032-5036,2006,Ferrara等人, Biotechnol Bioeng 93:851-861,2006;Xhou等人,Biotechnol Bioeng 99:652- 65,2008)。

[0540] 在本文所述的一些实施例中,由双特异性EGFR/c-Met抗体引起的 ADCC也可通过抗体Fc中的某些替换来增强。示例性的替换是例如在氨基酸位置256、290、298、312、356、330、333、334、360、378或430(根据EU索引对残基进行编号)处的替换,如美国专利US6737056中所述。

[0541] 在本文所述的一些实施例中,本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体具有岩藻糖含量约在1%至约15%之间,例如15%、14%、13%、12%、11% 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的二天线聚糖结构。在一些实施例中,双特异性EGFR/c-Met抗体具有岩藻糖含量为约50%、 40%、45%、40%、35%、30%、25%或20%的聚糖结构。

[0542] “岩藻糖含量”意指在Asn297处的糖链内的岩藻糖单糖的量。岩藻糖的相对量是与所有糖基化结构相关的含岩藻糖的结构的百分比。这些可通过多种方法来表征和定量,例如:1)使用N-糖苷酶F处理的样品(例如,复合甘露糖、杂合甘露糖和寡聚甘露糖及高甘露糖结构)的MALDI-TOF,如国际专利公布WO2008/0775462所述;2)Asn297聚糖的酶促释放,随后通过带荧光检测的HPLC(UPLC)和/或HPLC-MS(UPLC-MS)衍生化和检测/定量;3)在用Endo S或其他酶处理或不处理Asn297聚糖的情况下天然或还原mAb的完整蛋白分析,该Endo S或其他酶在第一与第二 GlcNAc单糖之间切割,使岩藻糖连接到第一GlcNAc;4)通过酶消化(胰蛋白酶或肽链内切酶Lys-C)将mAb消化为成分肽,随后通过HPLC-MS (UPLC-MS)分离、检测和定量;5)使用PNG酶F通过在Asn 297处的特异性酶促去糖基化将mAb寡糖从mAb蛋白质分离。由此释放的寡糖可标记有荧光团,并通过各种配套技术分离和鉴定,这些技术允许:采用基质辅助激光解吸电离(MALDI)质谱通过实验质量与理论质量的比较而对聚糖结构进行精细表征,通过离子交换HPLC(GlycoSep C)来测定唾液酸化的程度,通过正相HPLC(GlycoSep N)根据亲水性标准来分离和定量寡糖形式,以及通过高效毛细管电泳-激光诱导荧光(HPCE-LIF)来分离和定量寡糖。

[0543] 如本申请中所用,“低岩藻糖”或“低岩藻糖含量”是指岩藻糖含量为约1%-15%之间的抗体。

[0544] 如本文所用,“正常岩藻糖”或“正常岩藻糖含量”是指岩藻糖含量为约超过50%、通常约超过80%或超过85%的抗体。

[0545] 本发明的一些实施例提供编码如本文所述的本发明双特异性EGFR/c- Met结合抗体的重链和轻链的合成核酸,作为分离的多核苷酸或作为表达载体的部分或作为线性DNA序列的部分,包括用于体外转录/翻译的线性 DNA序列、与其组合物或定向诱变剂的原核、真核或丝状噬菌体表达、分泌和/或展示相容的载体。

[0546] 本发明的一些实施例提供分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:205、206、207或208的多核苷酸序列。

[0547] 本发明的多核苷酸可以通过化学合成(诸如在自动化多核苷酸合成仪上的固相多核苷酸合成)来制备,并装配成完整的单链或双链分子。另选地,本发明的多核苷酸可以通过其他技术来制备,诸如PCR之后进行常规克隆。制备或获得具有给定的已知序列的多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0548] 本发明的多核苷酸可包含至少一个非编码序列,诸如启动子或增强子序列、内含子、聚腺苷酸化信号、促进RepA结合的顺式序列等。多核苷酸序列还可包含编码另外的氨基酸的另外序列,其编码例如标记或标签序列,诸如组氨酸标签或HA标签以促进蛋白质的纯化或检测;信号序列;融合蛋白伴侣诸如RepA、Fc;或噬菌体外壳蛋白诸如pIX或pIII。

[0549] 本文所述的一些实施例提供包含本发明的多核苷酸的载体。此类载体可以是质粒载体、病毒载体、杆状病毒表达载体、基于转座子的载体或任何其他适用于通过任何手段将本发明的多核苷酸引入给定生物体或遗传背景的载体。例如,可将编码本发明双特异性抗体的重链和轻链的多核苷酸插入表达载体中。轻链和重链可克隆在相同或不同的表达载体中。可将编码免疫球蛋白链的DNA片段操作地连接到确保免疫球蛋白多肽表达的一个或多个表达载体中的控制序列。此类控制序列包括信号序列、启动子(例如,天然相关或异源启动子)、增强子元件和转录终止序列,并且可被选择为与选择用于表达抗体的宿主细胞相容。一旦载体已掺入到适当宿主中,则宿主可在适于由所掺入的合成多核苷酸编码的蛋白质的高水平表达的条件下维持。

[0550] 合适的表达载体通常可在宿主生物体中作为附加体或作为宿主染色体 DNA的组成部分进行复制。一般来讲,表达载体包含选择标记,诸如氨比西林抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性或新霉素抗性,以允许检测被所需DNA序列转化的那些细胞。

[0551] 本文所述的一些实施例提供包含本发明的载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”是指其中引入了载体的细胞。应当理解,术语宿主细胞旨在不仅指特定对象细胞,而且指此种细胞的后代。由于后续世代中可能因突变或环境影响而出现某些修饰,此类后代可能不同于亲本细胞,但仍然包括在如本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。此类宿主细胞可以是真核细胞、原核细胞、植物细胞或古菌细胞。

[0552] 示例性的真核细胞可以是哺乳动物、昆虫、禽类或其他动物来源。哺乳动物真核细胞包括永生化细胞系,例如杂交瘤或骨髓瘤细胞系,例如SP2/0(American Type Culture Collection(ATCC),Manassas,VA,CRL- 1581)、NS0(European Collection ofCell Cultures(ECACC),Salisbury, Wiltshire,UK,ECACC编号85110503)、FO(ATCC CRL-1646)

和 Ag653(ATCC CRL-1580)鼠细胞系。示例性人骨髓瘤细胞系是U266 (ATTC CRL-TIB-196)。其他可用的细胞系包括来源于中国仓鼠卵巢 (CHO)细胞的那些细胞系,诸如CHO-K1SV(Lonza Biologics, Walkersville,MD)、CHO-K1(ATCC CRL-61)或DG44。

[0553] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、双特异性EGFR/-c-Met抗体以及结合EGFR或结合c-Met的FN3域的用途

[0554] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的 FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR-c-Met抗体可用于诊断、监测、调节、治疗、缓解、帮助预防发生细胞、组织、器官、流体或通常宿主中的人疾病或特定病变或者减轻其症状。本发明的方法可用于治疗属于任何分类的动物患者。此类动物的例子包括哺乳动物,诸如人类、啮齿类、犬类、猫类和农畜/家畜。

[0555] 本发明的一个方面是用于抑制表达EGFR和/或c-Met的细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括使细胞与本发明的分离的包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体接触。

[0556] 本发明的另一个方面是用于抑制受检者中表达EGFR和/或c-Met的瘤或癌细胞的生长或转移的方法,所述方法包括向受检者施用有效量的本发明的分离的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的FN3 域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体,使得表达EGFR和 /或c-Met的瘤或癌细胞的生长或转移被抑制。

[0557] 本发明的另一个方面是治疗患有癌的受检者的方法,所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的分离的本发明的包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体足以治疗癌的时间。

[0558] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的 FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体,可用于治疗特征在于EGFR、c-Met、EGF、可溶性EGFR、可溶性c-Met或其他EGFR配体或HGF的异常激活或产生的任何疾病或失调,或与EGFR或c-Met表达相关的失调,其可能涉及或可能不涉及恶性化或癌,其中EGFR、c-Met、 EGF或其他EGFR配体或HGF的异常激活和/或产生会在患有或易患疾病或失调的受检者的细胞或组织中发生。

[0559] 本发明的特异性结合c-Met并阻碍HGF结合于c-Met的FN3域可用于治疗瘤,包括癌和良性瘤。适于通过本发明的结合c-Met的FN3域来治疗的癌包括过表达c-Met的那些癌。适于通过本发明的FN3域来治疗的示例性癌包括上皮细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠直肠癌、肛门癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、胃癌、卵巢癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、食道癌、阴道癌、宫颈癌、脾癌、睾丸癌和胸腺癌。

[0560] 本发明的特异性结合EGFR并阻碍EGF结合于EGFR的FN3域可用于治疗瘤,包括癌和良性瘤。适于通过本发明的FN3域来治疗的癌包括过表达EGFR或变体的那些癌。适于通过本发明的FN3域来治疗的示例性癌包括上皮细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠直肠癌、肛门癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、食道癌、阴道癌、宫颈癌、脾癌、睾丸癌和胸腺癌。本发明的包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子或双特异性EGFR/c-Met抗体可用于治疗瘤,包括癌和良性瘤。适于通过本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子或双特异性EGFR/c-Met抗体来治疗的示例性癌包括过表达EGFR和/或c-Met的那些癌,与提高的EGFR活性和/或表达水平(诸如,EGFR激活突变、EGFR基因扩增,或配

体介导的EGFR激活)和提高的c-Met活性和/ 或表达水平(诸如,c-Met激活突变、c-Met基因扩增,或HGF介导的c- Met激活)相关的癌。

[0561] 可能与癌相关的示例性EGFR激活突变包括点突变、缺失突变、插入突变、倒位或基因扩增,它们引起EGFR的至少一种生物活性的提高,诸如提高的酪氨酸激酶活性、受体同源二聚体和异源二聚体的形成、增强的配体结合等。突变可位于EGFR基因的任何部分或与EGFR基因相关的调控区中,并且包括第18、19、20或21位外显子中的突变或激酶域中的突变。示例性的激活EGFR突变是G719A、L861X(X为任何氨基酸)、 L858R、E746K、L747S、E749Q、A750P、A755V、V765M、L858P或 T790M替换,E746-A750的缺失,R748-P753的缺失,Ala在M766与A767 之间的插入,SVA(Ser,Val,Ala)在S768与V769之间的插入,以及 NS(Asn,Ser)在P772与H773之间的插入。EGFR激活突变的其他例子是本领域已知的(参见例如美国专利公布US2005/0272083)。关于EGFR 和其他ErbB受体的信息(包括受体同源二聚体和异源二聚体、受体配体、自磷酸化位点以及参与ErbB介导的信号传导的信号传导分子)是本领域已知的(参见例如Hynes和Lane,Nature Reviews Cancer 5:341-354, 2005)。

[0562] 示例性的c-Met激活突变包括点突变、缺失突变、插入突变、倒位或基因扩增,它们引起c-Met蛋白质的至少一种生物活性的提高,诸如提高的酪氨酸激酶活性、受体同源二聚体和异源二聚体的形成、增强的配体结合等。突变可位于c-Met基因的任何部分或与该基因相关的调控区中,诸如c-Met的激酶域中的突变。示例性的c-Met激活突变是在残基位置N375、V13、V923、R175、V136、L229、S323、R988、S1058/T1010和 E168处的突变。用于检测EGFR和c-Met突变或基因扩增的方法是熟知的。

[0563] 适于通过本发明的双特异性分子诸如本发明的双特异性EGFR/c-Met 抗体来治疗的示例性癌,包括上皮细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、小细胞肺癌、结肠直肠癌、肛门癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、咽癌、鼻癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、舌癌、食道癌、阴道癌、宫颈癌、脾癌、睾丸癌、胃癌、胸腺癌、结肠癌、甲状腺癌、肝癌(肝细胞癌(HCC))、或散发性或遗传性乳头状肾细胞癌(PRCC)。

[0564] 本发明的另一个方面是治疗患有癌的受检者的方法,所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的分离的本发明的双特异性EGFR/c-Met 抗体足以治疗癌的时间,其中受检者对于CD16的位置158处的苯丙氨酸是纯合的(FcγRIIIa-158F/F基因型)或对于CD16的位置158处的缬氨酸和苯丙氨酸是杂合的(FcγRIIIa-158F/V基因型)。CD16又称为Fcγ受体IIIa (FcγRIIIa)或低亲和力免疫球蛋白γFc区受体III-A同种型。在FcγRIIIa 蛋白质残基位置158处的缬氨酸/苯丙氨酸(V/F)多态性已显示出能影响 FcγRIIIa对人IgG的亲和力。具有FcγRIIIa-158F/F或FcγRIIIa-158F/V多态性的受体展示出与FcγRIIIa-158V/V相比减少的Fc接合以及因此减少的ADCC。人N-连接寡糖上不含岩藻糖或含少量岩藻糖改善了抗体诱导 ADCC的能力,这是由于抗体对人FcγRIIIa(CD16)的结合得以改善 (Shields等人,J Biol Chem 277:26733-40,2002)。本发明的抗体具有减少的在1%至约10%之间的岩藻糖含量。在一些实施例中,双特异性 EGFR/c-Met抗体具有岩藻糖含量为约50%、40%、45%、40%、35%、 30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的聚糖结构。因此,本发明的抗体可能在治疗具有FcγRIIIa-158F/F或 FcγRIIIa-158F/V基因型的患者方面更有效。可使用常规方法分析患者的 FcγRIIIa多态性。

[0565] 在本文所述的一些方法中,本发明的抗体可用于治疗患有癌的受检者,该癌抵抗

一种或多种EGFR抑制剂的治疗或者已获得对一种或多种 EGFR抑制剂的治疗的抗性。癌可能获得对其的抗性的示例性EGFR抑制剂是抗EGFR抗体，即西妥昔单抗（Erbitux®）、帕尼单抗（Vectibix®）、马妥珠单抗、尼妥珠单抗；小分子EGFR抑制剂，即Tarceva®（厄洛替尼）、IRESSA（吉非替尼）、EKB-569（培利替尼，不可逆EGFR TKI）、pan-ErbB；以及其他受体酪氨酸激酶抑制剂，即拉帕替尼（EGFR 和HER2抑制剂）、培利替尼（EGFR和HER2抑制剂）、凡德他尼 （ZD6474、ZACTIMA™、EGFR、VEGFR2和RET TKI）、PF00299804 （达克替尼，不可逆pan-ErbB TKI）、CI-1033（不可逆pan-erbB TKI）、阿法替尼（BIBW2992，不可逆pan-ErbB TKI）、AV-412（双重EGFR和 ErbB2抑制剂）、EXEL-7647（EGFR、ErbB2、GEVGR和EphB4抑制剂）、CO-1686（不可逆突变体-选择性EGFR TKI）、AZD9291（不可逆突变体-选择性EGFR TKI）以及HKI-272（来那替尼，不可逆EGFR/ErbB2 抑制剂）。本文所述的方法可用于治疗抵抗吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、CO-1686、AZD9291和/或西妥昔单抗治疗的癌。可使用的示例性抗体是EM1-mAb。

[0566] 本发明的另一个方面是治疗患有癌的受检者的方法，所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的分离的本发明的双特异性EGFR/c-Met 抗体足以治疗癌的时间，其中该受检者抵抗厄洛替尼、吉非替尼、阿法替尼、CO-1686、AZD9291或西妥昔单抗治疗，或已获得对治疗的抗性。

[0567] 各种定性和/或定量方法可用于确定受检者是否抵抗EGFR抑制剂治疗，形成对EGFR抑制剂治疗的抗性或易于形成对EGFR抑制剂治疗的抗性。可能与对EGFR抑制剂的抗性相关的症状包括例如患者健康状况的下降或平稳、瘤尺寸的增加、瘤生长的下降停滞或变缓，和/或体内的癌细胞从一个位置向其他器官、组织或细胞的扩散。与癌相关的各种症状的重建或恶化也可指示受检者已形成或易于形成对EGFR抑制剂的抗性，诸如厌食、认知功能障碍、抑郁、呼吸困难、疲乏、激素紊乱、中性粒细胞减少、疼痛、周围神经病变和性功能障碍。与癌相关的症状可根据癌的类型而变化。例如，与宫颈癌相关的症状可包括异常出血、不寻常白带过多、与正常月经周期不相关的骨盆疼痛、膀胱疼痛或排尿时疼痛，以及规律月经期之间、性交、冲洗或骨盆检查后的出血。与肺癌相关的症状可包括持续性咳嗽、咳血、呼吸短促、哮喘性胸痛、食欲不振，在没有刻意情况下的体重减轻以及疲乏。肝癌的症状可包括食欲不振及体重减轻、腹痛（尤其是可延伸到背部和肩部中的腹部右上部）、恶心与呕吐、全身无力与疲乏、肝肿大、腹部肿胀（腹水）以及皮肤和眼白发黄（黄疸）。肿瘤学方面的技术人员可易于鉴定与特定癌类型相关的症状。

[0568] 用于确定受检者是否形成对EGFR抑制剂的抗性的其他方式包括检查癌细胞中的EGFR磷酸化、ERK1/2磷酸化和/或AKT磷酸化，其中增加的磷酸化可指示受检者已形成或易于形成对EGFR抑制剂的抗性。测定 EGFR、ERK1/2和/或AKT磷酸化的方法是熟知的并且在本文中描述。已形成对EGFR抑制剂的抗性的受检者的鉴定可涉及检测升高的c-Met表达水平或提高的c-Met活性，例如由升高水平的循环HGF、c-Met基因的激活突变或c-Met基因扩增引起。

[0569] 本发明的另一个实施例是治疗患者中的NSCLC的方法，该患者具有带有激活EGFR突变或EGFR基因扩增的NSCLC瘤或瘤转移，该方法包括向患者施用治疗有效量的本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体。

[0570] 本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可用于治疗非小细胞肺癌 (NSCLC),其包括鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌。在一些实施例中, NSCLC的细胞具有上皮表型。在一些实施例中,NSCLC已获得对一种或多种EGFR抑制剂治疗的抗性。

[0571] 在NSCLC中,EGFR基因中的特定突变与对EGFR酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI)的高响应率(70-80%)相关。EGFR中的第19位外显子的5 氨基酸缺失或点突变L858R与EGFR-TKI敏感性相关(Nakata和Gotoh, Expert Opin Ther Targets 16:771-781,2012)。这些突变导致EGFR激酶活性的非配体依赖性激活。激活EGFR突变在10-30%的NSCLC患者中发生,并且在东亚人、女性、从未吸烟者以及具有腺癌组织学的患者中明显更常见(Janne和Johnson,Clin Cancer Res 12(14增刊):4416s-4420s, 2006)。EGFR基因扩增也与EGFR-TKI治疗后的响应强烈相关(Cappuzzo 等人,J Natl Cancer Inst 97:643-55,2005)。

[0572] 虽然具有EGFR突变的大多数NSCLC患者最初响应于EGFR TKI疗法,但几乎所有患者都获得防止持久响应的抗性。由于EGFR的激酶域中的第二位点点突变(T790M),50-60%的患者获得抗性。抵抗EGFR酪氨酸激酶抑制剂的所有瘤中的将近60%增加c-Met表达、扩增c-Met基因或增加其唯一已知配体HGF(Turke等人,Cancer Cell,17:77-88,2010)。

[0573] 本发明的另外实施例是治疗患有癌的患者的方法,所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体足以治疗癌的时间,其中癌与EGFR激活突变、EGFR基因扩增、升高水平的循环HGF、c-Met激活突变、c-Met基因扩增或突变体KRAS相关。

[0574] 在一些实施例中,EGFR激活突变是G719A、G719X(X为任何氨基酸)、L861X(X为任何氨基酸)、L858R、E746K、L747S、E749Q、 A750P、A755V、V765M、L858P或T790M替换,E746-A750的缺失, R748-P753的缺失,Ala(A)在M766与A767之间的插入,Ser、Val和 Ala(SVA)在S768与V769之间的插入,以及Asn和Ser(NS)在P772 与H773之间的插入。

[0575] 本发明的另外实施例是治疗患有癌的患者的方法,所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体足以治疗癌的时间,其中癌与EGFR突变L858R、T790M或残基E746-A750的缺失(del(E746,A750))、EGFR扩增或c-Met扩增相关。

[0576] 在一些实施例中,癌与野生型EGFR和野生型c-Met相关。

[0577] 在一些实施例中,癌与野生型EGFR和c-Met扩增相关。

[0578] 在一些实施例中,癌与EGFR L858R和T790M突变及野生型c-Met相关。

[0579] 在一些实施例中,癌与EGFR缺失del(E764,A750)和野生型c-Met 相关。

[0580] 在一些实施例中,癌与EGFR缺失del(E764,A750)和c-Met扩增相关。

[0581] 在一些实施例中,癌与EGFR缺失del(E764,A750)、EGFR扩增和 c-Met扩增相关。

[0582] 在一些实施例中,患者患有与EGFR L858R和T790M突变及野生型c- Met相关的NSCLC。

[0583] 在一些实施例中,患者患有与EGFR扩增和野生型c-Met相关的 NSCLC。

[0584] 在一些实施例中,患者患有与EGFR扩增和c-Met扩增相关的 NSCLC。

[0585] 在一些实施例中,患者患有与EGFR缺失del(E764,A750)和野生型c-Met相关的NSCLC。

[0586] 在一些实施例中,患者患有与EGFR缺失del(E764,A750)和c-Met 扩增相关的

NSCLC。

[0587] 在一些实施例中，患者用本发明的EM1-mAb来治疗。当瘤与 L858R、T790M、del(E746,A750)EGFR、EGFR扩增、野生型c-Met和/ 或c-Met扩增相关时，本发明的EM1-mAb在体内瘤动物模型中显示疗效。EGFR或c-Met的扩增可通过标准方法评价，例如通过DNA印迹、FISH或比较基因组杂交(CGH)测定EGFR或c-Met基因的拷贝数。

[0588] 本发明的另外实施例是治疗患有癌的患者的方法，所述方法包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体足以治疗癌的时间，其中癌与EGFR突变L858R、T790M或残基E746-A750的缺失(del(E746,A750))、EGFR扩增或c-Met扩增或突变体KRAS相关。

[0589] 在一些实施例中，突变体KRAS具有G12V替换。KRAS属于编码鸟苷三磷酸酶(GTP酶)的RAS原癌基因的家族，并且介导受体下游的 EGFR信号转导。因此预计具有原癌KRAS突变诸如激活G12V或G12C突变的瘤不能通过EGFR抗体来治疗。采用抗EGFR抗体西妥昔单抗或帕尼单抗的临床研究证实，患有KRAS介导的结肠直肠瘤的患者不响应于这些药剂(Van Cutsem等人,N Eng J Med 360:1408-1417,2009;Lievre等人, J Clin Oncol 26:374-379,2008;Amado等人,J Clin Oncol 26:1626-1634m 2008)。本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体介导经由有效ADCC的 KRAS突变体细胞系杀伤，因此与当前的抗EGFR疗法相反，可有效治疗癌与KRAS激活突变相关的患者。此类示例性的抗体是EM1-mAb。

[0590] 术语“治疗”或“处理”是指治疗处理和预防或防御措施，其中目标是防止或减缓(减轻)非期望的生理变化或失调，诸如癌的发展或扩散。对于本发明而言，有利或所需的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度的削弱、疾病的稳定(即，未恶化)状态、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和，以及缓解(不论是部分缓解还是完全缓解)，而不论是可检测的或是不可检测的。“治疗”也可意指与未接受治疗时的预期生存期相比生存期延长。需要治疗的个体包括已患有病症或失调的个体以及易患病症或失调的个体或者要预防病症或失调的个体。

[0591] “治疗有效量”指在所需剂量和时间段有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量的本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可根据多种因素变化，诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及本发明的双特异性EGFR/c- Met抗体引起个体中的所需响应的能力。在与抗性的关联方面可降低或减少的有效EGFR/c-Met治疗剂的示例性指标包括例如改善的患者健康状况、瘤尺寸的减小或缩小、瘤生长停滞或减缓，和/或不存在癌细胞向体内其他位置的转移。

[0592] 施用/药物组合物

[0593] 本发明提供包含本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。就治疗用途而言，可将本发明的包含双特异性 EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体制备为药物组合物，该药物组合物包含药学上可接受的载体中的有效量的域、分子或抗体作为活性成分。术语“载体”是指活性化合物与其一起施用的稀释剂、辅助剂、赋形剂或媒介物。此类媒介物可以是液体，例如水和油，包括那些来源于石油、动物、植物的油或合成的油，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。例如，可使用0.4％盐水溶液和0.3％甘氨酸。这些溶液是无菌的，并且通常不含颗粒物。它们可通过常规的已知的灭菌技术(例如过滤)进行灭菌。组合物可根据需要含

有药学上可接受的辅助物质，以接近生理条件，例如pH调节剂和缓冲剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂等。在此类药物制剂中本发明的分子或抗体的浓度可广泛改变，即从按重量计小于约0.5％，通常为或至少约 1％到多达15或20％，并且将根据所选择的具体施用方式，主要基于所需剂量、流体体积、粘度等进行选择。包含其它人蛋白如人血清白蛋白在内的合适的媒介物和制剂描述在例如，Remington:The Science and Practice of Pharmacy，第21版，Troy，D.B.编辑，Lipincott Williams and Wilkins，Philadelphia，PA 2006，第5部分，Pharmaceutical Manufacturing第691- 1092页，特别参见第958-989页。

[0594] 用于本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR 的FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体的治疗用途的施用方式可以是将药剂递送至宿主的任何合适的途径，诸如肠胃外施用，例如，真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内或皮下、肺部；经粘膜(口腔、鼻内、阴道内、直肠)；使用在片剂、胶囊、溶液、粉末、凝胶、颗粒中的制剂；以及包含在注射器、植入装置、渗透泵、盒、微型泵中的制剂；或技术人员所理解的本领域熟知的其它方式。可通过例如以下方式实现位点特异性施用：胃肠外、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心脏内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、血管内、膀胱内、病灶内、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮递送。

[0595] 因此，可将用于肌内注射的本发明药物组合物制备成包含1ml的无菌缓冲水，及约1ng至约100mg/kg之间，例如约50ng至约30mg/kg或更优选地约5mg至约25mg/kg的本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的FN3域或结合c-Met的FN3域。

[0596] 本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体可通过任何合适的途径施用给患者，例如通过静脉内(IV)输注或弹丸式注射、肌内注射或皮下注射或腹膜内注射以肠胃外方式施用。可给予IV输注少至15分钟，但更常为30分钟、60分钟、90分钟或甚至2或3小时。也可将本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体直接注射到病变部位(例如，瘤自身)。给予患有癌的患者的剂量足以缓解或至少部分地抑制正治疗的疾病(“治疗有效量”)，并且有时可为0.1至10mg/kg体重，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或 10mg/kg，但可甚至更高，例如15、20、30、40、50、60、70、80、90或 100mg/kg。也可给予固定的单位剂量，例如50、100、200、500或 1000mg，或剂量可基于患者的表面积，例如400、300、250、200或 100mg/m^2。通常可施用1至8剂量(例如，1、2、3、4、5、6、7或8)以治疗癌，但可给予10、12、20或更多剂量。可在一天、两天、三天、四天、五天、六天、一周、两周、三周、一个月、五周、六周、七周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间后重复本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体的施用。重复疗程也是可能的，长期施用同样可能。重复施用可采用相同剂量或采用不同剂量。

[0597] 例如，可将用于静脉内输注的包含本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体的药物组合物制备成包含约200ml的无菌林格氏溶液，及约8mg至约 2400mg、约400mg至约1600mg或约400mg至约800mg的双特异性 EGFR/c-Met抗体以便施用给80kg患者。用于制备可肠胃外施用的组合物的方法是众所周知的，并且更详细地描述在，例如，“Remington’s Pharmaceutical Science”，第15版，Mack Publishing Company，Easton，PA。

[0598] 可将本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR 的FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体冻干保存，并且在使用前在合适载体中重构。已证实此技术对常规蛋白制备有效，并且可以采用熟知的冻干法和重构技术。

[0599] 本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR的 FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体可联合第二治疗剂同时地、顺序地或单独地施用。第二治疗剂可为化学治疗剂或靶向抗癌疗法。

[0600] 双特异性EGFR/c-Met抗体可连同本领域技术人员已知的化学治疗药或其他抗癌治疗剂中的任何一者或多者一起施用。化学治疗剂是可用于治疗癌的化合物，并且包括生长抑制剂或其他细胞毒素剂，并且包括烷化剂、抗代谢药、抗微管抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、受体酪氨酸激酶抑制剂、血管生成抑制剂等。化学治疗剂的例子包括烷化剂，诸如噻替哌和环磷酰胺(CYTOXAN®)；烷基磺酸酯，诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡；氮丙啶类，诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌 (meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa)；乙撑亚胺和甲基蜜胺，包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺；氮芥，诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、松龙苯芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥；亚硝基脲，诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；抗生素，诸如阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、加利车霉素、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红菌素、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星；抗代谢药，诸如甲氨蝶呤和5-FU；叶酸类似物，诸如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷；雄激素类，诸如二甲睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯；抗肾上腺类，诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，诸如亚叶酸；醋葡醛内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；安吖啶；bestrabucil；比生群；依达曲沙(edatraxate)；地磷酰胺(defofamine)；秋水仙胺；地吖醌；依氟鸟氨酸(elfornithine)；依利醋铵；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖；氯尼达明；米托胍腙；米托蒽醌；莫哌达醇；硝氨丙吖啶；喷司他丁；苯来美特(phenamet)；吡柔比星；足叶草酸；2-乙基酰肼；丙卡巴肼；PSK®；雷佐生；西索菲兰；锗螺胺；细交链孢菌酮酸；三亚胺醌；2,2',2"- 三氯三乙胺；乌拉坦；长春地辛；达卡巴嗪；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷("Ara- C")；环磷酰胺；噻替哌；紫杉类或紫杉烷家族的成员，诸如紫杉醇 (TAXOL®多西他赛(TAXOTERE®)及其类似物；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-硫鸟嘌呤；巯嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物，诸如顺铂和卡铂；长春碱；铂；依托泊苷(VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺消灵；替尼泊苷；柔红霉素；氨基蝶呤；希罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；维甲酸；艾司波霉素(esperamicins)；卡培他滨；受体酪氨酸激酶和/或血管生成的抑制剂，包括索拉非尼(NEXAVAR®)、舒尼替尼(SUTENT®)、帕唑帕尼(VOTRIENT™)、托西尼布 (PALLADIA™)、凡德他尼(ZACTIMA™)、西地尼布(RECENTIN®)、瑞格非尼(BAY 73-4506)、阿西替尼(AG013736)、来他替尼(CEP-701)、

厄洛替尼(TARCEVA®) 、吉非替尼 (IRESSA™)、BIBW 2992(TOVOK™)、拉帕替尼(TYKERB®)、来那替尼(HKI-272)等,以及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。还包括在该定义中的是抗激素剂,其用于调节或抑制激素对瘤的作用,诸如抗雌激素类,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制芳香化酶的4 (5)-咪唑类、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、可莫昔芬(keoxifene)、LY 117018、奥那司酮和托瑞米芬(FARESTON®);以及抗雄激素类,诸如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。其他常规细胞毒性化合物(如Wiemann 等人,1985,载于Medical Oncology(Calabresi等人编辑),第10章, McMillan Publishing中所公开的那些化合物)也可应用于本发明的方法。

[0601] 可与本发明的包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的分子、结合EGFR 的FN3域、结合c-Met的FN3域或双特异性EGFR/c-Met抗体联合使用的示例性药剂包括酪氨酸激酶抑制剂和靶向抗癌疗法诸如Iressa® (吉非替尼)和Tarceva(厄洛替尼)及HER2、HER3、HER4或VEGF的其他拮抗剂。示例性的HER2拮抗剂包括CP-724-714、HERCEPTIN™(曲妥珠单抗)、OMNITARG™(帕妥珠单抗)、TAK-165、拉帕替尼(EGFR和 HER2抑制剂)和GW-282974。示例性的HER3拮抗剂包括抗Her3抗体(参见例如美国专利公布US2004/0197332)。示例性的HER4拮抗剂包括抗HER4 siRNA(参见例如Maatta等人,Mol Biol Cell 17:67-79,2006)。示例性的VEGF拮抗剂为贝伐单抗(Avastin™)。

[0602] 当小分子与本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体联合使用时,其通常更频繁地施用,优选地一天一次,但每天2、3、4或更多次也是可能的,每两天一次、每周一次或某个其他时间间隔同样可能。小分子药物通常以口服方式服用,但肠胃外施用也是可能的,例如通过IV输注或弹丸式注射或皮下或肌内注射。小分子药物的剂量可通常为10至1000mg,或约100、150、200或250mg。

[0603] 当本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体与第二治疗剂联合施用时,该组合可在任何方便的时间段内发生。例如,可在同一天且甚至在相同静脉内输注中,将双特异性EGFR/c-Met抗体和第二治疗剂施用给患者。然而,也可在隔天或隔周、隔两周或隔月等施用双特异性EGFR/c-Met抗体和第二治疗剂。在一些方法中,双特异性EGFR/c-Met抗体和第二治疗剂以足够接近的时间施用,使得它们在正治疗的患者中同时以可检测水平存在(例如,存在于血清中)。在一些方法中,由一段时间内多剂量组成的双特异性EGFR/c-Met抗体的整个疗程之后或者之前是也由多剂量组成的第二治疗剂的疗程。在一些方法中,如果患者具有对最初施用的第二治疗剂的抗性或形成对该第二治疗剂的抗性,则开始接着施用双特异性EGFR/c-Met抗体进行治疗。患者可接受双特异性EGFR/c-Met抗体和第二治疗剂中一者或两者的仅单个疗程或多个疗程。双特异性EGFR/c-Met抗体和第二治疗剂施用期间可使用1、2或若干天或周的恢复期。当已确立第二治疗剂的合适治疗方案时,该方案可与本发明的双特异性EGFR/c-Met抗体联合使用。例如,Tarceva® (厄洛替尼)作为100mg或150mg丸剂每天服用一次,并且Iressa® (吉非替尼)作为250mg片剂每天服用一次。

[0604] 双特异性EGFR/c-Met抗体,任选地与第二治疗剂联用,可连同任何形式的放射疗法和/或外科手术一起施用,该放射疗法包括外照射、调强放射疗法(IMRT)和任何形式的放

射外科手术，包括伽玛刀、射波刀、直线加速器和组织间放射(例如，植入的放射性粒子、GliaSite球囊)。与放射疗法的联用可尤其适用于头颈癌和脑瘤。

[0605] 虽然以一般的术语描述了本发明，但是本发明的实施例还将在以下的实例中公开，该实例不应理解为对本权利要求所保护的范围的限制。

[0606] 实例1.Tencon文库的构建

[0607] Tencon(SEQ ID NO:1)是一种免疫球蛋白样支架，即由来自人腱生蛋白-C的十五个FN3域的共有序列而设计的III型纤连蛋白(FN3)域 (Jacobs等人，Protein Engineering,Design,and Selection,25:107-117, 2012;美国专利公布2010/0216708)。Tencon的晶体结构显示连接七条β- 链的六个表面外露的环。这些环或每个环内的所选残基可被随机化以便构建III型纤连蛋白(FN3)域的文库，该文库可用于选择能结合于特定靶标的新型分子。

[0608] Tencon：

[0609] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVP GSERSYDLTGLKPGTEY TVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT(SEQ ID NO 1)：

[0610] TCL1文库的构建

[0611] 构建被设计成仅使Tencon(SEQ ID NO:1)的FG环随机化的文库 TCL1，以与顺式展示系统一起使用(Jacobs等人，Protein Engineering, Design,and Selection,25:107-117,2012)。在该系统中，产生了掺入Tac 启动子、Tencon文库编码序列、RepA编码序列、顺式元件和复制起点元件的序列的单链DNA。在体外转录/翻译系统中表达后，Tencon-RepA融合蛋白顺式结合于编码该融合蛋白的DNA而产生了复合物。然后通过如下所述的聚合酶链反应(PCR)分离并扩增结合于靶分子的复合物。

[0612] 与顺式展示一起使用的TCL1文库的构建通过连续数轮PCR实现，以产生两个半部的最终线性的双链DNA分子；5'片段包含启动子和Tencon 序列，而3'片段包含repA基因及顺式元件和复制起点元件。这两个半部通过限制酶切消化来组合，以产生完整构建体。TCL1文库被设计成仅在 Tencon的FG环中掺入随机氨基酸KGGHRSN(SEQ ID NO:86)。NNS密码子用于构建该文库，使得可能将所有20种氨基酸和一个终止密码子掺入到FG环中。TCL1文库包含六个单独的亚文库，各亚文库具有7至12个残基的不同随机化FG环长度，以进一步增加多样性。基于Tencon的文库的设计示于表2中。

[0613] 表2.

[0614]

文库	BC 环设计	FG 环设计
WT Tencon	TAPDAAFD*	KGGHRSN**

[0615]

TCL1	TAPDAAFD*	XXXXXXX
		XXXXXXXX
		XXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXX
TCL2	########	#####S##

[0616] *TAPDAAFD:SEQ ID NO:1的第22-28位残基;

[0617] **KGGHRSN:SEQ ID NO:86

[0618] X是指由NNS密码子编码的简并氨基酸。

[0619] #是指正文中所述的“氨基酸的设计分布”。

[0620] 为了构建TCL1文库,执行连续数轮PCR以附加Tac启动子、在FG 环中建立简并性以及添加最终组装所需的限制位点。首先,通过PCR在两个步骤中产生包含启动子序列和FG环的Tencon序列5’的DNA序列。对应于完全Tencon基因序列的DNA用作采用引物POP2220(SEQID NO: 2)和TC5’toFG(SEQID NO:3)的PCR模板。从该反应所得的PCR产物用作采用引物130mer(SEQID NO:4)和Tc5’toFG的下一轮PCR扩增的模板,以完成5’和启动子序列向Tencon的附加。接下来,通过如下方式将多样性引入FG环中:采用正向引物POP2222(SEQID NO:5)以及包含简并核苷酸的反向引物TCF7(SEQID NO:6)、TCF8(SEQID NO:7)、TCF9(SEQID NO:8)、TCF10(SEQID NO:9)、TCF11(SEQID N NO:10) 或TCF12(SEQID NO:11)扩增在第一步中产生的DNA产物。每个亚文库执行至少八个100μL的PCR反应以使PCR循环最小化并使文库的多样性最大化。对至少5μg的该PCR产物进行凝胶纯化并用于采用引物 POP2222(SEQ ID NO:5)和POP2234(SEQID NO:12)的随后PCR步骤,从而导致6xHis标签和NotI限制位点连接到Tencon序列的3’端。该 PCR反应仅使用十五个PCR循环和至少500ng的模板DNA来进行。对所得PCR产物进行凝胶纯化,用NotI限制酶消化,并通过Qiagen柱纯化。

[0621] 文库的3’片段是恒定DNA序列,该序列包含用于展示的元件,包括PspOMI限制位点、repA基因的编码区以及顺式元件和复制起点元件。使用包含该DNA片段的质粒(pCR4Blunt)(Invitrogen),利用M13正向引物和M13反向引物执行PCR反应。通过PspOMI将所得PCR产物消化过夜,并进行凝胶纯化。为了将文库DNA的5’部分连接到包含repA基因的3’DNA,在NotI和PspOMI酶及T4连接酶存在下,将2pmol的5’DNA连接到等摩尔量的3’repA DNA。在37℃下过夜连接后,将小部分的连接 DNA在凝胶上电泳以检查连接效率。将连接文库产物分成十二次PCR扩增,并且采用引物对POP2250(SEQID NO:13)和DidLigRev(SEQID NO: 14)运行12个循环的PCR反应。TCL1文库的每个亚文库的DNA产量在 32-34μg范围内。

[0622] 为了评估文库的质量,采用引物Tcon5new2(SEQID NO:15)和 Tcon6(SEQID NO:16)扩增小部分的工作文库,并经由不依赖连接酶的克隆法克隆到修饰pET载体中。将质粒DNA转化到BL21-GOLD(DE3)感受态细胞(Stratagene)中并且使用T7启动子引物对96个随机挑取的菌落进行测序。未发现重复的序列。总的说来,大约70-85%的克隆具有完整的启动子和Tencon编码序列而无移码突变。功能序列比率(排除具有终止密码子的克隆)在59%与80%之间。

[0623] TCL2文库的构建

[0624] 构建TCL2文库,其中Tencon的BC和FG环被随机化并且每个位置处的氨基酸的分布受到严格控制。表3示出了TCL2文库中所需环位置处的氨基酸分布。所设计的氨基酸分布具有两个目标。首先,文库偏向于这样的残基,根据Tencon晶体结构的分析和/或同源建模,预测这些残基在结构上对于Tencon折叠和稳定性是重要的。例如,位置29固定为仅亚组的疏水氨基酸,因为该残基掩埋于Tencon折叠的疏水核中。第二层设计包括使氨基酸分布偏向在抗体的重链HCDR3中优先发现的残基,以有效产生高亲和力结合物(Birtalan等人,J Mol Biol 377:1518-28,2008;Olson等人, Protein Sci 16:476-84,2007)。为了达到这个目

的，表3的“所设计的分布”是指如下的分布：6％丙氨酸、6％精氨酸、3.9％天冬酰胺、7.5％天冬氨酸、2.5％谷氨酸、1.5％谷氨酰胺、15％甘氨酸、2.3％组氨酸、2.5％异亮氨酸、5％亮氨酸、1.5％赖氨酸、2.5％苯丙氨酸、4％脯氨酸、10％丝氨酸、 4.5％苏氨酸、4％色氨酸、17.3％酪氨酸和4％缬氨酸。该分布没有甲硫氨酸、半胱氨酸和终止密码子。

[0625] 表3.

残基位置*	WT 残基	TCL2 文库中的分布
22	T	所设计的分布
23	A	所设计的分布
24	P	50% P +所设计的分布
25	D	所设计的分布
26	A	20% A + 20% G +所设计的分布
27	A	所设计的分布
28	F	20% F、20% I、20% L、20% V、20% Y
29	D	33% D、33% E、33% T
75	K	所设计的分布
76	G	所设计的分布
77	G	所设计的分布
78	H	所设计的分布
79	R	所设计的分布
80	S	100% S
81	N	所设计的分布
82	P	50% P +所设计的分布

[0626]

[0627] *残基编号基于SEQ ID NO:1的Tencon序列

[0628] TCL2文库的5’片段包含启动子和Tencon(SEQ ID NO:1)的编码区，其被化学合成为文库集合(library pool)(Sloning Biotechnology)。DNA的该集合包含至少1×10^{11}个不同成员。在片段的末端，BsaI限制位点包括在设计中以用于连接到RepA。

[0629] 文库的3’片段是恒定DNA序列，该序列包含用于展示的元件，包括 6xHis标签、repA基因的编码区以及顺式元件。使用既有DNA模板(见上)以及引物LS1008(SEQID NO:17)和DidLigRev(SEQID NO:14)，通过PCR反应制备DNA。为了组装完整的TCL2文库，将总计1μg的经 BsaI消化的5’Tencon文库DNA连接到3.5μg的3’片段，该3’片段通过采用相同酶的限制性消化来制备。在过夜连接后，通过Qiagen柱纯化DNA，并通过测量260nm下的吸光度来定量DNA。通过采用引物对POP2250 (SEQID NO:13)和DidLigRev(SEQID NO:14)的12个循环的PCR反应来扩增连接文库产物。执行总计72个反应，每个反应包含50ng的连接 DNA产物作为模板。TCL2工作文库DNA的总产量为约100μg。将小部分的工作文库亚克隆并测序，如上文针对文库TCL1所述。未发现重复的序列。约80％的序列包含完整的启动子和Tencon编码序列而无移码突变。

[0630] TCL14文库的构建

[0631] 顶部(BC、DE和FG)和底部(AB、CD和EF)环，例如FN3域中报道的结合表面被形成FN3结构的中心的β-链分隔。存在于FN3域的两个“侧面”上且形状与仅由环形成的表面不同的另选表面，在FN3域的一个侧面处由两条反平行β-链即C和Fβ-链以及CD和FG环形成，并且本文称为C-CD-F-FG表面。

[0632] 使Tencon的另选表面随机化的文库通过如下方式产生:使所选C和F 链的表面外露残基以及CD和FG环的部分随机化,如图1中所示。与 Tencon(SEQ ID NO:1)相比具有下列替换的Tencon变体Tencon27(SEQ ID NO:99)用于产生文库;E11R L17A、N46V、E86I。用于构建该文库的方法的完整描述描述于美国专利公布US2013/0226834。

[0633] 实例2:结合EGFR并抑制EGF结合的III型纤连蛋白(FN3)域的选择

[0634] 文库筛选

[0635] 使用顺式展示从TCL1和TCL2文库选择EGFR结合域。使用标准方法对融合到IgG1 Fc的EGFR(R&D Systems)的重组人胞外域进行生物素酰化,并用于淘选(SEQ ID NO:73的全长EGFR的第25-645位残基)。为了体外转录和翻译(ITT),将2-6μg的文库DNA与0.1mM完整氨基酸、1X S30预混组分以及30μL的S30提取物(Promega)一起在100μL的总体积中温育,并且在30℃下温育。1小时后,加入450μL的封闭溶液 (PBS pH 7.4,补充有2%牛血清白蛋白、100μg/mL鲱鱼精DNA和 1mg/mL肝素),并且将反应在冰上温育15分钟。通过将重组人EGF(R&D Systems)与生物素酰化重组EGFR-Fc在封闭溶液中在室温下混合 1小时,以1:1和10:1摩尔比的EGFR与EGF来组装EGFR-Fc:EGF复合物。为进行结合,将500μL经封闭的ITT反应与100μL的EGFR-Fc:EGF复合物混合,并且在室温下温育1小时,之后采用中性亲和素或链霉亲和素磁珠(Seradyne)将结合复合物拉下。通过用PBST和PBS连续洗涤来移除未结合的文库成员。洗涤之后,通过加热到65℃持续10分钟将DNA从结合复合物洗脱下来,通过PCR来扩增,并通过限制性消化和连接将其连接到编码RepA的DNA片段,以供随后几轮淘选所用。通过在每轮期间将靶标EGFR-Fc的浓度从200nM到50nM连续地降低并且增加洗涤严格性,来分离高亲和力结合物。在第4和5轮中,通过在10倍摩尔过量的非生物素酰化EGFR-Fc存在下在PBS中洗涤过夜,来移除未结合和弱结合的FN3 域。

[0636] 在淘选后,使用标准分子生物学技术,采用寡核苷酸Tcon5new2 (SEQID NO:15)和Tcon6(SEQID NO:16)通过PCR来扩增所选FN3 域,亚克隆到经修饰而包括不依赖连接酶的克隆位点的pET载体中,并且转化到BL21-GOLD(DE3)(Stratagene)细胞中,以用于在大肠杆菌中进行可溶性表达。将编码C-末端聚组氨酸标签的基因序列添加到每个FN3域以实现纯化和检测。在37℃下使培养物在1mL的96孔板中补充有 100μg/mL羧苄青霉素的2YT培养基中生长到0.6-0.8的光密度,然后添加终浓度为1mM的IPTG,此时温度下降到30℃。大约16小时后通过离心收获细胞并在-20℃下冻存。通过如下方式实现细胞裂解:在摇动的情况下将各沉淀物在0.6mL的BugBuster® HT裂解缓冲液(Novagen EMD Biosciences)中在室温下温育45分钟。

[0637] 结合细胞上的EGFR的FN3域的选择

[0638] 为了在更具生理性的环境中评估不同FN3域结合EGFR的能力,测量了它们结合A431细胞的能力。A431细胞(American Type Culture Collection,目录号CRL-1555)过表达EGFR,每个细胞含约2×10^6个受体。将细胞以5,000/孔接种到不透明的黑色96孔板中,并使之在37℃下在潮湿5%的CO_2气氛中附着过夜。将表达FN3域的细菌裂解物在FACS染色缓冲液(Becton Dickinson)中稀释1,000倍,并且在三个平行测定板中在室温下温育1小时。移除裂解物,并且用150μL/孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次。将细胞与50μL/孔的抗penta His-Alexa 488抗体缀合物 (Qiagen)(以1:100稀释于FACS染色缓冲液中)在室温下温育20分钟。用150μL/孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次,之后在孔中充入 100μL的FACS

染色缓冲液并且使用Acumen eX3读板机读取488nm下的荧光。针对其结合A431细胞的能力来筛选包含FN3域的细菌裂解物(用于TCL1和TCL2文库的1320个粗细菌裂解物),并且鉴定出516个阳性克隆,其中结合性超过背景信号≥10倍。针对结合来筛选来自TCL14文库的300个裂解物,得到结合于EGFR的58个独特的FN3域序列。

[0639] 抑制EGF结合于细胞上的EGFR的FN3域的选择

[0640] 为了更好地表征EGFR结合的机制,使用A431细胞测量了各种鉴定的FN3域克隆以EGF竞争性方式结合EGFR的能力,并且与A431结合测定筛选并行运行。将A431细胞以5,000/孔接种到不透明的黑色96孔板中,并使之在37℃下在潮湿5%的CO_2气氛中附着过夜。将细胞与50μL/孔的1:1,000稀释的细菌裂解物在三个平行测定板中在室温下温育1小时。将生物素酰化EGF(Invitrogen,目录号E-3477)加入每个孔中达到30ng/mL 的终浓度,并在室温下温育10分钟。用150μL/孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次。将细胞与50μL/孔的链霉亲和素-藻红蛋白缀合物 (Invitrogen)(以1:100稀释于FACS染色缓冲液中)在室温下温育20分钟。用150μL/孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次,之后在孔中充入 100μL的FACS染色缓冲液并且使用Acumen eX3读板机读取600nm下的荧光。

[0641] 在上述EGF竞争测定法中筛选包含FN3域的细菌裂解物。筛选来自 TCL1和TCL2文库的1320个粗细菌裂解物,得到将EGF结合抑制>50%的 451个阳性克隆。

[0642] 鉴定的结合EGFR的FN3域的表达和纯化

[0643] 用His MultiTrap™ HP板(GE Healthcare)从澄清的大肠杆菌裂解物纯化带His标签的FN3域,并在pH 7.4的包含20mM磷酸钠、500mM氯化钠和250mM咪唑的缓冲液中洗脱。使用PD MultiTrap™ G-25板(GE Healthcare)将经纯化的样品交换到PBS pH 7.4中以用于分析。

[0644] 尺寸排阻色谱法分析

[0645] 使用尺寸排阻色谱法测定结合EGFR的FN3域的聚集状态。将每个经纯化的FN3域的等分试样(10μL)在PBS pH 7.4的流动相中以0.3mL/min 的流量注射到Superdex 75 5/150柱(GE Healthcare)上。通过280nm处的吸光度监测来自柱的洗脱液。将通过SEC显示出高水平聚集的FN3域排除,不进行进一步分析。

[0646] 所选结合EGFR的FN3域从EGFR-Fc的解离速率

[0647] 在ProteOn XPR-36仪器(Bio-Rad)上筛选所选的结合EGFR的FN3 域,以鉴定在结合于EGFR-Fc时具有缓慢解离速率(k_{off})的那些,从而有利于选择高亲和力结合物。将5μg/mL浓度的山羊抗人Fc IgG(R&D systems)以包含0.005%吐温-20的PBS中30μL/min的流量经由胺偶联(在 pH 5.0下)沿芯片上的水平取向直接固定在所有6个配体通道上。固定密度平均为约1500响应单位(RU),并且不同通道间的变化率小于5%。EGFR-Fc被捕获于抗人Fc IgG表面,在竖直配体取向上达到约600RU的密度。将所有经测试的FN3域归一化为1μM的浓度并且测试它们在水平取向上的结合。所有6个分析物通道用于FN3域以使筛选通量最大化。以 100μL/min的流量监测离解相10分钟。点间结合信号用作参照以监测分析物与固定IgG表面之间的非特异性结合,并且从所有结合响应扣除。经处理的结合数据局部拟合到1:1简单朗缪尔结合模型,以提取结合于捕获的 EGFR-Fc的每个FN3域的k_{off}。

[0648] EGF刺激的EGFR磷酸化的抑制

[0649] 测试了经纯化的结合EGFR的FN3域在单一浓度下抑制EGF刺激的 A431细胞中EGFR

的磷酸化的能力。使用EGFR磷酸化(Tyr1173)试剂盒(Meso Scale Discovery)监测EGFR磷酸化。将细胞以20,000/孔接种于透明96孔组织培养处理板(Nunc)中含GlutaMAX™与10％胎牛血清 (FBS)(Gibco)的100μL/孔RPMI培养基(Gibco)中，并使之在37℃下于潮湿5％的CO_2气氛中附着过夜。将培养基完全移除，并且在100μL/ 孔的不含FBS的培养基中在37℃下于潮湿5％的CO_2气氛中对细胞进行饥饿处理过夜。然后用100μL/孔的包含2μM浓度的结合EGFR的FN3域的预热(37℃)饥饿培养基，在37℃下于潮湿5％的CO_2气氛中将细胞处理1 小时。对照仅用饥饿培养基处理。通过如下方式刺激细胞：加入100μL/孔的包含100ng/mL重组人EGF(R&D Systems，目录号236-EG)(终浓度为50ng/mL EGF和1μM结合EGFR的FN3域)的预热(37℃)饥饿培养基并轻轻混合，并且在37℃、5％的CO_2下温育15分钟。一组对照孔保持不刺激，作为阴性对照。将培养基完全移除，并且根据制造商说明书，在摇动的情况下在室温下用100μL/孔的完全裂解缓冲液(Meso Scale Discovery)裂解细胞10分钟。根据制造商说明书，用所提供的封闭溶液在室温下将被配置用于测量第1173位酪氨酸上磷酸化的EGFR的测定板(Meso Scale Discovery)封闭1.5-2小时。然后用200μL/孔的1X Tris洗涤缓冲液(Meso Scale Discovery)将板洗涤4次。将细胞裂解物的等分试样 (30μL/孔)转移到测定板，将测定板用板密封膜(VWR)覆盖并且在摇动的情况下在室温下温育1小时。用200μL/孔的Tris洗涤缓冲液将测定板洗涤4次，之后将25μL的冰冷检测抗体溶液(Meso Scale Discovery)加入每孔中，应小心操作，避免引入气泡。在摇动的情况下在室温下将板温育1小时，然后用200μL/孔的Tris洗涤缓冲液洗涤4次。通过如下方式检测信号：加入150μL/孔的读取缓冲液(Read Buffer)(Meso Scale Discovery) 并且使用制造商安装的测定专用默认设置，在SECTOR®成像器6000仪器 (Meso Scale Discovery)上读数。对每个结合EGFR的FN3域计算EGF刺激的阳性对照信号的抑制百分比。

[0650] 对来自TCL1和TCL2文库的232个鉴定的克隆测量EGF刺激的 EGFR磷酸化的抑制。这些克隆中的22个在1μM浓度下将EGFR磷酸化抑制≥50％。在将弱表达或经尺寸排阻色谱法判定为多聚体的克隆移除之后，九个克隆接着进行进一步的生物表征。这些克隆的BC和FG环序列示于表 4中。九个所选克隆中的八个具有共同的FG环序列 (HNVYKDTNMRGL；SEQ ID NO:95)并且在若干克隆之间在其BC环序列中可看到显著相似性的区域。

[0651] 表4.

[0652]

FN3域		BC环		FG环	
克隆ID	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:
P53A1R5-17	18	ADPHGFYD	87	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-17	19	TYDRDGYD	88	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-47	20	WDPFSFYD	89	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-48	21	DDPRGFYE	90	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-73	22	TWPYADLD	91	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-74	23	GYNGDHFD	92	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-81	24	DYDLGVYD	93	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-83	25	DDPWDFYE	94	HNVYKDTNMRGL	95
P54CR4-31	26	TAPDAAFD	85	LGSYVFEHDVM	96

[0653] 实例3：抑制EGF结合的结合EGFR的FN3域的表征

[0654] 大规模表达、纯化和内毒素移除

[0655] 表4中所示的FN3域按比例放大以提供用于详细表征的更多材料。使用包含每种结

合EGFR的FN3域变体的过夜培养物，以过夜培养物在新鲜培养基中的1/80稀释液接种0.8L补充有100μg/mL氨比西林的Terrific肉汤培养基，并且在摇动的情况下在37℃下温育。当600nm下的光密度达到约 1.2-1.5时，通过添加终浓度为1mM的IPTG来诱导培养物，并且温度下降到30℃。在4小时后，通过离心收集细胞，并且将细胞沉淀物保存于-80℃下直到需要为止。

[0656] 为了进行细胞裂解，以每克沉淀物5mL的BugBuster®的比率，将解冻的沉淀物重悬于补充有25U/mL的Benzonase® (Sigma-Aldrich)和1kU/mL 的rLysozyme™(Novagen EMD Biosciences)的1XBugBuster®中。在轻轻搅拌的情况下在室温下进行裂解1小时，然后在4℃下以56,000×g离心50 分钟。收集上清液并通过0.2μm滤膜过滤，然后使用GE Healthcare ÄKTAexplorer 100s色谱系统将其上样于用缓冲液A(50mM Tris-HCl pH 7.5、500mM NaCl、10mM咪唑)预先平衡的5mL的HisTrap FF柱。将柱用20个柱体积的缓冲液A洗涤，并用6个柱体积的16％缓冲液B(50mM Tris-HCl pH7.5、500mM NaCl、250mM咪唑)进一步洗涤。将FN3域用10 个柱体积的50％B、接着是超过6个柱体积的50-100％B的梯度进行洗脱。将包含FN3域蛋白的级分合并，使用Millipore 10K MWCO浓缩器浓缩，并过滤，再上样于用PBS预先平衡的HiLoad™ 16/60Superdex™ 75柱 (GE Healthcare)上。从尺寸排阻柱洗脱的蛋白单体峰得以保留。

[0657] 使用ActiClean Etox树脂(Sterogene Bioseparations)，利用分批方法移除内毒素。在内毒素移除之前，将树脂用1N NaOH在37℃下预处理2小时(或4℃过夜)并且用PBS充分洗涤直到用pH试纸测得pH已稳定到约 7。将经纯化的蛋白通过0.2μm滤膜过滤，再以10mL的蛋白与1mL的树脂的比率加入到1mL的Etox树脂中。在轻轻旋转的情况下使内毒素对树脂的结合在室温下进行至少2小时。通过以500×g离心2分钟来移除树脂，并且保留蛋白上清液。使用EndoSafe®-PTS™小柱测量内毒素水平，并且在EndoSafe®-MCS读板机(Charles River)分析。如果在第一次Etox处理后内毒素水平高于5EU/mg，则重复以上程序直到内毒素水平降至≥5EU/mg。在用Etox进行两次连续处理后内毒素水平高于5EU/mg并且稳定的情况下，确定蛋白质的阴离子交换或疏水相互作用色谱法条件，以移除剩余的内毒素。

[0658] 所选结合EGFR的FN3域对EGFR-Fc的亲和力测定(EGFR-Fc亲和力)

[0659] 所选结合EGFR的FN3域对重组EGFR胞外域的结合亲和力进一步使用Proteon仪器(BioRad)通过表面等离子共振方法表征。测定装置(芯片制作，EGFR-Fc捕获)类似于以上针对解离速率分析所述的装置。以3倍稀释系列在1μM浓度下测试水平取向的所选结合EGFR的FN3域。还注入缓冲液样品以监测基线稳定性。以100μL/min的流量监测所有浓度的每个结合EGFR的FN3域的离解相30分钟(对于来自解离速率筛选的k_{off}为约 $10^{-2}s^{-1}$的那些)或1小时(对于k_{off}为约$10^{-3}s^{-1}$或更慢的那些)。将两组参考数据从响应数据扣除：1)点间信号，以校正结合EGFR的FN3域与固定化IgG表面之间的非特异性相互作用；2)缓冲液通道信号，以校正因捕获的EGFR-Fc表面随时间推移的离解而引起的基线漂移。将在所有浓度下对每个FN3域处理的结合数据全局地拟合到1:1简单朗缪尔结合模型，以提取动力学(k_{on}、k_{off})和亲和力(K_D)常数的估计值。表5示出了每个构建体的动力学常数，并且亲和力从200pM变化到9.6nM。

[0660] 所选结合EGFR的FN3域对细胞上的EGFR的结合(“A431细胞结合测定”)

[0661] 将A431细胞以5,000/孔接种到不透明的黑色96孔板中,并使之在 37℃下在潮湿5%的CO_2气氛中附着过夜。在室温下将经纯化的结合EGFR 的FN3域(1.5nM至30μM)加入到三个平行测定板中的细胞(50uL)中持续1小时。移除上清液,并且用150μL/孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次。将细胞与50μL/孔的抗penta His-Alexa488抗体缀合物(Qiagen) (以1:100稀释于FACS染色缓冲液中)在室温下温育20分钟。用150μL/ 孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次,之后在孔中充入100μL的FACS 染色缓冲液并且使用Acumen eX3读板机读取488nm下的荧光。将数据作为原始荧光信号对FN3域摩尔浓度的对数作图,并且使用GraphPad Prism 4 (GraphPad Software)拟合到具有可变斜率的S形剂量-响应曲线,以计算 EC_{50}值。表5报告了2.2nM至>20μM范围内的每个构建体的EC_{50}。

[0662] 使用所选结合EGFR的FN3域对EGF结合于细胞上的EGFR的抑制(A431细胞EGF竞争测定法)

[0663] 将A431细胞以5,000/孔接种到不透明的黑色96孔板中,并使之在 37℃下在潮湿5%的CO_2气氛中附着过夜。在室温下将经纯化的结合EGFR 的FN3域(1.5nM至30μM)加入到三个平行测定板中的细胞(50μL/孔) 中持续1小时。将生物素酰化EGF(Invitrogen,目录号:E-3477)加入每个孔中达到30ng/mL的终浓度,并在室温下温育10分钟。用150μL/孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次。将细胞与50μL/孔的链霉亲和素-藻红蛋白缀合物(Invitrogen)(以1:100稀释于FACS染色缓冲液中)在室温下温育20分钟。用150μL/孔的FACS染色缓冲液将细胞洗涤3次,之后在孔中充入100μL的FACS染色缓冲液并且使用Acumen eX3读板机读取 600nm下的荧光。将数据作为原始荧光信号对FN3域摩尔浓度的对数作图,并且使用GraphPad Prism 4(GraphPad Software)拟合到具有可变斜率的S形剂量-响应曲线,以计算IC_{50}值。表5报告了1.8nM至121nM范围内的IC_{50}值。

[0664] EGF刺激的EGFR磷酸化的抑制(磷酸化EGFR测定)

[0665] 通过测量抑制的IC_{50}值,更全面地评估显著抑制EGF刺激的EGFR磷酸化的所选FN3域。在不同FN3域浓度(0.5nM至10μM)下评估EGF刺激的EGFR磷酸化的抑制,如以上在“EGF刺激的EGFR磷酸化的抑制”中所述。将数据作为电化学发光信号对FN3域摩尔浓度的对数作图,并且通过使用GraphPad Prism 4(GraphPad Software)将数据拟合到具有可变斜率的S形剂量响应,来测定IC_{50}值。表5示出了在18nM至>2.5μM范围内的IC_{50}值。

[0666] 人瘤细胞生长的抑制(NCI-H292生长和NCI-H322生长测定)

[0667] 通过如下方式评估EGFR依赖性细胞生长的抑制:在暴露于结合 EGFR的FN3域之后,测量过表达EGFR的人瘤细胞系NCI-H292和NCI- H322(American Type Culture Collection,分别为目录号CRL-1848和目录号CRL-5806)的活力。将细胞以500个细胞/孔(NCI-H292)或1,000个细胞/孔(NCI-H322)接种于不透明的白色96孔组织培养处理板(Nunc)中含GlutaMAX™和10mM HEPES且补充有10%热灭活胎牛血清(Gibco)和 1%青霉素/链霉素(Gibco)的100μL/孔RPMI培养基(Gibco)中,并使之在37℃下在潮湿5%的CO_2气氛中附着过夜。通过加入包含某浓度范围结合EGFR的FN3域的5μL/孔的磷酸盐缓冲盐水(PBS)来处理细胞。对照仅用5μL/孔的PBS或PBS中的25mM乙二胺四乙酸处理。将细胞在 37℃、5%的CO_2下温育120小时。通过如下方式检测活细胞:加入75μL/ 孔的CellTiter-Glo®试剂(Promega),然后在板摇动器上混合2分钟,并且在室温下在黑暗中再温育10分钟。在设定为

发光模式的SpectraMax M5读板机(Molecular Devices)上读取板,对于仅空白介质的读取时间为0.5秒/ 孔。将数据作为经PBS处理的细胞生长的百分比对FN3域摩尔浓度的对数作图。使用GraphPad Prism 4(GraphPad Software)将数据拟合到具有可变斜率的S形剂量响应的方程,来测定IC_{50}值。表5示出了分别使用NCI- H292和NCI-H322细胞时5.9nM至1.15μM以及9.2nM至>3.1μM范围内的 IC_{50}值。表5示出了每个测定法的结合EGFR的FN3域的生物学特性的汇总。

[0668] 表5.

[0669]

FN3域克隆ID	SEQ ID NO:	EGFR-Fc亲和力(nM)	A431细胞结合 EC_{50}(nM)	A431细胞EGF竞争 IC_{50}(nM)	磷酸化EGFR IC_{50}(nM)	NCI-H292生长 IC_{50}(nM)	NCI-H322生长 IC_{50}(nM)
P53A1R5-17	18	1.89	4.0	9.8	>2500	86	65
P54AR4-17	19	9.62	16	21	184	ND	ND
P54AR4-47	20	2.51	8.6	7.1	295	44	39
P54AR4-48	21	7.78	12	9.8	170	ND	ND
P54AR4-73	22	0.197	9.4	4.6	141	83	73
P54AR4-74	23	ND	77	ND	ND	ND	ND
P54AR4-81	24	ND	84	121	ND	ND	ND
P54AR4-83	25	0.255	2.2	1.8	18	5.9	9.2
P54CR4-31	26	0.383	>20000	55	179	1150	>3073

[0670] 实例4:结合EGFR的FN3域的工程改造

[0671] 亚组的结合EGFR的FN3域被工程改造为增加每个分子的构象稳定性。通过DNA合成将已表明改善FN3域稳定性的突变L17A、N46V和 E86I(描述于美国专利公布US2011/0274623)掺入到克隆P54AR4-83、P54CR4-31和P54AR4-37中。如上所述,将新突变体P54AR5-83v2、P54CR431-v2和P54AR4-37v2表达并纯化。使用PBS中的差示扫描量热法评估每个突变体的稳定性,以便将其与对应亲本分子的稳定性相比较。表6 示出了每个变体分子被显著稳定,其中T_m的平均增加值为18.5℃。

[0672] 表6.

[0673]

FN3域克隆	SEQ ID NO:	T_m(℃)
P54AR4-83	25	50.6
P54AR4-83v2	27	69.8
P54CR4-31	26	60.9
P54CR4-31v2	28	78.9
P54AR4-37	22	45.9
P54AR4-37v2	29	64.2

[0674] 实例5:结合c-Met并抑制HGF结合的III型纤连蛋白(FN3)域的选择

[0675] 对人c-Met的淘选

[0676] 针对生物素酰化人c-Met胞外域(bt-c-Met)来筛选TCL14文库,以鉴定能够特异性结合c-Met的FN3域。对于选择,使3μg的TCL14文库在大肠杆菌S30线性提取物(Promega,Madison,WI)中体外转录并翻译 (IVTT),并且表达的文库用Cis Block(2%的BSA(Sigma-

Aldrich,St. Louis,MO)、100μg/ml鲑鱼精DNA(Promega)、1mg/mL肝素(Sigma- Aldrich))封闭。对于选择,bt-c-Met以浓度为400nM(第1轮)、200nM (第2和3轮)和100nM(第4和5轮)添加。结合的文库成员使用中和亲和素磁珠(Thermo Fisher,Rockford,IL)(第1、3和5轮)或链霉亲和素磁珠(Promega)(第2和4轮)回收,并且未结合的文库成员通过用 500uL的PBS-T洗涤珠粒5-14次接着用500μL的PBS洗涤2次来移除。

[0677] 进行另外的选择轮以便鉴定具有提高的亲和力的FN3域分子。简而言之,如上所述制备来自第5轮的输出并且使其经历另外重复轮的选择,除了以下变化:与bt-c-Met的温育从1小时减少至15分钟,并且珠粒捕获从 20分钟减少至15分钟,bt-c-Met减少至25nM(第6和7轮)或2.5nM(第 8和9轮),并且在过量的非生物素酰化c-Met存在下进行另外1小时的洗涤。这些变化的目的是同时选择具有可能较快的结合速率和较慢的解离速率的结合物,产生大致较低的K_D。

[0678] 使用标准方案,利用TCON6(SEQID No.30)和TCON5 E86I short (SEQID No.31)引物,将第5、7和9轮输出PCR克隆到包含不依赖连接酶的克隆位点的修饰pET15载体(EMD Biosciences,Gibbstown,NJ) (pET15-LIC)中,并且在转化和IPTG诱导(1mM终浓度,30℃下持续 16小时)后将蛋白质表达为C-末端带His6标签的蛋白质。通过离心收获细胞并随后用补充有0.2mg/mL鸡蛋清溶解酵素(Sigma-Aldrich)的 Bugbuster HT(EMD Biosciences)裂解。通过离心使细菌溶解物澄清并将上清液转移至新的96深孔板。

[0679] 筛选抑制HGF结合于c-Met的FN3域

[0680] 在生物化学形式中针对它们抑制HGF结合于经纯化的c-Met胞外域的能力来筛选存在于大肠杆菌裂解物中的FN3域。将重组人c-Met Fc嵌合体 (PBS中的0.5μg/mL,100μL/孔)包被于96孔白色Maxisorp板(Nunc) 上并在4℃下温育过夜。在Biotek洗板机上使用300μL/孔含0.05%吐温20 的Tris缓冲盐水(TBS-T,Sigma-Aldrich)将板洗涤两次。在摇动的情况下在室温(RT)下用StartingBlock T20(200μL/孔,Thermo Fisher Scientific,Rockland,IL)封闭测定板1小时,并且再用300μl的TBS-T洗涤两次。使用Hamilton STARplus机器人系统将FN3域裂解物稀释于 StartingBlock T20(从1:10到1:100,000)中。在摇动的情况下在室温下将裂解物(50μL/孔)在测定板上温育1小时。在不洗涤板的情况下,在室温下将bt-HGF(StartingBlock T20中的1μg/mL,50μL/孔,生物素酰化)加入板中持续30min,同时伴以摇动。包含Tencon27裂解物的对照孔容纳有 Starting Block T20或稀释的bt-HGF。然后用300μL/孔的TBS-T将板洗涤四次,并且在摇动的情况下在室温下用100μL/孔的链霉亲和素-HRP(TBS-T 中的1:2000,Jackson Immunoresearch,West Grove,PA)温育30-40分钟。再用TBS-T将板洗涤四次。为形成信号,将根据制造商说明书制备的 POD化学发光底物(50μL/孔,Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)加入板中,并且在大约3分钟内,使用SoftMax Pro在Molecular Devices M5上读取发光。使用下列计算来测定抑制百分比:100-((RLU$_{样品}$-平均RLU$_{无bt-HGF对照}$)/(平均RLU$_{bt-HGF对照}$-平均RLU$_{无bt-HGF对照}$)*100)。50%或更大的抑制百分比值被视为活性化合物(hits)。

[0681] FN3域的高通量表达和纯化

[0682] 用His MultiTrap™ HP板(GE Healthcare)从澄清的大肠杆菌裂解物纯化带His标签的FN3域,并在pH 7.4的包含20mM磷酸钠、500mM氯化钠和250mM咪唑的缓冲液中洗脱。使用PD MultiTrap™ G-25板(GE Healthcare)将经纯化的样品交换到PBS pH 7.4中以用于分

析。

[0683] HGF结合于c-Met的抑制的IC_{50}测定

[0684] 在HGF竞争测定法中进一步表征所选FN3域。利用上述测定法建立经纯化的FN3域的剂量响应曲线(起始浓度为5μM)。计算抑制百分比值。将数据作为抑制%对FN3域摩尔浓度的对数作图,并且使用GraphPad Prism4将数据拟合到具有可变斜率的S形剂量响应来测定IC_{50}值。

[0685] 从第5轮鉴定出在1:10稀释度下显示活性且IC_{50}值在0.5至1500nM 范围内的35个独特序列。第7轮得到在1:100稀释度下具有活性且IC_{50}值在0.16至2.9nM范围内的39个独特序列。从第9轮鉴定出66个独特序列,其中活性化合物(hits)被定义为在1:1000的稀释度下具有活性。在第 9轮中观察到低至0.2nM的IC_{50}值(表8)。

[0686] 所选结合c-Met的FN3域对c-Met-Fc的亲和力测定(EGFR-Fc亲和力)

[0687] 按照实例3中对于对所选结合EGFR的FN3域的亲和力测定所述的方法,测定对所选结合c-Met的FN3域的亲和力,不同的是在测定法中使用 c-Met-Fc。

[0688] 实例6:结合c-Met并抑制HGF结合的FN3域的表征

[0689] 按照以上在实例2中所述的方法表达并纯化FN3域。分别按照以上在实例1和2中所述的方法进行尺寸排阻色谱法和动力学分析。表7示出了 C-链、CD环、F-链和FG环的序列以及每个域的完整氨基酸序列的SEQ ID NO。

[0690] 表7.

[0691]

克隆		C环	CD链	F环	FG链
名称	SEQ ID NO:				
P114AR5P74-A5	32	FDSFWIRYDE	VVVGGE	TEYYVNILGV	KGGSISV
P114AR5P75-E9	33	FDSFFIRYDE	FLRSGE	TEYWVTILGV	KGGLVST
P114AR7P92-F3	34	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYIVNIMGV	KGGSISH
P114AR7P92-F6	35	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNILGV	KGGGLSV
P114AR7P92-G8	36	FDSFVIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P92-H5	37	FDSFWIRYLE	FLLGGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P93-D11	38	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVGINGV	KGGYISY
P114AR7P93-G8	39	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYGVTINGV	KGGRVST
P114AR7P93-H9	40	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIIGV	KGGHISL
P114AR7P94-A3	41	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGKISP
P114AR7P94-E5	42	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYAVNIMGV	KGGRVSV
P114AR7P95-B9	43	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGSISV
P114AR7P95-D3	44	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGSISY
P114AR7P95-D4	45	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P95-E3	46	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P95-F10	47	FDSFWIRYFE	FTTAGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-G7	48	FDSFWIRYFE	LLSTGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP

[0692]

[0693] C环残基对应于所指示SEQ ID NO的第28-37位残基

[0694] CD链残基对应于所指示SEQ ID NO的第38-43位残基

[0695] F环残基对应于所指示SEQ ID NO的第65-74位残基

[0696] FG链残基对应于所指示SEQ ID NO的第75-81位残基

[0697] 所选结合c-Met的FN3域对细胞上的c-Met的结合(“H441细胞结合测定”)

[0698] 将NCI-H441细胞(目录号HTB-174,American Type Culture Collection,Manassas,VA)以每孔20,000个细胞接种于聚D-赖氨酸包被的黑色透明底96孔板(BD Biosciences,San Jose,CA)中,并使之在 37℃、5%的CO_2下附着过夜。在4℃下将经纯化的FN3域(50μL/孔;0至 1000nM)加入两个平行测定板中的细胞中持续1小时。移除上清液,并且用FACS染色缓冲液(150μL/孔,BD Biosciences,目录号554657)将细胞洗涤三次。将细胞与生物素酰化抗HIS抗体(以1:160稀释于FACS染色缓冲液中,50μL/孔,R&D Systems,目录号BAM050)在4℃下温育30分钟。用FACS染色缓冲液(150μL/孔)将细胞洗涤三次,之后将孔与抗小鼠IgG1-Alexa 488缀合抗体(以1:80稀释于FACS染色缓冲液中,50μL/ 孔,Life Technologies,目录号A21121)在4℃下温育30分钟。用FACS 染色缓冲液(150μL/孔)将细胞洗涤三次并留在FACS染色缓冲液(50μL/ 孔)中。使用Acumen eX3读板机测定总荧光。将数据作为原始荧光信号对 FN3域摩尔浓度的对数作图,并且使用GraphPad Prism 4(GraphPad Software)拟合到具有可变斜率的S形剂量-响应曲线,以计算EC_{50}值。发现FN3域表现出一系列结合活性,并且EC_{50}值在1.4nM与22.0nM之间,如表8中所示。

[0699] HGF刺激的c-Met磷酸化的抑制

[0700] 使用得自Meso Scale Discovery(Gaithersburg,MD)的c-Met磷酸化 (Tyr1349)试剂盒,测试经纯化的FN3域抑制NCI-H441中HGF刺激的 c-Met磷酸化的能力。将细胞以20,000/孔接种于透明96孔组织培养处理板中含10%胎牛血清(FBS;Life Technologies)的100μL/孔RPMI培养基 (包含Glutamax和HEPES,Life Technologies)中,并使之在37℃、5%的 CO_2下附着过夜。将培养基完全移除,并且在无血清RPMI培养基(100μL/ 孔)中在37℃、5%的CO_2下对细胞进行饥饿处理过夜。然后为细胞补充包含20μM及更低浓度的FN3域的新鲜无血清RPMI培养基(100μL/孔),在37℃、5%的CO_2下持续1小时。对照仅用培养基处理。用100ng/mL重组人HGF(100μL/孔,R&D Systems目录号294-HGN)刺激细胞并在 37℃、5%的CO_2下温育15分钟。一组对照孔保持不刺激,作为阴性对照。然后将培养基完全移除,并且根据制造商说明书,在摇动的情况下在室温下用完全裂解缓冲液(50μL/孔,Meso Scale Discovery)裂解细胞10 分钟。根据制造商说明书,用所提供的封闭溶液在室温下将被配置用于测量磷酸化c-Met的测定板封闭1小时。然后用Tris洗涤缓冲液(200μL/ 孔,Meso Scale Discovery)将板洗涤三次。将细胞裂解物(30μL/孔)转移到测定板,并且在摇动的情况下在室温下温育1小时。然后用Tris洗涤缓冲液将测定板洗涤四次,之后将冰冷检测抗体溶液(25μL/孔,Meso Scale Discovery)加入每孔中,在摇动的情况下在室温下持续1小时。再用Tris 洗涤缓冲液将板冲洗四次。通过如下方式检测信号:加入150读取缓冲液 (150μL/孔,Meso Scale Discovery)并且使用制造商安装的测定专用默认设置,在SECTOR®成像器6000仪器(Meso Scale Discovery)上读数。将数据作为电化学发光信号对FN3域摩尔浓度的对数作图,并且使用 GraphPad Prism 4将数据拟合到具有可变斜率的S形剂量响应来测定IC_{50}值。发现FN3域以4.6nM至1415nM范围内的IC_{50}值抑制磷酸化c-Met,如表8所示。

[0701] 人瘤细胞生长或活力的抑制

[0702] 通过如下方式评估c-Met依赖性细胞生长的抑制:在暴露于结合c-Met 的FN3域后,测量U87-MG细胞(American Type Culture Collection,目录号HTB-14)的活力。将细胞

以每孔8000个细胞接种于不透明的白色96孔组织培养处理板(Nunc)中补充有10％的FBS的100μL/孔RPMI培养基中，并使之在37℃、5％的CO_2下附着过夜。接种后二十四小时，吸出培养基并为细胞补充无血清RPMI培养基。血清饥饿后二十四小时，通过加入包含结合c-Met的FN3域的无血清培养基(30μL/孔)来处理细胞。将细胞在37℃、5％的CO_2下温育72小时。通过如下方式检测活细胞：加入 100μL/孔的CellTiter-Glo®试剂(Promega)，然后在板摇动器上混合10分钟。在设定为发光模式的SpectraMax M5读板机(Molecular Devices)上读取板，读取时间为0.5秒/孔。将数据作为原始发光单位(RLU)对FN3域摩尔浓度的对数作图。使用GraphPad Prism 4将数据拟合到具有可变斜率的 S形剂量响应的方程，来测定IC_{50}值。表8报告了1nM至>1000nM范围内的IC_{50}值。结合c-Met的FN3域的特征汇总于表8中。

[0703] 表8.

[0704]

克隆		亲和力 (Kd，nM)	HGF 竞争 IC_{50} (nM)	H441 细胞结合 (EC_{50}，nM)	H441 细胞中的 pMet 抑制（IC_{50}，nM）	U87-MG 细胞增殖的抑制（IC_{50}，nM）
名称	SEQ ID NO:					
P114AR5P74-A5	32	10.1	5.2	18.7	1078	464.4
P114AR5P75-E9	33	45.8	51.9	ND	1415	1193.9
P114AR7P92-F3	34	0.4	0.2	1.5	8.3	2.7
P114AR7P92-F6	35	3.1	2.2	4.9	165.3	350.5
P114AR7P92-G8	36	1.0	1.6	5.9	155.3	123.9
P114AR7P92-H5	37	11.6	ND	22.0	766.4	672.3
P114AR7P93-D11	38	ND	ND	2.3	16	14.4
P114AR7P93-G8	39	6.9	1	3.8	459.5	103.5

[0705]

P114AR7P93-H9	40	3.3	2.9	12.9	288.2	269.9
P114AR7P94-A3	41	0.4	0.2	1.4	5	9.3
P114AR7P94-E5	42	4.2	0.7	3.4	124.3	195.6
P114AR7P95-B9	43	0.5	0.3	ND	9.8	17.4
P114AR7P95-D3	44	0.3	0.2	1.5	4.6	1.7
P114AR7P95-D4	45	0.4	ND	1.4	19.5	19.4
P114AR7P95-E3	46	1.5	ND	3.2	204.6	209.2
P114AR7P95-F10	47	4.2	1.4	4.4	187.6	129.7
P114AR7P95-G7	48	20.0	ND	11.3	659.3	692
P114AR7P95-H8	49	3.7	ND	4.1	209.8	280.7

[0706] 结合c-Met的FN3域的热稳定性

[0707] 使用PBS中的差示扫描量热法评估每个FN3域的稳定性。实验的结果在表9中示出。

[0708] 表9.

[0709]

克隆		热稳定性（Tm，C）
名称	SEQ ID NO:	
P114AR5P74-A5	32	74.1
P114AR5P75-E9	33	ND
P114AR7P92-F3	34	81.5
P114AR7P92-F6	35	76.8
P114AR7P92-G8	36	90.9
P114AR7P92-H5	37	87
P114AR7P93-D11	38	ND
P114AR7P93-G8	39	76.8
P114AR7P93-H9	40	88.2
P114AR7P94-A3	41	86.2
P114AR7P94-E5	42	80
P114AR7P95-B9	43	86.3
P114AR7P95-D3	44	82
P114AR7P95-D4	45	85.3
P114AR7P95-E3	46	94.2
P114AR7P95-F10	47	85.2
P114AR7P95-G7	48	87.2
P114AR7P95-H8	49	83

[0710] 实例7.双特异性抗EGFR/c-Met分子的构建和表征

[0711] 双特异性EGFR/c-Met分子的构建

[0712] 将实例1-6中所述的结合EGFR和c-Met的FN3域的多种组合连接成能够结合于EGFR和c-Met两者的双特异性分子。另外，制备具有以SEQ ID NO:107-110示出的氨基酸序列的结合EGFR的FN3域以及具有以SEQ ID NO:111-114示出的氨基酸序列的结合c-Met的FN3域，并连接成双特异性分子。形成合成基因以便编码以SEQ ID NO:50-72和106(表10)所述的氨基酸序列，使得下列形式得以保持：结合EGFR的FN3域，之后是肽接头，之后是结合c-Met的FN3域。将聚组氨酸标签掺入到C-末端以有助于纯化。除了表10中所述的那些分子之外，这两个FN3域之间的接头还根据如表11中所列的长度、序列组成和结构而变化。可以设想到多种其他接头可用于连接此类FN3域。使双特异性EGFR/c-Met分子表达，并且如针对单特异性EGFR或c-Met FN3域所述，使用IMAC和凝胶过滤色谱法步骤从大肠杆菌纯化。

[0713] 表10.

[0714]

双特异性EGFR/c-Met分子		结合EGF的FN3域		结合cMET的FN3域		接头	
克隆ID	SEQ ID NO:	克隆ID	SEQ ID NO:	克隆ID	SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:
ECB1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	$(GGGGS)_4$	79
ECB2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	$(GGGGS)_4$	79
ECB3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	$(GGGGS)_4$	79
ECB4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	$(GGGGS)_4$	79
ECB5	54	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	$(GGGGS)_4$	79
ECB6	55	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P93-H9	40	$(GGGGS)_4$	79
ECB7	56	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P75-E9	33	$(GGGGS)_4$	79
ECB15	57	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81
ECB27	58	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB60	59	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81
ECB37	60	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB94	61	P54AR4-83v22	108	P114AR7P94-A3v22	111	$(AP)_5$	81
ECB95	62	P54AR4-83v22	108	P114AR9P121-A6v2	112	$(AP)_5$	81
ECB96	63	P54AR4-83v22	108	P114AR9P122-A7v2	113	$(AP)_5$	81
ECB97	64	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB106	65	P54AR4-83v23	109	P114AR7P94-A3v22	111	$(AP)_5$	81
ECB107	66	P54AR4-83v23	109	P114AR9P121-A6v2	112	$(AP)_5$	81
ECB108	67	P54AR4-83v23	109	P114AR9P122-A7v2	113	$(AP)_5$	81
ECB109	68	P54AR4-83v23	109	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB116	69	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P94-A3v22	111	$(AP)_5$	81
ECB119	70	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P121-A6v2	112	$(AP)_5$	81
ECB120	71	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P122-A7v2	113	$(AP)_5$	81
ECB121	72	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB91	106	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB18	118	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB28	119	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB38	120	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81
ECB39	121	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81

[0715] 表11.

[0716]

接头	SEQ ID NO:	以氨基酸计的接头长度	结构
GS	78	2	无序
GGGGS	105	5	无序
$(GGGGS)_4$	79	20	无序
$(AP)_2$	80	4	刚性
$(AP)_5$	81	5	刚性
$(AP)_{10}$	82	20	刚性
$(AP)_{20}$	83	40	刚性
$A(EAAAK)_5AAA$	84	29	α-螺旋

[0717] 与单独的单特异性分子相比，双特异性EGFR/c-Met分子增强了效力，表明有亲合力

[0718] 将NCI-H292细胞接种于96孔板中含10％的FBS的RPMI培养基中。24小时后，将培养基更换为无血清RPMI。血清饥饿后24小时，用如下不同浓度的FN3域处理细胞：高亲和力单特异性EGFR FN3域(P54AR4- 83v2)，弱亲和力单特异性c-Met FN3域(P114AR5P74-A5)，两种单特异性EGFR和c-Met FN3域的混合物，或由低亲和力c-Met FN3域连接到高亲和力EGFR FN3域(ECB1)构成的双特异性EGFR/c-Met分子。将细胞用单特异性或双特异性分子处理1小时，然后在37℃、5％的CO_2下用 EGF、HGF或EGF与HGF的组合刺激15分钟。用MSD裂解缓

冲液裂解细胞，并且如上所述根据制造商说明书，使用适当MSD测定板评估细胞信号传导。

[0719] 低亲和力c-Met FN3域以610nM的IC_{50}抑制c-Met的磷酸化(图 4)。如预期，EGFR FN3域不能抑制c-Met磷酸化，并且单特异性分子的混合物似乎与单独的c-Met FN3域相同。然而，双特异性EGFR/c-Met分子以1nM的IC_{50}抑制c-Met的磷酸化(图4)，相对于单独的c-Met单特异性分子而言在改善效力方面提供了2-log的改变。

[0720] 在具有可变c-Met和EGFR密度和比率的多种细胞类型中评价了双特异性EGFR/c-Met分子通过亲合力效应增强对c-Met和/或EGFR磷酸化的抑制的潜能(图5)。将NCI-H292、NCI-H441或NCI-H596细胞接种于96 孔板中含10％的FBS的RPMI培养基中。24小时后，将培养基更换为无血清RPMI。血清饥饿后24小时，用不同浓度的单特异性结合EGFR的FN3 域、单特异性c-Met FN3域或双特异性EGFR/c-Met分子(ECB5，由 P53A1R5-17v2和P114AR7P94-A3构成)处理细胞。将细胞用单特异性或双特异性分子处理1小时，然后在37℃、5％的CO_2下用EGF、HGF或 EGF与HGF的组合刺激15分钟。用MSD裂解缓冲液裂解细胞，并且如上所述根据制造商说明书，使用适当MSD测定板评估细胞信号传导。

[0721] 图5(A-C)示出了在三种不同细胞系中与双特异性EGFR/cMet分子相比使用单特异性结合EGFR的FN3域时EGFR的抑制。为了在EGFR磷酸化测定法中评估亲合力，将中等亲和力结合EGFR的FN3域(1.9nM) (P53A1R5-17v2)与双特异性EGFR/c-Met分子(0.4nM) (P114AR7P94- A3)相比较，该双特异性EGFR/c-Met分子包含连接到高亲和力结合c-Met 的FN3域的相同结合EGFR的FN3域。在NCI-H292和H596细胞中，单特异性和双特异性分子对EGFR的磷酸化的抑制是相当的(图5A和 5B)，可能是因为这些细胞系具有EGFR与c-Met受体的高比率。为了测试该理论，在显示c-Met受体比EGFR更多的NCI-H441细胞中评价EGFR 磷酸化的抑制。与单特异性结合EGFR的FN3域相比，用双特异性 EGFR/c-Met分子处理NCI-H441细胞将抑制EGFR磷酸化的IC_{50}降低了30 倍(图5C)。

[0722] 使用具有对EGFR(0.26nM)的高亲和力及对c-Met(10.1nM)的中等亲和力的分子，在c-Met磷酸化测定法中评价了双特异性EGFR/c-Met分子增强效力的可能性。在NCI-H292和NCI-H596细胞两者中，与单特异性结合c-Met的FN3域相比，双特异性分子分别将c-Met的磷酸化的抑制增强134倍和1012倍(图5D和5E)。

[0723] 已证实，双特异性EGFR/c-Met分子增强抑制EGFR和c-Met磷酸化的效力转化为增强抑制信号传导和增殖。对于这些实验，将结合FN3 EGFR 和结合c-Met的FN3域的混合物与双特异性EGFR/c-Met分子相比较。如表 12和13中所述，当用双特异性EGFR/c-Met分子处理细胞时，与单特异性结合物的混合物相比，ERK磷酸化(表12)和NCI-H292细胞增殖(表 13)的IC_{50}值减小。相对于两种单特异性EGFR和c-Met FN3域的混合物，双特异性EGFR/c-Met分子对ERK磷酸化抑制的IC_{50}低143倍，在该测定法中显示了亲合力对分子效力的效应。在表12中，单特异性结合 EGFR和c-Met的FN3域不会完全抑制活性，因此所示IC_{50}值应视为下限。使用作为混合物或以双特异性形式连接的结合EGFR和c-Met的FN3 域的不同组合，完成增殖测定。相对于单特异性亲本结合EGFR或c-Met 的FN3域的混合物，双特异性EGFR/c-Met分子抑制增殖的IC_{50}低34-236 倍。这证实，在受体水平观察到的亲合力效应(图4和图5)转化为在抑制细胞信号传导(表12)和细胞增殖(表13)方面的改善。

[0724] 表12.

[0725]

FN3域分子的特异性	克隆名称	类型	IC_{50}（nM）（ERK磷酸化）
EGFR	P54AR4-83v2	单特异性	>10,000
c-Met	P114AR5P74-A5	单特异性	2366
EGFR或c-Met	P54AR4-83v2＋P114AR5P74-A5	单特异性分子的混合物	798.4
EGFR和c-Met	ECB1	双特异性	5.6

[0726] 表13.

[0727]

结合EGFR的FN3域（亲和力）	结合c-Met的FN3域（亲和力）	单特异性分子的混合物的IC_{50}（nM）	双特异性分子的IC_{50}（nM）	单特异性/双特异性分子的混合物的IC_{50}倍数增加
P54AR4-83v2（0.26nM）	P114ARP94-A3（0.4nM）	36.5	1.04	35
P54AR4-83v2（0.26nM）	P114AR7P93-H9（3.3nM）	274.5	8.05	34
P54AR4-83v2（0.26nM）	P114AR5P74-A5（10.1nM）	1719	7.29	236

[0728] 体内移植瘤:PK/PD

[0729] 为了测定体内单特异性和双特异性FN3域分子的疗效,对瘤细胞进行工程改造以分泌人HGF(鼠HGF不结合于人c-Met)。使用慢病毒感染 (表达人HGF的慢病毒DNA载体(登录号X16322)和得自Genecopoeia 的慢病毒包装试剂盒)在NCI-H292细胞中稳定表达人HGF。感染后,用 4μg/mL嘌呤霉素(Invitrogen)选择表达HGF的细胞。使用得自MesoScale Discovery的测定板在合并细胞的调理培养基中检测人HGF蛋白质。

[0730] 在每只动物的背侧上对SCID Beige小鼠皮下接种表达人HGF的NCI- H292细胞(200μL体积Cultrex(Trevigen)中的2.0×10^6个细胞)。每周进行两次瘤测量,直到瘤体积在150-250mm^3之间的范围内。然后给予小鼠单一腹腔剂量的双特异性EGFR/c-Met分子(连接到白蛋白结合域以延长半衰期)或PBS媒介物。在给药后6h或72h,取出瘤并立即冷冻于液氮中。经由心脏穿刺将血液样品收集到含3.8%柠檬酸盐的蛋白酶抑制剂中。收集后立即将血液样品离心,并且将所得血浆转移到样品管中并保存于-80℃下。将瘤称重,切成小块,并在包含加有HALT蛋白酶/磷酸酶抑制剂 (Pierce)、50mM氟化钠(Sigma)、2mM活化原钒酸钠(Sigma)和 1mM的PMSF(MesoScale Discovery)的RIPA缓冲液的裂解基质A试管 (LMA)中裂解。将裂解物从LMA基质移除并且离心除去不溶蛋白。用 BCA蛋白测定法定量可溶瘤蛋白,并且在瘤裂解缓冲液中稀释到等同蛋白水平。使用得自MesoScale Discovery的测定板(根

据制造商方案并如上文所述)测量磷酸化c-Met、EGFR和ERK。

[0731] 图6示出了实验的结果。在6h和72h时,每个双特异性EGFR/c-Met 分子显著降低了磷酸化c-Met、EGFR和ERK的水平。图6中所示的数据显示同时抑制c-Met和EGFR两者的重要性以及双特异性EGFR/c-Met分子对每个受体的亲和力在抑制下游ERK方面起到的作用。在6h和72h时,与包含中等亲和力结合EGFR的FN3域的分子(P53A1R5-17v2;图中以"17"示出,K_D=1.9nM)相比,包含高亲和力结合EGFR的FN3域的分子(P54AR4-83v2;图中以"8"示出,K_D=0.26nM)将EGFR的磷酸化抑制到更大程度。在6小时的时间点,所测试的所有四种双特异性分子完全抑制了ERK的磷酸化,而与亲和力无关。在72小时的时间点,与中等亲和力结合c-Met的FN3域(P114AR5P74-A5;图中以"A5"示出;K_D=10.1nM;图6)相比,包含紧密亲和力c-Met结合域的分子 (P114AR7P94-A3;图中以"A3"示出,K_D=0.4nM)显著抑制了ERK的磷酸化。

[0732] 在血液和瘤中给药后6和72小时,测量每个双特异性EGFR/c-Met分子的浓度(图7)。有趣的是,在6小时处,相对于其他分子而言,具有中等亲和力EGFR结合域(P53A1R5-17v2;K_D=1.9nM)但具有高亲和力结合c-Met的FN3域(P114AR7P94-A3;K_D=0.4nM)的双特异性分子具有明显更多的瘤积聚,但到72小时该差异减小。可假设瘤之外的细胞具有更低水平的EGFR和c-Met表面表达,因此与更高亲和力结合EGFR的FN3域相比,中等亲和力EGFR分子不紧密地结合于正常组织。因此,有更多游离的中等亲和力结合EGFR的FN3域可供结合于瘤中。因此,鉴定对每个受体的适当亲和力可允许鉴定具有降低的系统性毒性和增加的瘤积聚的治疗剂。

[0733] 采用双特异性EGFR/c-Met分子的瘤疗效研究

[0734] 在每只动物的背侧对SCID Beige小鼠皮下接种表达人HGF的NCI- H292细胞(200μL Cultrex(Trevigen)中的2.0×10^6个细胞)。植入后一周,小鼠被分为具有相等瘤体积的组(平均瘤体积=77.9+/-1.7mm^3)。用双特异性分子每周给予小鼠三次,并每周记录瘤体积两次。使用具有对c- Met和EGFR的可变亲和力的四种不同双特异性分子观察瘤生长抑制(TGI)。图8示出了抑制c-Met和EGFR两者的有益效果,因为当结合c- Met的FN3域为中等亲和力时,与中等亲和力结合EGFR的FN3域相比,在用包含高亲和力结合EGFR的FN3域的分子治疗的小鼠中观察到瘤生长延迟(空心与实心三角形,P54AR4-83v2-P114AR5P74-A5与P53A1R5-17- P114AR5P74-A5相比)。此外,数据显示出具有高亲和力结合c-Met的 FN3域的重要性,因为包含高或中等亲和力结合EGFR的FN3域但包含高亲和力结合c-Met的FN3域的双特异性分子显示出最大疗效(灰色和黑色点线,P54AR4-83v2-P114AR7P94-A3和P53A1R5-17v2-P114AR7P94-A3)

[0735] 双特异性分子及EGFR和c-Met的其他抑制剂的疗效

[0736] 在SCID/Beige小鼠的皮下H292-HGF人肺癌移植瘤模型的治疗中评价了双特异性EGFR/c-Met分子(ECB38)及小分子抑制剂克唑替尼(c-Met 抑制剂)和厄洛替尼(EGFR抑制剂)、西妥昔单抗(抗EGFR抗体)(各作为单一药剂)以及克唑替尼与厄洛替尼联用的体内疗效。

[0737] 在37℃下在空气的5%的CO_2气氛中,在补充有胎牛血清(10%v/v) 和L-谷氨酰胺(2mM)的RPMI1640培养基中体外维持H292-HGF细胞。每周通过胰蛋白酶-EDTA处理将细胞常规地继代培养两次。收获在指数生长期生长的细胞并且计数以进行瘤接种。

[0738] 每只小鼠在右侧区皮下接种在0.1ml的含用于瘤发展的Cultrex(1:1) 的PBS中的H292-HGF瘤细胞(2×10^6)。当平均瘤尺寸达到139mm^3时开始处理。在下列实验设计表中示出了每个研究组中的测试制品施用和动物数目。瘤细胞接种的日期表示为第0天。表14示出了处理组。

[0739] 表14.

[0740]

组	N	处理	剂量（mg/kg）	给药途径	计划日程	实际日程
1	10	媒介物对照	0	*i.p.*	QD×3 周	QD×3 周
2	10	双特异性 EGFR/c-Met 分子	25	*i.p.*	3 次/周×3 周	3 次/周×3 周
3	10	克唑替尼	50	*p.o.*	QD×3 周	QD×17 天
4	10	厄洛替尼	50	*p.o.*	QD×2 周	QD×3 周
5	10	克唑替尼	50	*p.o.*	QD×3 周	QD×3 周
6	10	西妥昔单抗	1mg/小鼠	*i.p.*	Q4d*6	Q4d*6

[0741] N:动物数目;p.o.:口服;i.p.:腹膜内注射;3次/周:在一周的第1、3和5天给药。QD:每天一次;Q4d:每四天一次;克唑替尼与厄洛替尼联用的时间间隔为0.5小时;基于体重调整给药量(10l/g);a:分组后第14天不给药。

[0742] 在开始处理之前,将所有动物称重并测量瘤体积。由于瘤体积可影响任何给定处理的有效性,使用基于它们的瘤体积的随机化区组设计,将小鼠分配到各组。这确保了在基线处所有组是相当的。随机化区组设计用于将实验动物分配到各组。首先,根据其初始瘤体积将实验动物分成均匀区组。其次,在每个区组内,进行实验动物对处理的随机化。使用随机化区组设计分配实验动物确保了每只动物有相同概率被分配到给定处理,从而减少系统误差。

[0743] 在常规监测时,检查动物瘤生长和处理对正常行为的任何效应,诸如可动性、食物和水消耗量的目测、体重增加/减轻(每周测量两次体重)、眼光/毛发暗淡和任何其他异常效应。

[0744] 终点是瘤生长是否可被延迟或荷瘤小鼠是否可被治愈。每周使用卡尺在两个维度上测量瘤尺寸两次,并且使用下式表示以mm^3计的体积:$V= 0.5a\times b^2$,其中a和b分别是瘤的长直径和短直径。然后使用瘤尺寸计算T-C值和T/C值两者。计算T-C,其中T是处理组的平均瘤尺寸达到 1000mm^3所需的时间(以天计),并且C是对照组的平均瘤尺寸达到相同尺寸的时间(以天计)。T/C值(以百分比计)是抗瘤疗效的指示;T和C 分别是在给定天处理组和对照组的平均瘤体积。瘤完全消退(CR)被定义为瘤减小到低于触诊的极限(62.5mm^3)。瘤部分消退(PR)被定义为瘤从初始瘤体积减小。需要在3次或更多次连续瘤测量中CR或PR的最短持续时间,CP或PR被视为持久的。

[0745] 对体重减轻超过20％或该组的平均瘤尺寸超过2000mm^3的动物施行安乐死。在最后一剂量后观察两周之后终止研究。

[0746] 在每个时间点提供每组的瘤体积的汇总统计，包括平均值和平均值的标准误差(SEM)，并示于表15中。使用单因素方差分析，之后使用 Games-Howell(未假定等方差)进行个体比较，以此来评价各组间瘤体积差异的统计分析。所有数据使用SPSS 18.0分析。$p<0.05$被视为统计意义上的显著性。

[0747] 表15

[0748]

天数	瘤体积（mm^3）a					
	媒介物	25mg/kg 的双特异性 EGFR/c-Met 分子	50mg/kg 的克唑替尼	50mg/kg 的厄洛替尼	50mg/kg 的克唑替尼；50mg/kg 的厄洛替尼	1mg/小鼠的西妥昔单抗
7	139±7	137±7	140±9	141±8	139±8	139±10
9	230±20	142±7	217±20	201±19	134±9	168±13
13	516±45	83±6	547±43	392±46	109±10	212±20
16	808±104	44±7	914±92	560±70	127±15	252±28
20	1280±209	30±6	1438±239	872±136	214±30	371±48
23	1758±259	23±7	2102±298	1122±202	265±40	485±61
27	2264±318	21±5	--	1419±577	266±42	640±82
30	--	23±6	--	1516±623	482±61	869±100

[0749] 在瘤接种后第23天，媒介物处理组(第1组)的平均瘤尺寸达到 1,758mm^3。用25mg/kg剂量水平的双特异性EGFR/c-Met分子进行处理(第 2组)导致所有小鼠中瘤完全消退(CR)，这在>3次连续瘤测量中是持久的(在第23天，与媒介物组相比，平均TV＝23mm^3，T/C值＝1％，p＝ 0.004)。

[0750] 用50mg/kg剂量水平的作为单一药剂的克唑替尼进行处理(第3组) 未显示抗瘤活性；在第23天，平均瘤尺寸为2,102mm^3(与媒介物组相比，T/C值＝120％，p＝0.944)。

[0751] 用50mg/kg给药水平的作为单一药剂的厄洛替尼进行治疗(第4组) 显示出微量抗瘤活性，但与媒介物组相比，未发现显著的差异；在第23 天，平均瘤尺寸为1,122mm^3(与媒介物组相比，T/C值＝64％，p＝ 0.429)，与媒介物组相比，在瘤尺寸为1,000mm^3时，瘤生长延迟4天。

[0752] 克唑替尼(50mg/kg，第5组)与厄洛替尼(50mg/kg，第5组)的联用显示出显著的抗瘤活性；在第23天，平均瘤尺寸为265mm^3 (T/C＝15％；p＝0.008)，与媒介物组相比，在瘤尺寸为1,000mm^3时，瘤生长延迟17天。

[0753] 1mg/小鼠给药水平的作为单一药剂的西妥昔单抗(第6组)显示出显著的抗瘤活性；在第23天，平均瘤尺寸为485mm^3(T/C＝28％；p＝ 0.018)，与媒介物组相比，在瘤尺寸为1,000mm^3时，瘤生长延迟17天。图15和表16示出了各种疗法的抗瘤活性。

[0754] 表16

[0755]

处理	在第23天的瘤尺寸（mm^3）	T/C（%）	1000mm^3的T-C（天数）	*P*值
媒介物	1758±259	--	--	--
双特异性EGFR/c-Met分子（25mg/kg）	23±7	1	--	0.004
克唑替尼（50mg/kg）	2102±298	120	-1	0.944
厄洛替尼（50mg/kg）	1122±202	64	4	0.429
克唑替尼+厄洛替尼（50mg/kg+50mg/kg）	265±40	15	17	0.008
西妥昔单抗（1mg/小鼠）	485±61	28	17	0.018

[0756] 在媒介物组中观察到中等到严重的体重减轻，这可能是由于增加的瘤负荷；到第23天，3只小鼠死亡，并且当BWL>20％时，对1只小鼠施行安乐死。在第2组中观察到双特异性EGFR/c-Met分子的轻微毒性；在处理期过程中当BWL>20％时，对3只小鼠施行安乐死。在2周观察期过程中，当撤去处理时，体重逐渐恢复。与媒介物组相比，在克唑替尼或厄洛替尼单一疗法组中观察到更严重的体重减轻，暗示处理相关的毒性。在给药期过程中大体能耐受克唑替尼与厄洛替尼联用，但在研究结束时观察到严重的体重减轻，这可能是由于在非处理期过程中恢复了快速瘤生长。在该研究中西妥昔单抗的单一疗法能被良好耐受；仅在研究结束时观察到体重减轻，这是由于瘤生长恢复。

[0757] 总之，25mg/kg的双特异性EGFR/c-Met分子(3次/周×3周)在 SCID/Beige小鼠中的H292-HGF人肺癌移植瘤模型中产生了完全响应。该处理在10只小鼠中有7只耐受，并且导致10只小鼠中有3只严重体重减轻。图9示出了处理后各时间点期间各种疗法对瘤尺寸的影响。

[0758] 实例8：双特异性EGFR/c-Met分子的半衰期延长

[0759] 已描述了用于减少肾过滤并从而延长蛋白质的血清半衰期的多种方法，包括用聚乙二醇(PEG)或其他聚合物修饰、结合于白蛋白、与结合于白蛋白或其他血清蛋白的蛋白域融合、与白蛋白的基因融合、与IgG Fc 域的融合，以及与非结构化长氨基酸序列的融合。

[0760] 用PEG修饰双特异性EGFR/c-Met分子，以便通过在分子C-末端掺入游离半胱氨酸来增加流体力学半径。最常见的是，半胱氨酸残基的游离巯基用于使用标准方法连接用马来酰亚胺或碘乙酰胺基团官能化的PEG分子。各种形式的PEG可用于修饰蛋白，包括1000、2000、5000、10,000、 20,000或40,000kDa的直链PEG。这些分子量的支链PEG分子也可用于修饰。在一些情况下，PEG基团也可通过双特异性EGFR/c-Met分子中的伯胺连接。

[0761] 除聚乙二醇化之外，双特异性EGFR/c-Met分子的半衰期还可通过将这些蛋白制备成与天然存在的3-螺旋束血清白蛋白结合域(ABD)或共有白蛋白结合域(ABDCon)的融合分子来延长。这些蛋白域经由表12中所述的任何接头连接到结合c-Met的FN3域的C-末端。ABD或ABDCon域也可在一级序列中设置在结合EGFR的FN3域与结合c-Met的FN3域之间。

[0762] 实例9：所选双特异性EGFR/c-Met分子的表征

[0763] 表征了所选双特异性EGFR/c-Met分子对EGFR和c-Met两者的亲和力、抑制EGFR和c-Met自磷酸化的能力以及对HGF细胞增殖的效应。还根据实例3中所述的方案，使用Proteon仪器(BioRad)，通过表面等离子共振方法评价了双特异性EGFR/c-Met分子对重组EGFR和/或c-Met胞外域的结合亲和力。表征的结果在表17中示出。

[0764] 表17.

[0765]

	k_D (EGFR, nM)	k_D (c-Met, nM)	H441 细胞中的 pMet 抑制（IC_{50}，nM）	H292 细胞中的 H292 pEGFR 抑制（IC_{50}，nM）	HGF 诱导的 H292 细胞中的 H292-HGF 增殖抑制（IC_{50}，nM）
ECB15	0.2	2.6	n/a	4.2	23
ECB94	1	4.3	53.8	5.1	29.6
ECB95	1.1	6.2	178.8	13.6	383.4
ECB96	1.6	22.1	835.4	24.7	9480
ECB97	1.3	1.7	24.2	16.6	31.0
ECB106	16.7	5.1	53.3	367.4	484.5
ECB107	16.9	9	29.9	812.3	2637
ECB108	15.3	25.5	126.2	814.4	11372
ECB109	17.3	2.1	26	432	573.6

[0766] 实例10.双特异性EGFR/cMet抗体的生成

[0767] 若干单特异性EGFR和c-Met抗体被表达为在其Fc区中具有Fc替换K409R或F405L(根据EU索引进行编号)的IgG1,κ。单特异性抗体在两种CHO细胞系中表达,一种细胞系具有降低的岩藻糖基化能力,从而产生在抗体多糖链中具有1-15%岩藻糖含量的抗体。

[0768] 单特异性抗体使用Protein A柱(HiTrap MabSelect SuRe柱)以标准方法纯化。洗脱后,在D-PBS,pH 7.2中透析合并液。

[0769] 通过在体外Fab臂交换(如WO2011/131746中所述)中将单特异性 EGFR mAb与单特异性c-Met mAb组合,来生成双特异性EGFR/c-Met抗体。简而言之,将PBS,pH 7-7.4中的约1-20mg/ml的1:1摩尔比的每种抗体与75mM 2-巯基乙醇胺(2-MEA)混合在一起并且在25-37℃下温育2- 6h,然后使用标准方法经由透析、透滤、切向流过滤和/或旋转细胞过滤来移除2-MEA。

[0770] 在体外Fab臂交换中将若干单特异性抗EGFR抗体和抗c-Met抗体组合于基质中以生成双特异性抗体,随后对该双特异性抗体进行进一步表征。使用如下测定法以四步策略对所生成的双特异性抗体进行评级:步骤 1:FACS测定法中对NCI-H441、NCI-H1975和A549细胞的结合。步骤 2:A549细胞中pMet磷酸化的抑制。步骤3:NCI-H1975、KP4和NCI- H441细胞中增殖的抑制。步骤4:A549和SNU-5细胞中EGFR磷酸化的抑制。值得注意的是,双特异性抗体中未保留亲本抗体的特性。例如,双特异性抗体中存在某些EGFR结合臂导致抑制丧失或减弱,或c-Met磷酸化增强。基于表征研究来选择所选的对。

[0771] 生成了单特异性二价抗EGFR抗体E1-K409R,其包含抗EGFR抗体2F8的VH和VL区及具有K409R替换的IgG1恒定区,抗EGFR抗体2F8 具有SEQ ID NO:189的VH和SEQ ID NO:190的VL(抗体2F8描述于国际专利公布WO2002/100348)。

[0772] 生成了单特异性二价抗EGFR抗体E1-F405L,其包含抗EGFR抗体 2F8的VH和VL区及具有F405L替换的IgG1恒定区,抗EGFR抗体2F8 具有SEQ ID NO:189的VH和SEQ ID NO:190

的VL(抗体2F8描述于国际专利公布WO2002/100348)。

[0773] 生成了单特异性二价抗EGFR抗体E2-K409R,其包含抗EGFR抗体 018的VH和VL区及具有K409R替换的IgG1恒定区,抗EGFR抗体018 具有SEQ ID NO:191的VH和SEQ ID NO:192的VL(抗体018描述于国际专利公布WO2009/030239)。

[0774] 生成了单特异性二价抗EGFR抗体E2-F405L,其包含抗EGFR抗体 018的VH和VL区及具有F405L替换的IgG1恒定区,抗EGFR抗体018 具有SEQ ID NO:191的VH和SEQ ID NO:192的VL(抗体018描述于国际专利公布WO2009/030239)。

[0775] 生成了单特异性二价抗c-Met抗体M1-K409R,其包含抗c-Met抗体 069的VH和VL区及具有K409R替换的IgG1恒定区,抗c-Met抗体069 具有SEQ ID NO:193的VH和SEQ ID NO:194的VL(抗体069描述于 WO2011/110642)。

[0776] 生成了单特异性二价抗c-Met抗体M1-F405L,其包含抗c-Met抗体 069的VH和VL区及具有F405L替换的IgG1恒定区,抗c-Met抗体069具有SEQ ID NO:193的VH和SEQ ID NO:194的VL(抗体069描述于 WO2011/110642)。

[0777] 生成了单特异性抗c-Met抗体M2-K409R,其包含抗c-Met抗体058的 VH和VL区及具有K409R替换的IgG1恒定区,抗c-Met抗体058具有 SEQ ID NO:195的VH和SEQ ID NO:196的VL(抗体058描述于 WO2011/110642)。

[0778] 生成了单特异性抗c-Met抗体M2-F405L,其包含抗c-Met抗体058的 VH和VL区及具有F405L替换的IgG1恒定区,抗c-Met抗体058具有 SEQ ID NO:195的VH和SEQ ID NO:196的VL(抗体058描述于 WO2011/110642)。

[0779] 以下示出了抗体的VH、VL、HC和LC序列:

[0780] >SEQ ID NO:189EGFR mAb E1 VH

[0781] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSS

[0782] >SEQ ID NO:190EGFR mAb E1 VL

[0783] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSES GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGG GTKVEIK

[0784] >SEQ ID NO:191EGFR mAb E2 VH

[0785] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL WGRGTLVTVSS

[0786] >SEQ ID NO:192EGFR mAb E2 VL

[0787] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK

[0788] >SEQ ID NO:193cMet mAb M1 VH

[0789] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLE WMGWISAYNGYTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARDLRGTNYFDYWGQGTLVTVSS

[0790] >SEQ ID NO:194cMet mAb M1VL

[0791] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKL LIYAASSLLSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP- ITFGQGTRLEIK

[0792] >SEQ ID NO:195cMet mAb M2 VH

[0793] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRL EWVATISDDGSYTYYPDSVKGR FTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMY YCAREGLYYYGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSS

[0794] >SEQ ID NO:196cMet mAb M2 VL

[0795] QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIY DASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQ GTRLEIK

[0796] >SEQ ID NO:199EM1-mAb H1(抗EGFR,405L)

[0797] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

[0798] >SEQ ID NO:200EM-1 mAb L1

[0799] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSES GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0800] >SEQ ID NO:201 EM-1 mAb H2(K409R,抗cMet)

[0801] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLE WMGWISAYNGYTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARDLRGTNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0802] >SEQ ID NO:202 EM-1 mAb L2

[0803] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKL LIYAASSLLSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

[0804] >SEQ ID NO:234 E2 mAb HC1(EGFR-F405L)

[0805] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

[0806] >SEQ ID NO:235E2 mAb LC1(EGFR)

[0807] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD

ASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0808] >SEQ ID NO:236 E2 mAb HC2(c-Met-K409R)

[0809] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRL EWVATISDDGSYTYYPDSVKGR FTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMY YCAREGLYYYGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

[0810] >SEQ ID NO:237

[0811] E2 mAb LC2(cMet)

[0812] QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIY DASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQ GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0813] 将所生成的单特异性抗EGFR和c-Met抗体混合以用于基质中的体外 Fab臂交换，并且在各种测定法中进行表征。双特异性抗体EM1-mAb包含 mAb E1-F405L的EGFR结合臂和mAb M1-K409R的c-Met结合臂。双特异性抗体EM2-mAb包含mAb E2-F405L的EGFR结合臂和mAb M2-K409R 的c-Met结合臂。双特异性抗体EM3-mAb包含mAb E1-K409R的EGFR结合臂和mAb M1-F405L的c-Met结合臂。双特异性抗体EM4-mAb包含mAb E2-K409R的EGFR结合臂和mAb M2-F405L的c-Met结合臂。EM1- mAb和EM3-mAb具有相当的特性。

[0814] 双特异性EM1-mAb培养于具有降低的糖蛋白岩藻糖基化能力的CHO 细胞系中，从而具有约1-15％的岩藻糖基含量。核心岩藻糖从连接到Fc区的二天线复合物型寡糖的移除经由改善的FcγRIIIa结合来显著增强抗体的 ADCC，而不改变抗原结合或CDC活性。此类mAb可使用据报道可引起具有二天线复合物型Fc寡糖的相对较高去岩藻糖基化治疗抗体的成功表达的不同方法来实现，并且在上文有所描述。

[0815] 实例11.双特异性EGFR/c-Met抗体的纯化

[0816] 在体外Fab臂交换后使用标准方法采用疏水相互作用色谱法进一步纯化双特异性EM1-mAb，以使残余亲本c-Met和EGFR抗体最小化。

[0817] 实例12.双特异性EGFR/c-Met抗体的表征

[0818] 在各种测定法中测试了EGFR/c-Met双特异性抗体EM1-mAb的特性，包括EGF刺激的EGFR磷酸化、HGF刺激的c-Met磷酸化、ERK1/2磷酸化、AKT磷酸化的抑制，配体结合和细胞活力的抑制。将EM1-mAb的特性与对照单价EGFR或c-Met结合抗体比较，并与已知的EGFR抑制剂诸如厄洛替尼(CAS 183321-74-6;酪氨酸激酶抑制剂)和西妥昔单抗(CAS 205923-56-4)比较。

[0819] 因为EM-1 mAb抗体的亲本抗体是二价的，将对照单价EGFR和c- Met抗体以与结合于无关/不相关抗原的Fab臂组合的双特异性形式生成，以便相比于相应对照单价分子的混合物来准确比较双特异性EM-1 mAb的协同作用和亲合力。

[0820] 为了生成对照单价EGFR和c-Met抗体,生成了单特异性抗HIV gp120 抗体gp120-K409R,其包含SEQ ID NO:198的重链和SEQ ID NO:209的轻链。生成了单特异性抗HIV gp120抗体gp120-F405L,其包含SEQ ID NO: 197的重链和SEQ ID NO:209的轻链。

[0821] 通过E1-F405L与gp120-K409R之间的体外Fab臂交换,生成了对照单价抗EGFR mAb E1-F405L-gp120-K409R,并且通过M1-K409R与 gp120-F405L之间的体外Fab交换,生成了对照单价抗cMet mAb M1- K409R-gp120-F405L,并且按照先前所述进行纯化。

[0822] 在双特异性抗体的表征中使用了下列细胞系:NCI-H292(American Type Culture Collection(ATCC),目录号CRL-1848)、NCI-H1975 (ATCC目录号CRL-5908)、SKMES-1(ATCC目录号HTB-58)、A431 (ATCC目录号CRL-1555)、NCI-H441(ATCC目录号HTB-174)、NCI-H3255(DCTD瘤/细胞系储库,NCI,Frederick,NCI-Navy Medical oncology Cell Line增刊,J Cell Biochem suppl 24,1996;Tracy S.,cancer Res 64:7241-4,2004;Shimamura T.,cancer Res 65:6401-8,2005)和 HCC-827(ATCC目录号CRL-2868)。NCI-H292和SKMES-1细胞表达野生型EGFR和野生型c-Met两者。NCI-3255表达突变体L858R EGFR并且表现出EGFR和c-Met扩增。H1975表达突变体L858R/T790M EGFR和野生型c-Met。HCC-827表达Δ(E746,A750)EGFR并且表现出EGFR扩增。细胞系NCI-H292、NCI-H975、NCI-H441和NCI-H3255在本说明书中可互换地分别称为H292、H975、H441和H3255。

[0823] 双特异性EGFR/cMet抗体对细胞上的EGFR和c-Met的结合(A431细胞结合测定)

[0824] 使用实例3(“A431细胞结合测定”)和实例6(“H441细胞结合测定”)中所述的方案测试了双特异性EGFR/c-Met抗体EM1-mAb对细胞上的EGFR和c-Met的结合。单价指向EGFR E1-F405L-gp120-K409R的西妥昔单抗和对照抗体用作A431细胞的对照。西妥昔单抗具有5.0nM的EC_{50}值。表18示出了结合的EC_{50}值。EM1-mAb表现出在结合方面与二价单特异性亲本对照抗体相比1.9倍(A431细胞)和2.3倍(H441细胞)的下降。西妥昔单抗与二价亲本对照抗体相当。由于EGFR和c-Met的单价结合,EM1-mAb表现出比亲本mAb的值更高的EC_{50}结合值。EM1-mAb具有与单臂E1/惰性臂和E2/惰性臂双特异性单价mAb相似的结合EC_{50}值。

[0825] 表18.

[0826]

	结合于细胞的 EC_{50} (nM)		
	EM1-mAb	亲本mAb	E1-F405L-gp120-K409R (A431 细胞) 或 M1-K409R-gp120-F405L (H441 细胞)
A431 (EGFR 结合的测定法)	9.6 ± 3	5.1 ± 0.3	10.1 ± 0.6
H441 (c-Met 结合的测定法)	1.5 ± 0.7	0.65 ± 0.1	1.0 ± 0.3

[0827] 配体结合于受体的抑制

[0828] 在ELISA测定法中测试了双特异性抗体阻碍EGF结合于EGFR胞外域及HGF结合于c-Met胞外域的能力。将重组人EGF R-Fc(R&D Systems,目录号:344-ER-050)或人HGF(R&D Systems,目录号:294-HGN- 025/CF)包被于MSD HighBind平板(Meso Scale Discovery,Gaithersburg,MD)在室温下持续2小时。将MSD封闭剂A缓冲液(Meso Scale Discovery,Gaithersburg,MD)加入每个孔并在室温下温育2小时。用0.1M HEPES缓冲液(pH 7.4)将平板洗涤三次,然后加入荧光染料标记 (MSD)EGF或生物素酰化HGF蛋白与不同浓度抗体的混合物。将钌标记 EGF蛋白与从1nM递增到4μM浓度的不同抗体在室温下温育30分钟。在室温下在轻轻摇动的情况下温育2小时后,用0.1M HEPES缓冲液(pH 7.4)将平板洗涤3次。将MSD

读取缓冲液T稀释并分配，并且使用 SECTOR成像器6000分析信号。如EGF/EGFR抑制测定法进行HGF抑制测定法，不同的是将10nM的生物素酰化HGF与从1nM递增到2μM浓度的不同抗体在室温下温育30分钟。

[0829] EM1-mAb在50nM的EGF存在下以10.7nM±1.2的IC_{50}值抑制EGF 结合于EGFR，并且在80nM EGF存在下以10.6±1.5nM的IC_{50}值抑制 EGF结合于EGFR。亲本二价抗体在50nM的EGF存在下以0.14±1.5nM 的IC_{50}值抑制EGF结合于EGFR，并且在80nM EGF存在下以1.7±1.4nM的IC_{50}值抑制EGF结合于EGFR。EM1 mAb具有对EGF结合于EGFR胞外域的较弱抑制，这是由于与亲本二价mAb相比EM1 mAb的单价结合。

[0830] EM1-mAb以29.9±1.5nM的IC_{50}值抑制HGF结合于c-Met。亲本二价抗体以14.8±1.6nM的IC_{50}抑制HGF结合于c-Met。EM1 mAb具有对HGF 结合于cMet胞外域的较弱抑制，这是由于与亲本二价mAb相比EM1-mAb 的单价结合。

[0831] EGF刺激的EGFR磷酸化和HGF刺激的c-Met磷酸化的抑制

[0832] 对抗体进行测试以测定抑制EGFR和c-Met磷酸化的IC_{50}值。如实例2 (“EGF刺激的EGFR磷酸化的抑制”)和实例6(“HGF刺激的c-Met 磷酸化的抑制”)中所述以不同的抗体浓度(终浓度0.035-700nM)评估 EGF刺激的EGFR磷酸化和HGF刺激的c-Met磷酸化的抑制。在一些实验中，将EGF和HGF两者加入细胞中，因此可使用相同的细胞裂解物检测 EGFR和c-Met磷酸化两者。

[0833] 单价指向EGFR的对照抗EGFR mAb E1-F405L-gp120-K409R以及具有低岩藻糖含量的亲本二价抗EGFR抗体用作对照抗体。表19示出了测定法的IC_{50}值。

[0834] 表19.

[0835]

	pEGFR（IC_{50}，nM）		pMet（IC_{50}，nM）	
细胞系	H292	H1975	H292	H1975
抗体				
EM1-mAb	8.6-29	1.5	0.55－0.83	0.64
E1-F405L-gp120-K409R	10.9-13.1	ND	0.7-4	ND
亲本EGFR（F405L）mAb*	1.5	ND	无效果	ND

[0836] *抗体具有低岩藻糖含量

[0837] 与单价抗体的混合物相比EM1-mAb增强了对pERK和pAKT的抑制(mAbpERK测定法)(mAbpAKT测定法)

[0838] 通过评估mAb对pERK和pAKT下游信号传导的效应，评价了双特异性EGFR/c-Met抗体增强效力的潜能。对于这些实验，将单价对照EGFR与单价对照c-Met抗体的混合物与双特异性EM1-mAb比较。将细胞接种于透明96孔组织培养处理板(Nunc)中含GlutaMAX和25mM Hepes (Invitrogen)且补充有1mM丙酮酸钠(Gibco)、0.1mM NEAA (Gibco)、10％热灭活胎牛血清(Gibco)和7.5ng/mL HGF(R&D Systems目录号294-HGN)的100μL/孔RPMI培养基中，并使之在37℃下在潮湿5％的CO_2气氛中附着过夜。不对细胞进行血清饥饿处理。用不同浓度(终浓度0.11-700nM)的单价对照抗体或EM1-mAb处理细胞30分钟 (pERK测定法)或1小时(pAkt测定法)。

[0839] 使用下列试剂盒并根据来自Meso Scale Discovery的制造商说明书，评估细胞的pERK或pAKT水平：磷酸化ERK1/2(Thr202/Tyr204; Thr185/Tyr187)测定法全细胞裂解物试剂盒(目录号K151DWD)、磷酸化Akt(Ser473)测定法全细胞裂解物试剂盒(目录号K151CAD)、

磷酸化Akt(Thr308)测定法全细胞裂解物试剂盒(目录号K151DYD)。对于pERK测定法,将细胞裂解,并将全细胞裂解物加入包被有抗磷酸化 ERK1/2抗体(识别在残基Thr202和Tyr204处磷酸化的ERK1以及在残基 Thr185和Tyr187处磷酸化的ERK2)的平板上,并且用与MSD SULFO- TAG™试剂缀合的抗全ERK1/2抗体检测磷酸化ERK1/2。对于pAKT Ser473测定法,捕获抗体是抗全AKT抗体并且检测抗体是与MSD SULFO- TAG™试剂缀合的抗pAKT Ser473抗体。对于pAKT Thr308测定法,捕获抗体是抗全AKT抗体并且检测抗体是与MSD SULFO-TAG™试剂缀合的抗 pAKT Thr308抗体。

[0840] 使用制造商安装的测定专用默认设置,在SECTOR®成像器6000仪器 (Meso Scale Discovery)上读取平板。将数据作为电化学发光信号对抗体浓度的对数作图,并且使用GraphPad Prism 5软件将数据拟合到具有可变斜率的S形剂量响应来测定IC_{50}值。NCI-H292、H1975和SKMES-1细胞系用于这些测定法。

[0841] 相对于两种单价对照抗体的混合物而言,双特异性EM1-mAb抑制 ERK磷酸化的IC_{50}低约14-63倍,具体取决于所测试的细胞系(表20)。EM1-mAb与两种单价对照抗体的混合物相比改善的效力表明由于EM1- mAb对这些细胞系的增强结合而产生了协作或亲合力效应。与两种单价对照抗体的混合物相比,NCI-H1975细胞系中Ser475(pAKTS475)和 Thr308(pAKTT308)AKT磷酸化的抑制的IC_{50}分别低约75倍和122倍 (表21)。EM1-mAb与两种单价对照抗体的混合物相比改善的效力表明由于EM1-mAb对这些细胞系的增强结合而产生了协作或亲合力效应。因此, EM1-mAb的双特异性质导致对下游信号传导效应子的增强效应。

[0842] 表20.

[0843]

	IC_{50} (nM) pERK		
	抗体		
细胞系	双特异性 EM1-mAb	E1-F405L-gp120-K409R 与 M1-K409R-gp120-F405L 的混合物	双特异性抗体相对于两种单价对照抗体的混合物的倍数变化
H292	0.64	34.94	55
H1975	1.67	106	63
SKMES-1	0.54	7.63	14

[0844] 表21.

[0845]

抗体	IC_{50} (nM) pAKTS473	IC_{50} (nM) pAKTT308
双特异性 EM1-mAb	0.87	0.96
E1-F405L-gp120-K409R 与 M1-K409R-gp120-F405L 的混合物	65	117
两种单价抗体的混合物相对于双特异性抗体的倍数变化	75	122

[0846] 抗体对人瘤细胞生长或活力的抑制

[0847] 通过如下方式评估c-Met依赖性细胞生长的抑制:在暴露于双特异性 EM1-mAb后,测量各种瘤细胞的活力。NCI-H292、SKMES-1、NCI-H1975 和NCI-H3255细胞用于研究。

[0848] 以标准2D和低附着形式培养细胞。厄洛替尼和西妥昔单抗用作对照。表22汇总了该测定法的IC_{50}值。

[0849] 抗体对人瘤细胞生长或活力的抑制-标准2D形式

[0850] 通过如下方式以两种形式评估细胞生长的抑制:在暴露于抗体后,测量NCI-H292和NCI-H1975的活力。对于标准2D形式,将细胞接种于不透明的白色96孔组织培养处理板(PerkinElmer)中含GlutaMAX和25mM Hepes(Invitrogen)且补充有1mM丙酮酸钠(Gibco)、0.1mM NEAA (Gibco)和10%热灭活胎牛血清(Gibco)的RPMI培养基中,并使之在 37℃、5%的CO_2下附着过夜。将细胞用不同浓度的抗体(终浓度0.035- 700nM)以及HGF(7.5ng/mL,R&D Systems目录号294-HGF)处理,然后在37℃、5%的CO_2下温育72小时。一些孔不用HGF或抗体处理,作为对照。使用CellTiter-Glo®试剂(Promega)检测活细胞,并且如实例3在"人瘤细胞生长的抑制(NCI-H292生长和NCI-H322生长测定法)"中所述分析数据。

[0851] 抗体对人瘤细胞生长或活力的抑制-低附着形式

[0852] 为了评估低附着条件下的存活率,将细胞接种于超低附着性96孔板 (Corning Costar)中含GlutaMAX和25mM Hepes且补充有1mM丙酮酸钠 (Gibco)、0.1mM NEAA(Gibco)和10%热灭活胎牛血清(Gibco)的50μL/孔RPMI培养基(Invitrogen)中,并使之在37℃、5%的CO_2下附着过夜。将细胞用不同浓度的抗体(终浓度0.035-700nM)以及HGF (7.5ng/mL,R&D Systems目录号294-HGN)处理,然后在37℃、5%的 CO_2下温育72小时。一些孔不用HGF或抗体处理,作为对照。使用 CellTiter-Glo®试剂(Promega)检测活细胞,并且如以上在实例3的"人瘤细胞生长的抑制(NCI-H292生长和NCI-H322生长测定法)"中所述分析数据,不同的是在读取发光之前将裂解物转移到不透明的白色96孔组织培养处理板(PerkinElmer)中。

[0853] 在标准2D培养中,EM1-mAb以31nM的IC_{50}抑制NCI-H292生长,并且在低附着条件下,以0.64nM的IC_{50}抑制NCI-H292生长。EM-1 mAb 在标准2D和低附着培养中分别以>700nM和0.8-1.35nM的IC_{50}抑制NCI- H1975细胞生长。在表达野生型EGFR和cMet两者的NCI-H292细胞中,与西妥昔单抗相比,EM1-mAb在标准2D培养条件下具有超过22倍改善的效力,并且在低附着培养条件下具有约330倍改善的效力。在表达 L858R、T790M EGFR突变体和野生型cMet的NCI-H1975细胞中,与西妥昔单抗相比,EM-1 mAb在低附着培养条件下具有至少518倍改善的效力。表22示出了测定法的汇总。

[0854] 表22.

[0855]

细胞系	EGFR状态	cMet状态	EM1-mAb标准2D培养IC_{50}(nM)	EM1-mAb低附着IC_{50}(nM)	西妥昔单抗标准2D培养IC_{50}(nM)	西妥昔单抗低附着IC_{50}(nM)
NCI-H292	WT	WT	31	0.64	>700	212
NCI-H1975	L858R、T790M	WT	>700	0.8-1.35	>700	>700

[0856] 厄洛替尼与EM1-mAb的组合有效抑制EGFR突变体细胞系的生长

[0857] 在标准2D培养条件和低附着形式下评价了厄洛替尼加EM1-mAb的组合对细胞生长的抑制。如以上在"抗体对人瘤细胞生长或活力的抑制"中所述接种NCI-H3255和HCC-827细胞。将HGF(7.5ng/mL,R&D Systems 目录号294-HGN)加入细胞,同时用抗体进行处理。细胞使用不同浓度的抗体(终浓度0.11-700nM)或厄洛替尼(终浓度0.46-3000nM)或厄洛替尼加抗体的组合处理,它们各自以递增量以固定比率(例如,最低浓度的组合=最低浓度的抗体

(0.11nM)+最低浓度的厄洛替尼(0.46nM))使用。一些孔不用HGF或抗体处理,作为对照。将细胞在37℃、5%的CO_2下温育72小时,然后使用CellTiter-Glo®试剂(Promega)检测活细胞,并且如以上在"人瘤细胞生长的抑制(NCI-H292生长和NCI-H322生长测定法)"中所述分析数据。表23汇总了该实验的结果。在该表中,各组合的 IC_{50}值是相对于抗体或厄洛替尼而言的,具体取决于括号中指示的内容。

[0858] 在NCI-H3255和HCC-827细胞(EGFR突变体细胞系)中,将EM1- mAb加入厄洛替尼中既提高了对细胞活力的抑制效力,又更有效产生了总共更少的活细胞。在使用标准2D条件的NCI-H3255细胞中,单独厄洛替尼的IC_{50}为122nM,而组合为49nM。相似地,在HCC-827细胞中,单独厄洛替尼的IC_{50}为27nM,而组合为15nM。另外,厄洛替尼加EM1-mAb 的组合比厄洛替尼加西妥昔单抗的组合更有效。因此,在HGF存在下,添加EM1-mAb提高了厄洛替尼在该测定法中的有效性。

[0859] NCI-H3255细胞表达L858R突变体EGFR和扩增的cMet。HCC-827细胞表达在氨基酸位置746和750处具有缺失的EGFR突变体和野生型c- Met。在标准或低附着培养下,与单独厄洛替尼相比,EM1-mAb在厄洛替尼存在下对HCC-827和NCI-3255的活力具有更强效应。

[0860] 表23.

[0861]

样品	EM1 mAb +厄洛替尼 IC_{50} (nM)	厄洛替尼 IC_{50} (nM)
NCI-H3255, 标准 2D 培养	49.0	122
NCI-H3255, 低附着培养	10.6	47.1
HCC-827, 标准 2D 培养	14.6	27.4
HCC-827, 低附着培养	3.5	9.5

[0862] 实例13.在体外细胞系中EM1-mAb的抗体介导的细胞毒性(ADCC)

[0863] ADCC测定法如先前所述执行(Scallon等人,Mol Immunol 44:1524- 15342007)。简言之,通过Ficoll梯度从人血液中纯化PBMCs,并且用作用于ADCC测定法的效应细胞。NCI-H292、NCI-H1975或NCI-H441细胞用作靶细胞,采用1个靶细胞与50个效应细胞的比率。将靶细胞用BATDA(PerkinElmer)在37℃预标记20分钟,洗涤两次并重悬于 DMEM、10%热灭活的FBS、2mM L-谷氨酰胺(均来自Invitrogen)中。组合靶细胞(1×10^4个细胞)和效应细胞(0.5×10^6个细胞),并且将100μl细胞加入96孔U形底部板的孔中。加入另外100μl连同或不连同野生型和蛋白酶抗性mAb构建体。所有样品均一式两份执行。将板以200g离心3分钟,在37℃温育2小时,随后再次以200g离心3分钟。从每个孔中取出总共20μl的上清液,然后加入200μl基于DELPHIA Europium的试剂 (PerkinElmer)并测定细胞溶解。使用Envision 2101多标记微孔板检测仪 (PerkinElmer)来测定荧光。使数据针对使用0.67%的Triton X-100(Sigma Aldrich)的最大细胞毒性和使用下列公式通过在不存在任何抗体的情况下来自靶细胞的BATDA自发释放测定的最小对照标准化:(实验释放-自发释放)/(最大释放-自发释放)x100%。使用GraphPad Prism v5 将数据拟合至S形剂量-响应模型。

[0864] EM1 mAb和对比物的ADCC结果汇总于表24(NCI-H292细胞)、表 25(NCI-H1975细胞)和表26(NCI-H441细胞)及表27(NCI-H1993细胞)中,并且列出了EC_{50}值以及所实现的最大裂解。NCI-H292细胞表达野生型(WT)EGFR、WT c-Met和WT KRAS;NCI-H1975细胞表达突变体 EGFR(L858R T790M)、WT cMet和WT KRAS;NCI-H441表达WT EGFR、WT cMet和突变体KRAS

(G12V),并且NCI-H1993细胞表达 WT EGFR、扩增的cMet、WT KRAS。KRAS也称为GTP酶KRas以及V- Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物。

[0865] 与西妥昔单抗和正常岩藻糖型式EM1-mAb相比,EM1-mAb具有更高效力的ADCC响应,如具有更低EC_{50}值所指示。在所实现的最大裂解方面,与西妥昔单抗和正常岩藻糖双特异性mAb相比,EM1 mAb具有更高的疗效。根据表24-27的概况,EM-1 mAb具有对细胞的ADCC活性,该细胞具有突变体和WT EGFR、WT且水平正常和扩增的cMet,以及WT和突变体KRAS。

[0866] 表24.

[0867]

mAb	效力	R^2	疗效(所实现的最大裂解)
	(EC_{50}μg/ml)		

[0868]

EM1 mAb	0.0058	0.93	19%
抗 EGFR × cMet 正常岩藻糖双特异性 mAb	0.22	0.85	13%
西妥昔单抗	0.0064	0.94	12%

[0869] 表25.

[0870]

mAb	效力 (EC_{50}μg/ml)	R^2	疗效(所实现的最大裂解)
EM1 mAb	0.022	0.91	19%
抗 EGFR × cMet 正常岩藻糖双特异性 mAb	1.8	0.79	13%
西妥昔单抗	0.029	0.70	11%

[0871] 表26.

[0872]

mAb	效力 (EC_{50}μg/ml)	R^2	疗效(所实现的最大裂解)
EM1 mAb	0.022	0.97	24%
抗 EGFR × cMet 正常岩藻糖双特异性 mAb	0.52	0.87	7.9%
西妥昔单抗	0.013	0.85	15%

[0873] 表27.

[0874]

mAb	效力(EC_{50}μg/mL)	R^2	疗效 (所实现的最大裂解)
EM1 mAb	0.0013	0.95	27%
抗EGFR x cMet正常岩藻糖双特异性mAb	0.054	0.87	17%
西妥昔单抗	0.0042	0.76	21%

[0875] 实例14.使用EM1-mAb的瘤疗效研究

[0876] 如实例7“使用双特异性EGFR/c-Met分子的瘤疗效研究”中所述分析 EM1 mAb抵抗瘤生长的疗效。简而言之,使用Cultrex将NCI-H292-HGF 细胞以2×10^6皮下(s.c.)植入雌

性SCID Beige小鼠中。植入后7天，按瘤体积将小鼠分为5组，每组10只小鼠。在每组起始的平均瘤体积在62- 66mm^3(小瘤)范围内之后，开始给药。每周腹腔内(i.p.)给予PBS或治疗剂2次。

[0877] 疗效的评价还采用了SKMES-HGF，即一种用人HGF(肝细胞生长因子)转染的人鳞状细胞癌。将这些细胞以10×10^{6}皮下植入雌性SCID Beige 小鼠中。植入后12天，按瘤体积将这些小鼠分为5组，每组8只小鼠。每组起始的平均瘤体积在98-101mm^3(大瘤)范围内时，开始第一研究。每周2次腹膜内给予PBS或治疗mAb，共给予4周。在较大尺寸瘤研究中，在瘤体积为约200-300mm^{3}后将小鼠分成2组。然后每周用西妥昔单抗 (20mg/kg)或EM1-mAb(20mg/kg)腹膜内处理这些小鼠2次(3周)。

[0878] 数据的汇总示于表28中。图10示出了分子随时间推移的疗效。在 H292-HGF小瘤模型以及SKMES-HGF小瘤模型和大瘤模型中，与西妥昔单抗相比，EM1-mAb具有改善的瘤抑制概况。

[0879] 表28.

[0880]

样品和时间	细胞系	以 mg/kg 计的给药量	部分消退	完全消退
在第 35 天的 EM1	H292-HGF 小瘤	20	10/10	10/10
		5	10/10	10/10
		1	0/10	0/10
在第 35 天的西妥昔单抗	H292-HGF 小瘤	20	0/10	0/10
在第 67 天的 EM1	SKMES - HGF 小瘤	20	0/8	8/8
		5	1/8	6/8
		1	2/8	4/8
在第 67 天的西妥昔单抗		20	0/8	6/8
在第 70 天的 EM1	SKMES – HGF 大瘤	20	4/7	3/7
在第 35 天的西妥昔单抗		20	0/7	0/7

[0881] 表29示出了来自SKMES-HGF瘤的处理组中的瘤尺寸，并且表30示出了抗瘤活性。

[0882] 在低至1mg/kg的多种剂量下，EM1-mAb将SKMES-HGF模型中的瘤生长抑制97％或更多。虽然最初西妥昔单抗非常有效(20mg/kg下88％的 TGI)，但在给药结束后，经西妥昔单抗处理的瘤又重新长出。相反，用5 或20mg/kg的EM1-mAb处理的瘤在研究过程中(>2个月)未重新长出。

[0883] 表29

[0884]

天数	瘤体积（mm^3）				
	媒介物	20mg/kg 的双特异性 EM1	5mg/kg 的双特异性 EM1	1mg/kg 的双特异性 EM1	20mg/kg 的西妥昔单抗
1	99±6	99±7	101±6	101±6	98±5
8	146±14	48±10	49±9	49±10	60±8
15	192±21	9±1	22±10	41±13	44±23
22	326±43	3±2	17±12	33±15	42±23
29	577±55	2±1	15±9	38±17	85±60
36	994±114	0.2±0.1	13±9	26±14	125±62
50	--	0.04±0.04	10±7	18±9	423±115
57	--	0.1±0.2	3±2	21±10	650±116
67	--	0±0	8±7	34±22	1257±151

[0885] 表30

[0886]

处理	在第 36 天的瘤尺寸（mm^3）	T/C（%）	$1000mm^3$ 的 T-C（天数）	*P* 值
媒介物	994±114	--	--	--
20mg/kg 的双特异性 EM1	0.19±0.12	0.02	--	
5mg/kg 的双特异性 EM1	13±9	1.3	--	
1mg/kg 的双特异性 EM1	26±14	2.6	--	
西妥昔单抗（20mg/kg）	125±62	13	31	

[0887] 实例15.体外使用EM1-mAb时对细胞迁移的抑制

[0888] 方法

[0889] 在NIH-1650细胞中评估了EM-mAb和对照单价抗体对抑制瘤细胞迁移的效应。将EGFR突变体细胞系H1650(具有外显子19突变[缺失 E746,A750]的肺细支气管肺泡癌细胞)在正常培养条件(37℃、5%的 CO_2、95%湿度)下培养于组织培养瓶中。所有培养基和补充物按细胞供应商(American Type Culture Collection,Manassas,VA,USA)的建议采用。

[0890] 通过将H1650肺瘤细胞以10,000个细胞/孔及200μL/孔接种于“U”形底超低附着性(ULA)96孔板(Corning,Tewksbury,USA)中来生成球体。这些平板刺激在24小时内自发形成单个细胞球体(在37℃、5%的 CO_2下温育后)并且使球体在正常培养条件下生长四天。

[0891] 在37℃下用无菌水中的0.1%明胶(EMD Millipore,Billerica,USA) 包被圆底96孔板(BD Bioscience)1小时。对于化合物评价研究,将第4 天的10,000个细胞瘤球体(H1650和NCI-H1975)转移到包被的圆底板中,并且在具有20ng/ml的HGF(R&D systems)的稀释系列中使用EM1- mAb、具有低岩藻糖含量的对照单价抗EGFR mAb E1-F405L-gp120-K409R、具有低岩藻糖含量的对照单价抗cMet mAb M1-K409R-gp120- F405L,以及两种单价抗体E1-F405L-gp120-K409R和M1-K409R-gp120- F405L(以低岩藻糖形式制备)的组合进行处理。使用为$IgG_1\kappa$同种型对照 (浓度等于最高药物处理的细胞)的媒介物处理对照。在48

小时处，通过在具有2x物镜的全自动Operetta高内涵成像系统(Perkin Elmer)中使用明视场图像测量迁移细胞所覆盖的面积，分析化合物的效应。通过除以仅培养基的对照以形成相对于对照的细胞迁移百分比而将数据归一化，以此来评估由于处理效应引起的对细胞迁移(总面积)的抑制。因此，小于1的值将抑制细胞迁移。

[0892] 结果

[0893] 与对照单价抗EGRF和抗c-Met抗体E1-F405L-gp120-K409R和M1- K409R-gp120-F405L的组合相比，EM1-mAb在H1650(L858R EGFR突变体)和H1975(L858R/T790M EGFR突变体)细胞中展现出细胞迁移的强效协同抑制。在H1650细胞中，与同种型对照相比，六种最高浓度的EM1- mAb显著抑制了细胞迁移($p<0.001$)。EM1-mAb的EC_{50}值为0.23nM，而单特异性对照抗体的组合的EC_{50}值为4.39nM。因此，与单价对照抗体的组合相比，EM1-mAb在抑制H1650细胞迁移方面约19倍更有效。对于 H1650和H1975细胞而言，EM1-mAb的细胞迁移抑制的水平优于单特异性对照mAb的组合。表31示出了该测定法的EC_{50}值。

[0894] 表31.

[0895]

样品	H1650		H1975
	EC_{50} (nM)	在 30nM 下的抑制	在 30nM 下的抑制
EM1-mAb	0.23	64%	38%
E1-F405L-gp120-K409R*与 M1-K409R-gp120-F405L*的混合物	4.39	59%	20%
E1-F405L - gp120-K409R*	5.44	15%	7%
M1-K409R-gp120-F405L*	7.36	43	10%

[0896] *抗体具有低岩藻糖含量

[0897] 实例16.抗c-Met抗体069和5D5的表位作图

[0898] 使用线性和限制性CLIPS肽技术对抗c-Met mAb 069结合表位作图。对人cMet的SEMA、PSI和Ig域进行肽扫描。使用上述cMet的氨基酸序列利用标准Fmoc化学来合成线性和CLIPS肽，并且使用三氟酸与清除剂进行去保护。使用支架化学连接肽(Chemically linked Peptides on Scaffold，CLIPS)技术在化学支架上合成限制性肽以便重建构象表位(Timmerman等人，J Mol Recognition 20:283，2007)。将线性和限制性肽偶联到PEPSCAN卡并使用基于PEPSCAN的ELISA进行筛选(Slootstra等人，Molecular Diversity 1，87-96，1996)。抗c-Met mab 069结合表位是由 c-Met第239-253位氨基酸PEFRDSYPIKYVHAF(SEQ ID NO:238)和第 346-361位氨基酸FAQSKPDSAEPMDRSA(SEQ ID NO:239)组成的不连续表位。c-Met氨基酸序列以SEQ ID NO:201示出。

[0899] 使用类似方法对mAb 5D5(MetMab，奥纳珠单抗)表位作图。mAb 5D5结合c-Met第325-340位残基PGAQLARQIGASLNDD(SEQ ID NO: 240)。

[0900] 实例17.使用EM1-mAb的体内瘤疗效研究

[0901] 如实例7“使用双特异性EGFR/c-Met分子的瘤疗效研究”以及采用具有EGFR突变或EGFR和/或c-Met扩增的另外瘤细胞系的实例14中所述分析EM1 mAb抵抗瘤生长的疗效。简而言之，将表达人HGF的SNU-5、H1975、HCC827细胞、H1975细胞，或者针对其对厄洛替尼增

强的抗性所选择的HCC827细胞克隆(HCC827-ER1细胞)皮下(s.c.)植入雌性裸小鼠中,不同的是将SNU-5细胞植入CR17/SCID小鼠中。以所指示的剂量和表32中所示的日程,为小鼠腹腔内给予PBS或EM1-mAb、西妥昔单抗 (CAS 205923-56-4)、厄洛替尼(CAS 183321-74-6)、阿法替尼(CAS 439081-18-2),或EM-1 mAb与阿法替尼的组合及EM-1 mAb与厄洛替尼的组合。抗瘤疗效以%TGI(瘤生长抑制)测量,按照100-%T/C计算(在实例7中所述的给定天,T=处理组的平均瘤尺寸;C=对照组的平均瘤尺寸)。

[0902] 在具有原发EGFR激活突变的瘤(不抵抗EGFR TKI)中:(HCC827 瘤,EGFR del(E746,A750)),10mg/kg剂量的EM1-mAb将瘤生长抑制82%。厄洛替尼在该模型中效果相似,厄洛替尼与EM1-mAb的组合也是如此。图11示出了在HCC827瘤模型中治疗剂随时间推移的疗效。

[0903] 在具有野生型EGFR和c-Met基因扩增的瘤(胃癌模型SNU-5)中, EM1-mAb显示出抗瘤活性且瘤完全消退(在第34天98%的TGI,使用单因素方差分析,之后使用Games-Howell进行个体比较得出,与媒介物相比,$p<0.01$)。在该模型中,抗EGFR mAb西妥昔单抗的抗瘤活性较低,在第34天为49%。图12示出了在SNU-5模型中治疗剂随时间推移的疗效。

[0904] 在包含原发EGFR激活突变和T790M EGFR突变的NSCLC模型 (H1975模型)中测试了EM1-mAb,该T790M EGFR突变使瘤保持抵抗第一代EGFR TKI。在植入裸小鼠中的H1975细胞系模型中EM1-mAb以57%的TGI抑制瘤生长(使用Prism 3.03进行对数秩分析得出,与PBS媒介物相比,$p<0.0001$)。如预期,厄洛替尼在具有T790M突变的该模型中没有效果。阿法替尼与EM1-mAb效果相同(57%的TGI)。西妥昔单抗以及 EM1-mAb与阿法替尼的组合最有效,使瘤分别以91%和96%瘤生长抑制发生消退(使用Prism 3.03进行对数秩分析得出,西妥昔单抗与PBS和EM1- mAb+阿法替尼相比及与PBS+阿法替尼媒介物组相比,$p<0.0001$)。c- Met信号传导途径在该模型中未被激活,因为小鼠HGF不结合于人c- Met。

[0905] 在使用慢病毒转导系统进行工程改造而表达人HGF的若干模型中,测试了EM1-mAb。这允许对体内c-Met途径的配体激活进行建模,因为小鼠 HGF不会激活所植入人瘤细胞上的人c-Met。SKMES-HGF模型得出的结果示于实例14和图10中,并且%TGI汇总于表32中。在H1975-HGF模型中 EM1-mAb将瘤生长抑制了71%(使用Prism 3.03进行对数秩分析得出,与 PBS媒介物相比,$p<0.0001$)。阿法替尼、厄洛替尼和西妥昔单抗在该模型中不那么有效。EM1-mAb与阿法替尼的组合非常有效(96%TGI,使用 Prism 3.03进行对数秩分析得出,与PBS+阿法替尼媒介物组相比, $p<0.0001$)。图13示出了在H1975-HGF模型中分子随时间推移的疗效。因此在c-Met途径被激活的瘤模型中,厄洛替尼、阿法替尼和西妥昔单抗失去了其抗瘤疗效。

[0906] 在特征在于原发EGFR激活突变和由于c-Met基因扩增而对第一代 EGFR TKI(厄洛替尼)抗性增强的瘤模型(HCC827-ER1模型)中,测试了EM1-mAb。10mg/kg剂量的EM1-mAb使所植入的HCC827-ER1瘤部分消退,在第25天达86%的TGI,并且比单独的厄洛替尼(在第25天达 65%的TGI)更有效。EM1-mAb与厄洛替尼的组合未进一步改善疗效。图 14示出了分子随时间推移的疗效。

[0907] 因此,在具有野生型EGFR、具有原发激活EGFR突变、具有与对 EGFR治疗剂的抗性相关的EGFR突变T790M的瘤模型中,以及在c-Met 以配体依赖性(自分泌HGF表达)或非配体依赖性(c-Met基因扩增)方式激活的模型中,EM1-mAb展示出疗效。在一些瘤模型中,EM1-

mAb与厄洛替尼或阿法替尼的组合可改善疗效。

[0908] 表32.

[0909]

瘤类型	EGFR	cMet	处理	% TGI（研究天数）；与PBS媒介物相比
SKMES-HGF肺鳞癌	WT	WT	EM1-mAb（20），BIWx4周	100（36）
			西妥昔单抗（20），BIWx4周	88（36）
SNU-5胃癌	WT	AMP	EM1-mAb（10），BIWx4周	98（34）
			西妥昔单抗（10），BIWx4周	49（34）
H1975 NSCLC	L858R; T790M	WT	EM1-mAb（10），BIWx3周	57（18）
			西妥昔单抗（10），BIWx3周	91（18）
			厄洛替尼（50），QDx21天	9（18）
			阿法替尼（15），QDx21天	57（18）
			EM1-mAb（10），BIWx3周+阿法替尼（15），QD×21天	96（18）
H1975-HGF NSCLC	L858R; T790M	WT	EM1-mAb（10），BIWx3周	71（16）
			西妥昔单抗（10），BIWx3周	42（16）
			厄洛替尼（50），QDx21天	20（16）
			阿法替尼（15），QDx21天	29（16）
			EM1-mAb（10），BIWx3周+阿法替尼（15），QDx21天	96（16）
HCC827 NSCLC	del（E746，A750）；AMP	WT	EM1-mAb（10），BIWx4周	82（35）
			厄洛替尼（25），QDx28天	79（35）
			EM1-mAb（10），BIW×3周+	78（35）

[0910]

[0911]

			厄洛替尼（25），QD×28 天	
HCC827-ER1 NSCLC	del（E746，A750）；AMP	AMP	EM1-mAb（10），BIW×4 周	86（25）
			厄洛替尼（25），QD×28 天	65（25）
			EM1-mAb（10），BIW×3 周+厄洛替尼（25），QD×28 天	87（25）

[0912] BIW＝两周一次

[0913] QD＝每天一次

[0914] WT＝野生型

[0915] AMP＝扩增

[0916] 实例18.EM1 mAb诱导的体内EGFR和c-Met的降解

[0917] 为了证实在瘤中EGFR和c-Met被EM1-mAb接合，在20mg/kg EM1- mAb的单次剂量后在不同时间从H1975-HGF瘤取样。制备瘤裂解物，归一化为总蛋白，并且将样品在SDS-PAGE凝胶上电泳。将凝胶转移到硝化纤维素并且针对EGFR(小鼠(mAb)抗人EGFR(EGF-R2)；Santa Cruz Biotechnology，目录号sc-73511)或c-Met(小鼠(mAb)抗人Met (L41G3)；Cell Signaling Technology，目录号3148)进行蛋白质印迹。将EGFR水平归一化到GAPDH；将c-Met水平归一化到肌动蛋白。将来自经EM1-mAb处理的瘤的受体的水平与经PBS处理的瘤的受体水平比较，从而得到％总受体。EM1-mAb处理将H1975-HGF瘤中的总EGFR和cMet 受体水平减少到对照的20％至60％之间，具体取决于所分析的时间点。图 15示出了与PBS相比随时间推移的平均受体水平。pEGFR、pc-Met和 pAKT也在EM1的单次剂量后的72小时减少。

[0918] 实例19.EGFR/c-Met双特异性mAb的IgG_1和IgG_{2o}变体同种型的抗瘤活性比较

[0919] 为了更好地理解效应子功能对H1975-HGF模型中所观察到的疗效的贡献，在EM1-mAb与EM1-mAb变体之间进行比较，该EM1-mAb变体包含的IgG2 Fc在IgG2上具有效应子沉默替换 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S(国际专利申请WO2011/066501中所述的替换)(根据EU索引进行编号)。具有 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S替换的IgG2抗体不与Fc 受体或效应子细胞(诸如NK细胞和巨噬细胞)相互作用。因此EM1-mAb 的IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S变体所观察到的任何活性丧失可表示效应子介导的机制诸如ADCC和/或ADCP所促成的抗瘤活性。在上述H1975-HGF模型中植入瘤细胞后32天，指示了与亲本 EM1-mAb相比，EM1-mAb的IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S变体的抗瘤活性丧失，表明效应子介导的机制促成了EM-1 mAb的功能。图16示出了分子的抗瘤活性。

[0920] 序列表

[0921]

SEQ ID NO:	类型	种类	说明	序列
1	PRT	人工的	Tencon	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	DNA	人工的	POP2220	GGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT TTCTGAAGTTACC
3	DNA	人工的	TC5'loFG	AACACCGTAGATAGAAACGGT
4	DNA	人工的	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCC TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGGATCTACCATGCTG
5	DNA	人工的	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	DNA	人工的	TCF7	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	DNA	人工的	TCF8	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
8	DNA	人工的	TCF9	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	DNA	人工的	TCF10	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
10	DNA	人工的	TCF11	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
11	DNA	人工的	TCF12	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
12	DNA	人工的	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG
13	DNA	人工的	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	DNA	人工的	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	DNA	人工的	Tcon5new 2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAATGGTGATGGTGATGGT GACCACCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG
16	DNA	人工的	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC
17	DNA	人工的	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCATCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCCCAAC TGATCTTCACCAAAC
18	PRT	人工的	不具有met 的P53A1R5-17	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT

[0922]

19	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-17	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-47	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-48	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-37	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-74	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-81	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQE SEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHN VYKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-83	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	人工的	不具有Met的P54CR4-31	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSY VFEHDVMLPLSAEFTT
27	PRT	人工的	不具有Met的P54AR4-83v2	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	人工的	不具有Met的P54CR4-31v2	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSY VFEHDVMLPLSAIFTT
29	PRT	人工的	不具有met的P54AR4-73v2	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
30	DNA	人工的	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC GAA AAA C
31	DNA	人工的	TCON5 E86Ishort	GAG CCG CCG CCA CCG GTT TAA TGG TGA TGG TGA TGG TGA CCA CCG GTG GTG AAG ATC GCA GAC AG
32	PRT	人工的	P114AR5P74-A5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV VVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGG SISVPLSAIFTT
33	PRT	人工的	P114AR5P75-E9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFL RSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGL VSTPLSAIFTT
34	PRT	人工的	P114AR7P92-F3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVNIMGVKGGSI SHPLSAIFTT

[0923]

35	PRT	人工的	P114AR7P92-F6	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36	PRT	人工的	P114AR7P92-G8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37	PRT	人工的	P114AR7P92-H5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38	PRT	人工的	P114AR7P93-D11	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39	PRT	人工的	P114AR7P93-G8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTDLKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40	PRT	人工的	P114AR7P93-H9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41	PRT	人工的	P114AR7P94-A3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
42	PRT	人工的	P114AR7P94-E5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
43	PRT	人工的	P114AR7P95-B9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQILGVKGGSISVPLSAIFTT
44	PRT	人工的	P114AR7P95-D3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISYPLSAIFTT
45	PRT	人工的	P114AR7P95-D4	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46	PRT	人工的	P114AR7P95-E3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
47	PRT	人工的	P114AR7P95-F10	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
48	PRT	人工的	P114AR7P95-G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT

[0924]

49	PRT	人工的	P114AR7P95-H8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
50	PRT	人工的	ECB1	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
51	PRT	人工的	ECB2	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
52	PRT	人工的	ECB3	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
53	PRT	人工的	ECB4	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT
54	PRT	人工的	ECB5	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
55	PRT	人工的	ECB6	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
56	PRT	人工的	ECB7	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT

[0925]

57	PRT	人工的	ECB15	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
58	PRT	人工的	ECB27	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
59	PRT	人工的	ECB60	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPKNLVVSRVT EDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
60	PRT	人工的	ECB37	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
61	PRT	人工的	ECB94	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
62	PRT	人工的	ECB95	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
63	PRT	人工的	ECB96	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
64	PRT	人工的	ECB97	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT

[0926]

65	PRT	人工的	ECB106	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
66	PRT	人工的	ECB107	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
67	PRT	人工的	ECB108	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
68	PRT	人工的	ECB109	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
69	PRT	人工的	ECB118	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
70	PRT	人工的	ECB119	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
71	PRT	人工的	ECB120	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
72	PRT	人工的	ECB121	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT

[0927] SEQ ID NO:73,PRT,智人,EGFR(包含24个氨基酸的信号序列,成熟蛋白质开始于第25位残基)

[0928]

1 MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEEKKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS LQRMFNNCEV

61 VLGNLEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP LENLQIIRGN MYYENSYALA

121 VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFLSNMSMDF

181 QNHLGSCQKC DPSCPNGSCW GAGEENCQKL TKIICAQQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC

241 TGPRESDCLV CRKFRDEATC KDTCPPLMLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNYV

301 VTDHGSCVRA CGADSYEMEE DGVRKCKKCE GPCRKVCNGI GIGEFKDSLS INATNIKHFK

361 NCTSISGDLH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVKE ITGFLLIQAW PENRTDLHAF

421 ENLEIIRGRT KQHGQFSLAV VSLNITSLGL RSLKEISDGD VIISGNKNLC YANTINWKKL

481 FGTSGQKTKI ISNRGENSCK ATGQVCHALC SPEGCWGPEP RDCVSCRNVS RGRECVDKCN

[0929] 541 LLEGEPREFV ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCPAGVM

601 GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGCTG PGLEGCPTNG PKIPSIATGM VGALLLLLVV

661 ALGIGLFMRR RHIVRKRTLR RLLQERELVE PLTPSGEAPN QALLRILKET EFKKIKVLGS

721 GAFGTVYKGL WIPEGEKVKI PVAIKELREA TSPKANKEIL DEAYVMASVD NPHVCRLLGI

781 CLTSTVQLIT QLMPFGCLLD YVREHKDNIG SQYLLNWCVQ IAKGMNYLED RRLVHRDLAA

841 RNVLVKTPQH VKITDFGLAK LLGAEEKEYH AEGGKVPIKW MALESILHRI YTHQSDVWSY

901 GVTVWELMTF GSKPYDGIPA SEISSILEKG ERLPQPPICT IDVYMIMVKC WMIDADSRPK

961 FRELIIEFSK MARDPQRYLV IQGDERMHLP SPTDSNFYRA LMDEEDMDDV VDADEYLIPQ

1021 QGFFSSPSTS RTPLLSSLSA TSNNSTVACI DRNGLQSCPI KEDSFLQRYS SDPTGALTED

1081 SIDDTFLPVP EYINQSVPKR PAGSVQNPVY HNQPLNPAPS

[0930] RDPHYQDPHS TAVGNPEYLN

1141 TVQPTCVNST FDSPAHWAQK GSHQISLDNP DYQQDFFPKE AKPNGIFKGS TAENAEYLRV

1201 APQSSEFIGA

[0931]

74	PRT	智人	EGF	NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIG ERCQYRDLKWWELR

[0932] SEQ ID NO:75,PRT,智人,腱生蛋白-C

1 mgamtqllag vflaflalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf nhvyniklpv

61 gsqcsvdles asgekdlapp sepsesfqeh tvdgenqivf thriniprra cgcaaapdvk

121 ellsrleele nlvsslreqc tagagcclqp atgrldtrpf csgrgnfste gcgcvcepgw

181 kgpncsepec pgnchlrgrc idgqcicddg ftgedcsqla cpsdcndqgk cvngvcicfe

241 gyagadcsre icpvpcseeh gtcvdglcvc hdgfagddcn kplclnncyn rgrcvenecv

301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq

361 cvcdegfagv dcsekrcpad chnrgrcvdg rcecddgftg adcgelkcpn gcsghgrcvn

421 gqcvcdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsdmsc pndchqhgrc

481 vngmcvcddg ytgedcrdrq cprdcsnrgl cvdgqcvced gftgpdcael scpndchgqg

[0933] 541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgq grcvdgqcic hegftgldcg qhscpsdcnn

601 lgqcvsgrci cnegysgedc sevsppkdlv vtevteetvn lawdnemrvt eylvvytpth

661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapeglkf

721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifrnmn kedegeitks lrrpetsyrq tglapgqeye

781 islhivknnt rgpglkrvtt trldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgieltygik

841 dvpgdrttid ltedenqysi gnlkpdteye vslisrrgdm ssnpaketft tgldaprnlr

901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt tltglrpgte

961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpla kfdryrlnys

1021 lptgqwvgvq lprnttsyvl rglepgqeyn vlltaekgrh kskparvkas teqapelenl

1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiiqvqe ankveaarnl tvpgslravd ipglkaatpy
1141 tvsiygviqg yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwda lklnwtapeg ayeyffiqvq
1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitirgvtq dfsttplsve vlteevpdmg
1261 nltvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs meipglragt
1321 pytvtlhgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dglrlnwtaa dnayehfviq
1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls aeastakepe
1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrlle tveynisgae rtahisglpp
1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm asenafdsfl
1561 vtvvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp lraeivteae

[0934] 1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvfdnf vlkirdtkkq sepleitlla pertrditgl
1681 reateyeiel ygiskgrrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw raptaqvesf
1741 rityvpitgg tpsmvtvdgt ktqtrlvkli pgveylvsii amkgfeesep vsgsfttald
1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekvpe itrtvsgntv eyaltdlepa
1861 teytlrifae kgpqksstit akfttdldsp rdltatevqs etalltwrpp rasvtgyllv
1921 yesvdgtvke vivgpdttsy sladlspsth ytakiqalng plrsnmiqti fttigllypf
1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaeal evfcdmtsdg ggwivflrrk ngrenfyqnw
2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaqgqy elrvdlrdhg etafavydkf svgdaktryk
2101 lkvegysgta gdsmayhngr sfstfdkdtd saitncalsy kgafwyrnch rvnlmgrygd
2161 nnhsqgvnwf hwkghehsiq faemklrpsn frnlegrrkr a

[0935]

76	PRT	人工的	Fibcon	tdaptdlqvtnvtdtsitvswtppsatitgyritytpsngpgepkeltvppsstsv titgltpgveyvvsiyalkdnqespplvgtqtt
77	PRT	人工的	纤连蛋白的第10 FN3域（FN10）	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	人工的	接头	GSGS
79	PRT	人工的	接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
80	PRT	人工的	接头	APAP
81	PRT	人工的	接头	APAPAPAPAP
82	PRT	人工的	接头	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	人工的	接头	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP

84	PRT	人工的	接头	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA
85	PRT	人工的	Tencon BC环	TAPDAAFD
86	PRT	人工的	Tencon GF环	KGGHRSN
87	PRT	人工的	P53A1R5-17 BC环	ADPHGFYD
88	PRT	人工的	P54AR4-17 BC环	TYDRDGYD
89	PRT	人工的	P54AR4-47 BC环	WDPFSFYD
90	PRT	人工的	P54AR4-48 BC环	DDPRGFYE
91	PRT	人工的	P54AR4-73 BC环	TWPYADLD
92	PRT	人工的	P54AR4-74 BC环	GYNGDHFD

93	PRT	人工的	P54AR4-81 BC环	DYDLGVYD
94	PRT	人工的	P54AR4-83 BC环	DDPWDFYE
95	PRT	人工的	EGFR的FG环	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	人工的	EGFR的FG环	LGSYVFEHDVM
97	DNA	人工的	>EGFR部分ECB97; P54AR4-83v22	Atgttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccacc
98	DNA	人工的	>EGFR部分ECB15; P54AR4-83v2	Atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgagga cagcgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgg gtacggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagac accaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
99	PRT	人工的	tencon 27	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	人工的	TCL14文库	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXXGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

[0936]

[0937] >SEQ ID NO:101

[0938] PRT

[0939] 智人

[0940] cMet

[0941] 1 mkapavlapg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvnmk yqlpnftaet piqnvilheh
61 hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanlsgg vwkdninmal
121 vvdtyyddql iscgsvnrgt cqrhvfphnh tadiqsevhc ifspqieeps qcpdcvvsal
181 gakvlssvkd rfinffvgnt inssyfpdhp lhsisvrrlk etkdgfmflt dqsyidvlpe
241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtriir fcsinsglhs ymemplecil
301 tekrkkrstk kevfnilqaa yvskpgaqla rqigaslndd ilfgvfaqsk pdsaepmdrs
361 amcafpikyv ndffnkivnk nnvrclqhfy gpnhehcfnr tllrnssgce arrdeyrtef

[0942]

421 ttalqrvdlf mgqfsevllt sistfikgdl tianlgtseg rfmqvvvsrs gpstphvnfl

481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvitgkki tkiplnglgc rhfqscsqcl sappfvqcgw

541 chdkcvrsee clsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf rrnnkfdlkk

601 trvllgnesc tltlsestmn tlkctvgpam nkhfnmsiii snghgttqys tfsyvdpvit

661 sispkygpma ggtlltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk svsnsilecy tpaqtistef

721 avklkidlan retsifsyre dpivyeihpt ksfistwwke plnivsflfc fasggstitg

781 vgknlnsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsnseiicct tpslqqlnlq lplktkaffm

841 ldgilskyfd liyvhnpvfk pfekpvmism gnenvleikg ndidpeavkg evlkvgnksc

901 enihlhseav lctvpndllk lnselniewk qaisstvlgk vivqpdqnft gliagvvsis

961 tallllgff lwlkkrkqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt temvsnesvd

1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi ssplqntvh idlsalnpel

1081 vqavqhvvig psslivhfne vigrghfgcv yhgtlldndg kkihcavksl nritdigevs

1141 qfltegiimk dfshpnvlsl lgiclrsegs plvvlpymkh gdlrnfirne thnptvkdli

1201 gfglqvakgm kylaskkfvh rdlaarncml dekftvkvad fglardmydk eyysvhnktg

1261 aklpvkwmal eslqtqkftt ksdvwsfgvl lwelmtrgap pypdvntfdi tvyllqgrrl

1321 lqpeycpdpl yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrisaifs tfigehyvhv natyvnvkcv

1381 apypsllsse dnaddevdtr pasfwets

[0943]

102	PRT	智人	HGF	ORKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKK TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMS SGVKKEFGHEFDLYE NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG KDLQENYCRNP RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDH TESGKICQRWDHQTP HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAK TCADNTMNDTDVPL ETTECIQGQGEGYRGTVNTIWNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKC KDLRENYCRNPDGS ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQT RSGLTCSMWDKNME DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPIS RCEGDTTPTIVNL DHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESW VLTARQCFPSRD LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLAR PAVLDDFVSTIDLP NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRG KVTLNESEICAG AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFV RVAYYAKWIHKI LTYKVPQS
103	DNA	人工的	>cMET部分ECB97 P114AR7P95-C5v2	Ctgccggctccgaagaacttggtggtgagccgtgttaccgaagatagc gcacgcctgagctggacggcaccggatgcggcgttcgatagcttctgg attcgctatttgagtttctgggtagcggtgaggcaattgttctgacggtgcc gggctctgaacgctcctacgatttgaccggtctgaaaccgggcaccga gtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggtagcatcagcccaccg ctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
104	DNA	人工的	>cMET部分ECB15 P114AR7P94-A3	Ctgccggcaccgaagaacctggttgtcagccgtgtgaccgaggatag cgcacgtttgagctggaccgctccggatgcagcctttgacagcttctgga ttcgttactttgaatttctgggtagcggtgaggcgatcgttctgacggtgccg ggctctgaacgcagctatgatttgacgggcctgaagccgggtactgagt acgtggttaacatcatgggcgttaagggtggtaaaatcagcccgccatt gtccgcgatctttaccacg
105	PRT	人工的	接头	GGGGS
106	PRT	人工的	ECB91	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
107	PRT	人工的	P53A1R5-17v2	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

[0944]

108	PRT	人工的	P54AR4-83v22	ipapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirgiplsaiftt
109	PRT	人工的	P54AR4-83v23	ipapknlvvsevtedsarlswddphafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirgiplsaiftt
110	PRT	人工的	P53A1R5-17v22	ipapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirgiplsaiftt
111	PRT	人工的	P114AR7P94-A3v22	ipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydltglkpgteyvvnilgvkggkisppisaiftt
112	PRT	人工的	P114AR9P121-A6v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
113	PRT	人工的	P114AR9P122-A7v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
114	PRT	人工的	P114AR7P95-C5v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
115	DNA	人工的	ECB97	atgttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagcgcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgtcccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtaccgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaatatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccaccgcaccggcaccggctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtggtgagccgtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccggatgcggcgttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctgggtagcggtgaggcaattgttctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggtctgaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgttaaggcggtagcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
116	DNA	人工的	ECB15	atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacagcgcccgcctgagctgggacgaccgtgggcgttctatgagtctttcctgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggtacggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacaccaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgcctgccgcagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgtcagccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccggatgcagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggtgaggcgatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacggcctgaagccgggtactgagtacgtggttaacatcatgggcgttaagggtggtaaaatcagcccgccattgtccgcgatcttiaccacg
117	PRT	人工的	白蛋白结合域	tidewilkeakekaieeikkagitsdyyfdlinkaktvegvnalkdeilka

[0945]

118	PRT	人工的	ECB18	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa papipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalideilaalp
119	PRT	人工的	ECB28	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa papipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalideilaalp
120	PRT	人工的	ECB38	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa papipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltv pgsersydltglkpgteyvvnimgvkggkisppisaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalideilaalp
121	PRT	人工的	ECB39	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa papipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltv pgsersydltglkpgteyvvnimgvkggkisppisaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalideilaalp
122	PRT	人工的	具有Met的 P53A1R5-17	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	人工的	具有Met的 P54AR4-17	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	人工的	具有Met的 P54AR4-47	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
125	PRT	人工的	具有Met的 P54AR4-48	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
126	PRT	人工的	具有Met的 P54AR4-73	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
127	PRT	人工的	具有Met的 54AR4-74	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
128	PRT	人工的	具有Met的 P54AR4-81	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQ YQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSI YGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
129	PRT	人工的	具有Met的 P54AR4-83	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

[0946]

130	PRT	人工的	具有Met的P54CR4-31	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT
131	PRT	人工的	具有Met的P54AR4-83v2	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
132	PRT	人工的	具有Met的P54CR4-31v2	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
133	PRT	人工的	具有Met的P54AR4-73v2	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
134	PRT	人工的	具有Met的P53A1R5-17v2	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt
135	PRT	人工的	具有Met的P54AR4-83v22	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
136	PRT	人工的	具有Met的P54AR4-83v23	mlpapknlvvsevtedsarlswddphafyesfliqyqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
137	PRT	人工的	具有Met的P53A1R5-17v22	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
138	PRT	人工的	不具有Met的ECB1	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
139	PRT	人工的	不具有Met的ECB2	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
140	PRT	人工的	不具有Met的ECB3	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT

[0947]

141	PRT	人工的	不具有Met的ECB4	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFFIRYDEFLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT
142	PRT	人工的	不具有Met的ECB5	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
143	PRT	人工的	不具有Met的ECB6	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
144	PRT	人工的	不具有Met的ECB7	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
145	PRT	人工的	不具有Met的ECB15	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
146	PRT	人工的	不具有Met的ECB27	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSI SVPLSAIFTT
147	PRT	人工的	不具有Met的ECB60	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPK NLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGS GEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGG KISPPLSAIFTT
148	PRT	人工的	不具有Met的ECB37	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSI SVPLSAIFTT

[0948]

149	PRT	人工的	不具有Met的ECB94	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
150	PRT	人工的	不具有Met的ECB95	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
151	PRT	人工的	不具有Met的ECB96	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
152	PRT	人工的	不具有Met的ECB97	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT
153	PRT	人工的	不具有Met的ECB106	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
154	PRT	人工的	不具有Met的ECB107	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	人工的	不具有Met的ECB108	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
156	PRT	人工的	不具有Met的ECB109	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT

[0949]

157	PRT	人工的	不具有Met的ECB118	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	人工的	不具有Met的ECB119	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	人工的	不具有Met的ECB120	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
160	PRT	人工的	不具有Met的ECB121	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT
161	PRT	人工的	不具有Met的ECB91	ipapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapapLPAPK NLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
162	PRT	人工的	不具有Met的ECB18	ipapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap apipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltv pgsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
163	PRT	人工的	不具有Met的ECB28	ipapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltvp gsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapiae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
164	PRT	人工的	不具有Met的ECB38	ipapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap apipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfefigsgeaivltvp gsersydltglkpgteyvvnimgvkggkisppisaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp

[0950]

165	PRT	人工的	不具有Met的ECB39	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa pipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpg sersydltglkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
166	DNA	人工的	不具有Met的ECB97	ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccaccgcaccggcaccg gctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtggtgagcc gtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccggatgcg gcgttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctgggtagcggtgaggc aattgttctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggtct gaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggt agcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
167	DNA	人工的	不具有Met的ECB15	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgcctgcgc cagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgtca gccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccggatg cagcctttgacagcttctggatlcgttacttlgaatttctgggtagcggtgag gcgatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacggg cctgaagccgggtactgagtacgtggttaacatcatgggcgttaagggtg gtaaaatcagcccgccattgtccgcgatctttaccacg
168	DNA	人工的	>EGFR部分ECB97; 不具有met的 P54AR4-83v22	ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccacc
169	DNA	人工的	>EGFR部分ECB15; 不具有Met的 P54AR4-83v2	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
170	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB94	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
171	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB95	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC

[0951]

172	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB96	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
173	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB97	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSIS PPLSAIFTTC
174	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB106	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
175	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB107	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
176	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB108	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
177	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB109	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSIS PPLSAIFTTC
178	PRT	人工的	具有C-末端半胱氨酸的ECB91	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTTC

[0952] >SEQ ID NO:179

[0953] PRT

[0954] 人工的

[0955] 结合EGFR的FN3域的FG环

[0956] HNVYKDTNX$_9$RGL；

[0957] 其中X$_9$为M或I

[0958] >SEQ ID NO:180

[0959] PRT

[0960] 人工的

[0961] 结合EGFR的FN3域的FG环

[0962] LGSYVFEHDVML(SEQ ID NO:180)，

[0963] >SEQ ID NO:181

[0964] PRT

[0965] 人工的

[0966] 结合EGFR的FN3域的BC环

[0967] $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:181)；其中

[0968] X_1为A、T、G或D；

[0969] X_2为A、D、Y或W；

[0970] X_3为P、D或N；

[0971] X_4为L或不存在；

[0972] X_5为D、H、R、G、Y或W；

[0973] X_6为G、D或A；

[0974] X_7为A、F、G、H或D；并且

[0975] X_8为Y、F或L。

[0976] >SEQ ID NO:182

[0977] PRT

[0978] 人工的

[0979] 结合EGF的RFN3域

[0980] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKV GEAINLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX$_9$RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO:182)，

[0981] X_1为A、T、G或D；

[0982] X_2为A、D、Y或W；

[0983] X_3为P、D或N；

[0984] X_4为L或不存在；

[0985] X_5为D、H、R、G、Y或W；

[0986] X_6为G、D或A；

[0987] X_7为A、F、G、H或D；

[0988] X_8为Y、F或L；并且

[0989] X_9为M或I

[0990] >SEQ ID NO:183

[0991] PRT

[0992] 人工的

[0993] 结合EGFR的FN3域

[0994] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKV GEAINLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO:183)，

[0995] 其中

[0996] X_1为A、T、G或D；

[0997] X_2为A、D、Y或W；

[0998] X_3为P、D或N；

[0999] X_4为L或不存在；

[1000] X_5为D、H、R、G、Y或W；

[1001] X_6为G、D或A；

[1002] X_7为A、F、G、H或D；并且

[1003] X_8为Y、F或L。

[1004] >SEQ ID NO:184

[1005] PRT

[1006] 人工的

[1007] 结合c-Met的FN3域C链和CD环序列

[1008] $DSFX_{10}IRYX_{11}E\ X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$(SEQ ID NO:184)，其中

[1009] X_{10}为W、F或V；

[1010] X_{11}为D、F或L；

[1011] X_{12}为V、F或L；

[1012] X_{13}为V、L或T；

[1013] X_{14}为V、R、G、L、T或S；

[1014] X_{15}为G、S、A、T或K；并且

[1015] X_{16}为E或D；并且

[1016] >SEQ ID NO:185

[1017] PRT

[1018] 人工的

[1019] 结合c-Met的FN3域F链和FG环

[1020] $TEYX_{17}VX_{18}IX_{19}X_{20}V\ KGGX_{21}X_{22}SX_{23}$(SEQ ID NO:185)，其中

[1021] X_{17}为Y、W、I、V、G或A；

[1022] X_{18}为N、T、Q或G；

[1023] X_{19}为L、M、N或I；

[1024] X_{20}为G或S；

[1025] X_{21}为S、L、G、Y、T、R、H或K；

[1026] X_{22}为I、V或L；并且

[1027] X_{23}为V、T、H、I、P、Y或L。

[1028] >SEQ ID NO:186

[1029] PRT

[1030] 人工的

[1031] 结合c-Met的FN3域

[1032] $LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF\ DSFX_{10}IRYX_{11}E\ X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}\ AIVLTVPGSERSY\ DLTGLKPGTEYX_{17}VX_{18}IX_{19}X_{20}VKGGX_{21}X_{22}SX_{23}PL\ SAEFTT$(SEQ ID NO:186)，

[1033] 其中

[1034] X_{10}为W、F或V；并且

[1035] X_{11}为D、F或L；

[1036] X_{12}为V、F或L；

[1037] X_{13}为V、L或T；

[1038] X_{14}为V、R、G、L、T或S；

[1039] X_{15}为G、S、A、T或K；

[1040] X_{16}为E或D；

[1041] X_{17}为Y、W、I、V、G或A；

[1042] X_{18}为N、T、Q或G；

[1043] X_{19}为L、M、N或I；

[1044] X_{20}为G或S；

[1045] X_{21}为S、L、G、Y、T、R、H或K；

[1046] X_{22}为I、V或L；并且

[1047] X_{23}为V、T、H、I、P、Y或L。

[1048] >SEQ ID NO:187

[1049] PRT

[1050] 人工的

[1051] 包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的EGFR FN3域的分子

[1052] LPAPKNLVVSX$_{24}$VTX$_{25}$DSX$_{26}$RLSWDDPX$_{27}$AFYX$_{28}$SFLIQYQX$_{29}$SEK VGEAIX$_{30}$LTVPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSIYX$_{31}$VHNVYKDTNX$_{32}$ RGLPLSAX$_{33}$FTT(SEQ ID NO:187)，其中

[1053] X_{24}为E、N或R；

[1054] X_{25}为E或P；

[1055] X_{26}为L或A；

[1056] X_{27}为H或W；

[1057] X_{28}为E或D；

[1058] X_{29}为E或P；

[1059] X_{30}为N或V；

[1060] X_{31}为G或Y；

[1061] X_{32}为M或I；并且

[1062] X_{33}为E或I；

[1063] >SEQ ID NO:188

[1064] 包含双特异性EGFR/c-Met FN3域的c-Met FN3域的分子

[1065] LPAPKNLVVSX$_{34}$VTX$_{35}$DSX$_{36}$RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX$_{37}$FX$_{38}$X$_{39}$ X$_{40}$GX$_{41}$AIX$_{42}$LTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNIX$_{43}$X$_{44}$VKGGX$_{45}$ISP PLSAX$_{46}$FTT(SEQ ID NO:188)；其中

[1066] X_{34}为E、N或R；

[1067] X_{35}为E或P；

[1068] X_{36}为L或A；

[1069] X_{37}为E或P；

[1070] X_{38}为V或L；

[1071] X_{39}为G或S；

[1072] X_{40}为S或K；

[1073] X_{41}为E或D；

[1074] X_{42}为N或V；

[1075] X_{43}为L或M；

[1076] X_{44}为G或S；

[1077] X_{45}为S或K；并且

[1078] X_{46}为E或I。

[1079] >SEQ ID NO:189

[1080] EGFR mAb E1 VH

[1081] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGR FTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVS S

[1082] >SEQ ID NO:190

[1083] EGFR mAb E1 VL

[1084] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSES GTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

[1085] >SEQ ID NO:191

[1086] EGFR mAb E2 VH

[1087] 1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY

[1088] 61 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL WGRGTLVTVS

[1089] 121 S

[1090] >SEQ ID NO:192

[1091] EGFR mAb E2 VL

[1092] 1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA

[1093] 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK

[1094] >SEQ ID NO:193

[1095] cMet mAb M1 VH

[1096] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLE WMGWISAYNGYTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLVTVSS

[1097] >SEQ ID NO:194

[1098] cMet mAb M1VL

[1099] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKL LIYAASSLLSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP -ITFGQGTRLEIK

[1100] >SEQ ID NO:195

[1101] cMet mAb M2 VH

[1102] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRL EWVATISDDGSYTYYPDSVKGR FTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDT AMYYCAREGLYYYGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSS

[1103] >SEQ ID NO:196

[1104] cMet mAb M2 VL

[1105] QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIY DASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQIT FGQGTRLEIK

[1106] >SEQ ID NO:197

[1107] 具有F405L的Gp120重链

[1108] Qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapgqrfewmgwinpyngnkefsakfq drvtftadtsantaymelrslrsadtavyycarvgpyswddspqdnyymdvwgkgttvivssastkgp svfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgt qtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvv dvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpa piektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvld sdgsfllyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

[1109] >SEQ ID NO:198

[1110] 具有K409R的Gp120重链

[1111] Qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapgqrfewmgwinpyngnkefsakfq drvtftadtsantaymelrslrsadtavyycarvgpyswddspqdnyymdvwgkgttvivssastkgp svfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgt qtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvv dvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpa piektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvld sdgsfflysrltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

[1112] >SEQ ID NO:199

[1113] EM1-mAb H1(抗EGFR,405L)

[1114] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[1115] >SEQ ID NO:200

[1116] EM-1 mAb L1

[1117] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSES GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPL TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1118] >SEQ ID NO:201

[1119] EM-1 mAb H2(K409R,抗cMet)

[1120] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLE WMGWISAYNGYTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT

QKSL SLSPGK

[1121] >SEQ ID NO:202

[1122] EM-1 mAb L2

[1123] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKL LIYAASSLLSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP ITFGQGTRLEIK

[1124] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[1125] >SEQ ID NO:203

[1126] H1恒定区

[1127] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

[1128] >SEQ ID NO:204

[1129] H2恒定区

[1130] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFLLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

[1131] >SEQ ID NO:205

[1132] EM1-mAb H1 cDNA pdr000015499

[1133] caggtgcagctggtcgagagcggcggaggggtggtgcagcccggcagaagcctgaggctgtcctgcgc cgccagcggcttcaccttcagcacctacggcatgcactgggtgcggcaggccccaggcaagggcctgga gtgggt ggccgtgatctgggacgacggcagctacaagtactacggcgacagcgtgaagggcaggttcac catcagcaggga caacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctgagggccgaggacaccg ccgtgtactactgcgccag ggacggcatcaccatggtgcggggcgtgatgaaggactacttcgactactgg ggccagggcaccctggtgaccgt gagcagcgccagcaccaagggcccaagcgtgttcccccctggcccc cagcagcaagagcaccagcggcggcacagc cgccctgggctgcctggtgaaggactacttccccgagc cagtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacctc cggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagc agcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgaccgtgcccag cagcagcctgggcacccagacctacatct gcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagt ggagcccaagagctgcgacaag acccacacctgccccccctgcccagccccagagctgctgggcggacccagcgt gttcctgttcccccca agcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtggtggtgga cgtgagccacg aggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaa gccca gagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaa cggcaaggaatacaagtgcaaggtctccaacaaggccctgccagccccccatcgaaaagaccatcagcaa ggccaa gggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgcccccccagccgggaggagatgaccaag aaccaggtgtccct gacctgtctggtgaagggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa cggccagcccgagaacaa

ctacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttcctcctgtac agcaagctgaccgtggacaagtc caggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgag gccctgcacaaccactacacccagaagtc cctgagcctgagccccggcaaatga

[1134] >SEQ ID NO:206

[1135] EM1-mAb L1 cDNA pDR000015499

[1136] Atccagctgacccagagccccagcagcctgagcgccagcgtgggcgaccgggtgaccatcacctgccg ggccagccaggacatcagcagcgccctggtctggtatcagcagaagcccggcaaggcccccaagctgct gatcta cgacgccagctccctggaaagcggcgtgcccagccggttcagcggcagcgagagcggcaccg acttcaccctgac catcagcagcctgcagcccgaggacttcgccacctactactgccagcagttcaacagct acccccctgacctttgg cggcggaacaaaggtggagatcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatc ttcccccccagcgacgagca gctgaagagcggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttctacc cccgggaggccaaggtgcagtggaa ggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgt caccgagcaggacagcaaggactccacctacag cctgagcagcaccctgaccctgtccaaggccgacta cgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccacca gggcctgtccagccccgtgaccaagagctt caacaggggcgagtgctga

[1137] >SEQ ID NO:207

[1138] EM-1 mAb H2 cDNA pDR000016584

[1139] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcgaga cttctggttacacctttaccagctatggtatcagctgggtgcgacaggcccctggacacgggcttgagtggat gggatggatcagcgcttacaatggttacacaaactatgcacagaagctccagggcagggtcaccatgacca caga cacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtatta ctgtgcgag agatctgagaggaactaactactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctc agcctccaccaa gggcccaagcgtgttccctctggcccccagcagcaagagcacatctggcggaacagc cgccctgggctgcctggt gaaagactacttccccgagcccgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctga ccagcggcgtgcacaccttcc agccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgtccagcgtggtgac cgtgcccagcagctccctgggcaccca gacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaa ggtggacaagcgggtggaacccaagagctgcga caagacccacacctgtccccctgccctgcccctga actgctgggcggaccctccgtgttcctgttccccccaaa gcccaaggacaccctgatgatcagccggaccc ccgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccc tgaagtgaagttcaattggtacgtggac ggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagta caacagcacctaccgggtggt gtccgtgctgacagtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtg caaggtctccaacaag gccctgcctgctcccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccccgcgagcc tcaggtgtac acactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaaagg cttcta ccccagcgatatcgccgtggaatgggagagcaacggacagcccgagaacaactacaagaccacccccc ctgtgctggacagcgacggctccttcttcctgtactctcggctgaccgtggacaagagccggtggcagcag ggaa acgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcc tgagccccgggaagtga

[1140] >SEQ ID NO:208

[1141] EM-1 mAb L2 cDNA pDR000016584

[1142] Gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtccgcctctgtgggcgacagagtgaccatcacctg tcg ggcctcccagggcatctccaactggctggcctggttccagcacaagcccggcaaggcccccaagctgctg a

tctacgccgcctcctccctgctgtccggcgtgccctccagattctccggctctggctccggcaccgacttca ccc tgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgccacctactactgccagcaggccaactccttcccca tcacct tcggccagggcacccggctggaaatcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccc cccagcgacg agcagctgaagagcggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttctacccccgg gaggccaaggtgcagt ggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccg agcaggacagcaaggactccacct acagcctgagcagcaccctgaccctgtccaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccc accagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaaca ggggcgagtgctga

[1143] >SEQ ID NO:209

[1144] Gp120轻链

[1145] Eivltqspgtlslspgeratfscrsshsirsrrvawyqhkpgqaprlvihgvsnrasgisdrfsgsgs gtdftl titrvepedfalyycqvygassytfgqgtklerkrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypr eak vqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

[1146] >SEQ ID NO:210

[1147] E1 HC1 HCDR1

[1148] TYGMH

[1149] >SEQ ID NO:211

[1150] E1 HC1 HCDR2

[1151] VIWDDGSYKYYGDSVKG

[1152] >SEQ ID NO:212

[1153] E1 HC1 HCDR3

[1154] DGITMVRGVMKDYFDY

[1155] >SEQ ID NO:213

[1156] E1 LC1 LCDR1

[1157] RASQDISSALV

[1158] >SEQ ID NO:214

[1159] E1 LC1 LCDR2

[1160] DASSLES

[1161] >SEQ ID NO:215

[1162] E1 LC1 LCDR3

[1163] QQFNSYPLT

[1164] >SEQ ID NO:216

[1165] E1 HC2 HCDR1

[1166] SYGIS

[1167] >SEQ ID NO:217

[1168] E1 HC2 HCDR2

[1169] WISAYNGYTNYAQKLQG

[1170] >SEQ ID NO:218

[1171] E1 HC2 HCDR3

[1172] DLRGTNYFDY

[1173] >SEQ ID NO:219

[1174] E1 LC2 LCDR1

[1175] RASQGISNWLA

[1176] >SEQ ID NO:220

[1177] E1 LC2 LCDR2

[1178] AASSLLS

[1179] >SEQ ID NO:221

[1180] E1 LC2 LCDR3

[1181] QQANSFPIT

[1182] >SEQ ID NO:222

[1183] E2 mAB HC1 HCDR1

[1184] SYWMN

[1185] >SEQ ID NO:223

[1186] E2 mAb HC1 HCDR2

[1187] NIKKDGSEKYYVDSVKG

[1188] >SEQ ID NO:224

[1189] E2 mAb HC1 HCDR3

[1190] DLGWGWGWYFDL

[1191] >SEQ ID NO:225

[1192] E2 mAB LC1 LCDR1

[1193] RASQSVSSYLA

[1194] >SEQ ID NO:226

[1195] E2 mAb LC1 LCDR2

[1196] DASNRAT

[1197] >SEQ ID NO:227

[1198] E2 mAb LC1 LCDR3

[1199] QQRSNWPPT

[1200] >SEQ ID NO:228

[1201] E2 mAB HC2 HCDR1

[1202] DYYMY

[1203] >SEQ ID NO:229

[1204] E2 mAb HC2 HCDR2

[1205] TISDDGSYTYYPDSVKG

[1206] >SEQ ID NO:230

[1207] E2 mAb HC2 HCDR3

[1208] EGLYYYGSGSYYNQDY

[1209] >SEQ ID NO:231

[1210] E2 mAB LC2 LCDR1

[1211] RASQGLSSALA

[1212] >SEQ ID NO:232

[1213] E2 mAb LC2 LCDR2

[1214] DASSLES

[1215] >SEQ ID NO:233

[1216] E2 mAb LC2 LCDR3

[1217] QQFTSYPQIT

[1218] >SEQ ID NO:234

[1219] E2 mAb HC1(EGFR-F405L)

[1220] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL WGRGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[1221] >SEQ ID NO:235

[1222] E2 mAb LC1(EGFR)

[1223] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[1224] >SEQ ID NO:236

[1225] E2 mAb HC2(c-Met-K409R)

[1226] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRL EWVATISDDGSYTYYPDSVKGR FTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDT AMYYCAREGLYYYGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

[1227] >SEQ ID NO:237

[1228] E2 mAb LC2(cMet)

[1229] QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIY DASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQIT FGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[1230] >SEQ ID NO:238

[1231] mAb 069的c-Met不连续表位

[1232] PEFRDSYPIKYVHAF

[1233] >SEQ ID NO:239

[1234] mAb 069的c-Met不连续表位

[1235] FAQSKPDSAEPMDRSA

[1236] >SEQ ID nO:240

[1237] 5D5 mAb表位

[1238] PGAQLARQIGASLNDD

序列表

<110> 詹森生物科技公司
<120> 双特异性EGFR/c-Met抗体
<130> JBI5032WOPCT
<150> 61/728,912
<151> 2012-11-21
<150> 61/782,550
<151> 2013-03-14
<150> 61/809,541
<151> 2013-04-08
<150> 61/864,717
<151> 2013-08-12
<150> 61/892,797
<151> 2013-10-18
<160> 240
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Tencon FN3支架
<400> 1

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80
Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 2
<211> 58
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 2
ggaaacagga tctaccatgc tgccggcgcc gaaaaacctg gttgtttctg aagttacc 58
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 3
aacaccgtag atagaaacgg t 21
<210> 4
<211> 131
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 4
cggcggttag aacgcggcta caattaatac ataaccccat ccccctgttg acaattaatc 60
atcggctcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacaggat 120
ctaccatgct g 131
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 5
cggcggttag aacgcggcta c 21
<210> 6
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<220>
<221> 尚未归类的特性

<222> (26)..(27)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (29)..(30)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (32)..(33)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (35)..(36)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (38)..(39)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (41)..(42)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (44)..(45)
<223> n为a、c、g或t
<400> 6
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnaacac cgtagataga 60
aacggt 66
<210> 7
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (26)..(27)
<223> n为a、c、g或t

<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (29)..(30)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (32)..(33)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (35)..(36)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (38)..(39)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (41)..(42)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (44)..(45)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (47)..(48)
<223> n为a、c、g或t
<400> 7
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnaa caccgtagat 60
agaaacggt 69
<210> 8
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<220>
<221> 尚未归类的特性

<222> (26)..(27)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (29)..(30)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (32)..(33)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (35)..(36)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (38)..(39)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (41)..(42)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (44)..(45)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (47)..(48)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (50)..(51)
<223> n为a、c、g或t
<400> 8
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta 60
gatagaaacg gt 72
<210> 9
<211> 75

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (26)..(27)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (29)..(30)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (32)..(33)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (35)..(36)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (38)..(39)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (41)..(42)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (44)..(45)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (47)..(48)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (50)..(51)

<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (53)..(54)
<223> n为a、c、g或t
<400> 9
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnaacacc 60
gtagatagaa acggt 75
<210> 10
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (28)..(29)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (31)..(32)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (34)..(35)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (37)..(38)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (40)..(41)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (43)..(44)
<223> n为a、c、g或t
<220>

<221> 尚未归类的特性
<222> (46)..(47)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (49)..(50)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (52)..(53)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (55)..(56)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (58)..(59)
<223> n为a、c、g或t
<400> 10
rmggtggtga attccgcaga cagcggsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsnnsnna 60
acaccgtaga tagaaacggt 80
<210> 11
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (26)..(27)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (29)..(30)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (32)..(33)

<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (35)..(36)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (38)..(39)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (41)..(42)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (44)..(45)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (47)..(48)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (50)..(51)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (53)..(54)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (56)..(57)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (59)..(60)
<223> n为a、c、g或t
<400> 11
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn 60

aacaccgtag atagaaacgg t 81

<210> 12

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

aagatcagtt gcggccgcta gactagaacc gctgccatgg tgatggtgat ggtgaccgcc 60

ggtggtgaat tccgcagaca g 81

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

cggcggttag aacgcggcta caattaatac 30

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 14

catgattacg ccaagctcag aa 22

<210> 15

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 15

gagccgccgc caccggttta atggtgatgg tgatggtgac caccggtggt gaattccgca 60

gacag 65

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 16
aagaaggaga accggtatgc tgccggcgcc gaaaaac 37
<210> 17
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 17
tttgggaagc ttctaggtct cggcggtcac catcaccatc accatggcag cggttctagt 60
ctagcggccc caactgatct tcaccaaac 89
<210> 18
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 18
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90
<210> 19
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 19

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 20
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 20

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 21
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 21

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 22
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 22
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 23
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 23
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 24
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 24

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Phe Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 25
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 25

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 26
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 26
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val Phe
65 70 75 80
Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 27
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 27
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 28
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 28
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val Phe
65 70 75 80
Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 29
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 29
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 30
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 30

Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr
1 5 10 15

Ala Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Ala
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Cys
35

<210> 31
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 31

Gly Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly
1 5 10 15

Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly
20 25 30

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly Thr Gly
35 40 45

Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala
50 55 60

Gly
65

<210> 32
<211> 89

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 32

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 33
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 33

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Phe
20 25 30
Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Leu Val Ser
65 70 75 80
Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 34
<211> 89
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 34

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Ile Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
His Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 35
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 35

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Gly Leu Ser
65 70 75 80
Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 36
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 36
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Val
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser
65 70 75 80
Ile Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85
<210> 37
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 37
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Thr Val Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85
<210> 38
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 结合c-Met的FN3域

<400> 38

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Gly Ile Asn Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser
65 70 75 80
Tyr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 39

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合c-Met的FN3域

<400> 39

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Asp Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Gly Val Thr Ile Asn Gly Val Lys Gly Gly Arg Val Ser
65 70 75 80
Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 40

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合c-Met的FN3域

<400> 40

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly His Ile Ser
65 70 75 80
Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 41

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合c-Met的FN3域

<400> 41

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 42

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合c-Met的FN3域

<400> 42

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Ala Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Arg Val Ser
65 70 75 80
Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 43
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 43
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 44
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 44
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Tyr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 45
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 45
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser
65 70 75 80
Ile Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 46
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 46
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Thr Val Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 47
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 47
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Thr Thr Ala Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 48
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 48
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp

20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Leu Leu Ser Thr Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 49
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 49
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser Lys Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 50
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 50
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125
Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140
Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala
145 150 155 160
Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175
Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly
180 185 190
Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 51
<211> 204
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 51

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Ser Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 52
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 52

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140
Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160
Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175
Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly
180 185 190
Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 53
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 53

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125
Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140
Asp Ser Phe Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160
Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly
180 185 190
Gly Leu Val Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 54
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 54

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125
Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140
Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160
Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175
Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly
180 185 190
Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 55
<211> 205

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 55

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125
Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140
Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160
Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175
Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly
180 185 190
Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 56
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 56

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125
Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140
Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160
Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175
Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly
180 185 190
Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 57
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 57

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190

Thr Thr

<210> 58

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子

<400> 58

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val
130 135 140
Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 59
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 59

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn
100 105 110
Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr
115 120 125
Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe
130 135 140
Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160
Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn

165 170 175
Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile
180 185 190
Phe Thr Thr
195
<210> 60
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 60
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val
130 135 140
Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr
<210> 61
<211> 194

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 61

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 62
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 62

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 63
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 63

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys

65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 64
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 64
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 65
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 65

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe

180 185 190

Thr Thr

<210> 66

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子

<400> 66

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190

Thr Thr

<210> 67

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子

<400> 67

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 68

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子

<400> 68

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu

35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 69
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 69

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 70
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 70

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr
<210> 71
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 71
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr
<210> 72

<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/cMet的双特异性分子
<400> 72

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 73
<211> 1210
<212> PRT
<213> 智人
<400> 73

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn

115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu

130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu

145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met

165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro

180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln

195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg

210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys

225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp

245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro

260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly

275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His

290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu

305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val

325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525
Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
530 535 540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625 630 635 640
Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu

645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915 920 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
930 935 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945 950 955 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
965 970 975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980 985 990
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
1025 1030 1035
Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
1040 1045 1050
Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
1055 1060 1065
Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
1070 1075 1080
Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
1085 1090 1095
Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
1100 1105 1110
Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
1115 1120 1125
His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
1130 1135 1140
Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
1145 1150 1155
Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
1160 1165 1170
Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185
Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200
Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 74
<211> 53
<212> PRT
<213> 智人
<400> 74

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
1 5 10 15
Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
20 25 30
Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
35 40 45
Trp Trp Glu Leu Arg
50

<210> 75
<211> 2201
<212> PRT
<213> 智人
<400> 75

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15
Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys
20 25 30
Arg Gln Ser Gly Val Asn Ala Thr Leu Pro Glu Glu Asn Gln Pro Val
35 40 45
Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
50 55 60
Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
65 70 75 80
Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
85 90 95
Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
100 105 110
Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu
115 120 125
Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala
130 135 140
Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe
145 150 155 160
Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
165 170 175
Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
180 185 190
Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp
195 200 205

Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
210 215 220
Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
225 230 235 240
Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
245 250 255
Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp
260 265 270
Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys
275 280 285
Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
290 295 300
Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
305 310 315 320
Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe
325 330 335
Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
340 345 350
Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
355 360 365
Gly Val Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
370 375 380
Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly
385 390 395 400
Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly
405 410 415
Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu
420 425 430
Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg
435 440 445
Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp
450 455 460
Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys
465 470 475 480
Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys
485 490 495
Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val
500 505 510
Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala

515 520 525

Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn

530 535 540

Gly Gln Cys Val Cys His Glu Gly Phe Met Gly Lys Asp Cys Lys Glu

545 550 555 560

Gln Arg Cys Pro Ser Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asp Gly

565 570 575

Gln Cys Ile Cys His Glu Gly Phe Thr Gly Leu Asp Cys Gly Gln His

580 585 590

Ser Cys Pro Ser Asp Cys Asn Asn Leu Gly Gln Cys Val Ser Gly Arg

595 600 605

Cys Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Gly Glu Asp Cys Ser Glu Val Ser

610 615 620

Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val Asn

625 630 635 640

Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr

645 650 655

Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly

660 665 670

Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr

675 680 685

Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val

690 695 700

Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe

705 710 715 720

Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp

725 730 735

Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu

740 745 750

Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr

755 760 765

Arg Gln Thr Gly Leu Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His

770 775 780

Ile Val Lys Asn Asn Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr

785 790 795 800

Thr Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp

805 810 815

Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly

820 825 830

Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr
835 840 845
Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys
850 855 860
Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met
865 870 875 880
Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Leu Asp Ala Pro
885 890 895
Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp Asn Ser Ile Thr Leu Glu
900 905 910
Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala
915 920 925
Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val Asp Val Pro Lys Ser Gln
930 935 940
Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu
945 950 955 960
Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro
965 970 975
Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln
980 985 990
Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro
995 1000 1005
Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr
1010 1015 1020
Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr
1025 1030 1035
Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu
1040 1045 1050
Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
1055 1060 1065
Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr
1070 1075 1080
Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp
1085 1090 1095
Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys
1100 1105 1110
Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala
1115 1120 1125
Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser

1130 1135 1140

Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala

1145 1150 1155

Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val

1160 1165 1170

Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro

1175 1180 1185

Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp

1190 1195 1200

Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg

1205 1210 1215

Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile

1220 1225 1230

Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser

1235 1240 1245

Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr

1250 1255 1260

Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr

1265 1270 1275

Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala

1280 1285 1290

Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu

1295 1300 1305

Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr

1310 1315 1320

Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu

1325 1330 1335

Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu

1340 1345 1350

Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr

1355 1360 1365

Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu

1370 1375 1380

Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser

1385 1390 1395

Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr

1400 1405 1410

Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val

1415 1420 1425

Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn
1430 1435 1440
Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp
1445 1450 1455
Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile
1460 1465 1470
Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly
1475 1480 1485
Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp
1490 1495 1500
Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys
1505 1510 1515
Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu
1520 1525 1530
Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser
1535 1540 1545
Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val
1550 1555 1560
Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser
1565 1570 1575
Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile
1580 1585 1590
Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr
1595 1600 1605
Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val
1610 1615 1620
Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu
1625 1630 1635
Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys
1640 1645 1650
Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu
1655 1660 1665
Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Ile Thr Gly Leu Arg Glu Ala
1670 1675 1680
Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg
1685 1690 1695
Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro
1700 1705 1710
Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val

1715 1720 1725

Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr

1730 1735 1740

Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp

1745 1750 1755

Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val

1760 1765 1770

Glu Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser

1775 1780 1785

Glu Pro Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu Asp Gly Pro Ser

1790 1795 1800

Gly Leu Val Thr Ala Asn Ile Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Arg

1805 1810 1815

Trp Gln Pro Ala Ile Ala Thr Val Asp Ser Tyr Val Ile Ser Tyr

1820 1825 1830

Thr Gly Glu Lys Val Pro Glu Ile Thr Arg Thr Val Ser Gly Asn

1835 1840 1845

Thr Val Glu Tyr Ala Leu Thr Asp Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr

1850 1855 1860

Thr Leu Arg Ile Phe Ala Glu Lys Gly Pro Gln Lys Ser Ser Thr

1865 1870 1875

Ile Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu Asp Ser Pro Arg Asp Leu

1880 1885 1890

Thr Ala Thr Glu Val Gln Ser Glu Thr Ala Leu Leu Thr Trp Arg

1895 1900 1905

Pro Pro Arg Ala Ser Val Thr Gly Tyr Leu Leu Val Tyr Glu Ser

1910 1915 1920

Val Asp Gly Thr Val Lys Glu Val Ile Val Gly Pro Asp Thr Thr

1925 1930 1935

Ser Tyr Ser Leu Ala Asp Leu Ser Pro Ser Thr His Tyr Thr Ala

1940 1945 1950

Lys Ile Gln Ala Leu Asn Gly Pro Leu Arg Ser Asn Met Ile Gln

1955 1960 1965

Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp

1970 1975 1980

Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr

1985 1990 1995

Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ala Glu Ala Leu Glu Val Phe

2000 2005 2010

Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly Trp Ile Val Phe Leu Arg
2015 2020 2025
Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln Asn Trp Lys Ala Tyr
2030 2035 2040
Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe Trp Leu Gly Leu
2045 2050 2055
Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly Gln Tyr Glu Leu Arg
2060 2065 2070
Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe Ala Val Tyr Asp
2075 2080 2085
Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val
2090 2095 2100
Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn
2105 2110 2115
Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile
2120 2125 2130
Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
2135 2140 2145
Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His
2150 2155 2160
Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser
2165 2170 2175
Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn
2180 2185 2190
Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala
2195 2200

<210> 76
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Fibcon FN3域
<400> 76

Leu Asp Ala Pro Thr Asp Leu Gln Val Thr Asn Val Thr Asp Thr Ser
1 5 10 15
Ile Thr Val Ser Trp Thr Pro Pro Ser Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
20 25 30
Ile Thr Tyr Thr Pro Ser Asn Gly Pro Gly Glu Pro Lys Glu Leu Thr
35 40 45

Val Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Thr Ile Thr Gly Leu Thr Pro Gly
50 55 60
Val Glu Tyr Val Val Ser Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Asn Gln Glu Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Val Gly Thr Gln Thr Thr
85

<210> 77
<211> 94
<212> PRT
<213> 智人
<400> 77
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80
Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 78
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 78
Gly Ser Gly Ser
1

<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25
<210> 80
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 80
Ala Pro Ala Pro
1
<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 81
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10
<210> 82
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 82
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro
20
<210> 83
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头

<400> 83
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
20 25 30
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
35 40
<210> 84
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 84
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala
20 25
<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> tencon BC环
<400> 85
Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
1 5
<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> tencon FG环
<400> 86
Lys Gly Gly His Arg Ser Asn
1 5
<210> 87
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环
<400> 87
Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp
1 5
<210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环
<400> 88
Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp
1 5
<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环
<400> 89
Trp Asp Pro Phe Ser Phe Tyr Asp
1 5
<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环
<400> 90
Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu
1 5
<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环

<400> 91
Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp
1 5
<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环
<400> 92
Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp
1 5
<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环
<400> 93
Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Asp
1 5
<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域BC环
<400> 94
Asp Asp Pro Trp Asp Phe Tyr Glu
1 5
<210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域FG环
<400> 95
His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu
1 5 10

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域FG环
<400> 96
Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met
1 5 10
<210> 97
<211> 285
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 来自ECB97;P54AR4-83V22的结合EGFR的FN3域
<400> 97
atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgaggtta ctgaggacag cgcgcgtctg 60
agctgggacg atccgtgggc gttctacgag agctttctga tccagtatca agagagcgag 120
aaagtcggtg aagcgattgt gctgaccgtc ccgggctccg agcgttccta cgacctgacc 180
ggtttgaagc cgggtaccga gtatacggtg agcatctacg gtgttcacaa tgtctataag 240
gacactaata tccgcggtct gcctctgagc gccattttca ccacc 285
<210> 98
<211> 285
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 来自ECB15;P54AR4-83V2的结合EGFR的FN3域
<400> 98
atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgcctg 60
agctgggacg acccgtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120
aaagttggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgctccta cgatctgacc 180
ggcctgaaac cgggtacgga gtacacggtg tccatttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240
gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattttca ccacc 285
<210> 99
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> tencon27 FN3域

<400> 99

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80
Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 100
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> TCL14文库
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (32)..(32)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (34)..(34)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (36)..(36)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (38)..(38)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (39)..(39)
<223> Xaa为任何氨基酸

<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (40)..(40)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (41)..(41)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (68)..(68)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (70)..(70)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (72)..(72)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (78)..(78)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (79)..(79)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (81)..(81)
<223> Xaa为任何氨基酸
<400> 100

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Xaa
20 25 30
Ile Xaa Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Gly Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser
65 70 75 80
Xaa Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 101
<211> 1408
<212> PRT
<213> 智人
<400> 101

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15
Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
20 25 30
Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45
Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60
Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80
Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95
Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110
Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125
Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140
Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160
Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175
Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190
Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205
His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240
Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255
Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270
Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285
His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300
Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320
Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335
Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365
Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380
Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
385 390 395 400
Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415
Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430
Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
435 440 445
Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460
Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480
Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
485 490 495
Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510
Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
515 520 525
Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys

530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545 550 555 560
Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
565 570 575
Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
580 585 590
Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605
Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620
Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625 630 635 640
Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655
Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670
Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685
His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700
Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720
Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735
Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750
Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu
755 760 765
Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn
770 775 780
Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala
785 790 795 800
Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile
805 810 815
Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro
820 825 830
Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr
835 840 845

Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys
850 855 860
Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly
865 870 875 880
Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly
885 890 895
Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys
900 905 910
Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu
915 920 925
Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
930 935 940
Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser
945 950 955 960
Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg
965 970 975
Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg
980 985 990
Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser
995 1000 1005
Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala
1010 1015 1020
Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser
1025 1030 1035
Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu
1040 1045 1050
Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr
1055 1060 1065
Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala
1070 1075 1080
Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe
1085 1090 1095
Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly
1100 1105 1110
Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys
1115 1120 1125
Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu
1130 1135 1140
Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu

1145 1150 1155

Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val

1160 1165 1170

Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg

1175 1180 1185

Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly

1190 1195 1200

Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe

1205 1210 1215

Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys

1220 1225 1230

Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr

1235 1240 1245

Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu

1250 1255 1260

Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe

1265 1270 1275

Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu

1280 1285 1290

Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe

1295 1300 1305

Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro

1310 1315 1320

Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp

1325 1330 1335

His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser

1340 1345 1350

Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val

1355 1360 1365

His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr

1370 1375 1380

Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp

1385 1390 1395

Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser

1400 1405

<210> 102

<211> 697

<212> PRT

<213> 智人

<400> 102

Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys
1 5 10 15
Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys
20 25 30
Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly
35 40 45
Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln
50 55 60
Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu
65 70 75 80
Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn
85 90 95
Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr
100 105 110
Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu
115 120 125
His Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn
130 135 140
Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr
145 150 155 160
Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser
165 170 175
Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met
180 185 190
Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr
195 200 205
Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe
210 215 220
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys
225 230 235 240
Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr
245 250 255
Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr
260 265 270
Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr
275 280 285
Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His
290 295 300

Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu
305 310 315 320
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr
325 330 335
Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys
340 345 350
Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr
355 360 365
Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp
370 375 380
Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp
385 390 395 400
Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala
405 410 415
His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr
420 425 430
Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn
435 440 445
Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val
450 455 460
Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu
465 470 475 480
Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser
485 490 495
Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp
500 505 510
Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu
515 520 525
Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu
530 535 540
Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp
545 550 555 560
Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro
565 570 575
Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile
580 585 590
Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn
595 600 605
Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser

610 615 620
Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly
625 630 635 640
Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val
645 650 655
Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro
660 665 670
Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile
675 680 685
Ile Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
690 695

<210> 103
<211> 276
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 103
ctgccggctc cgaagaactt ggtggtgagc cgtgttaccg aagatagcgc acgcctgagc 60
tggacggcac cggatgcggc gttcgatagc ttctggattc gctattttga gtttctgggt 120
agcggtgagg caattgttct gacggtgccg ggctctgaac gctcctacga tttgaccggt 180
ctgaaaccgg gcaccgagta tgtggtgaac attctgagcg ttaagggcgg tagcatcagc 240
ccaccgctga gcgcgatctt cacgactggt ggttgc 276
<210> 104
<211> 267
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 104
ctgccggcac cgaagaacct ggttgtcagc cgtgtgaccg aggatagcgc acgtttgagc 60
tggaccgctc cggatgcagc ctttgacagc ttctggattc gttactttga atttctgggt 120
agcggtgagg cgatcgttct gacggtgccg ggctctgaac gcagctatga tttgacgggc 180
ctgaagccgg gtactgagta cgtggttaac atcatgggcg ttaagggtgg taaaatcagc 240
ccgccattgt ccgcgatctt taccacg 267
<210> 105
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头
<400> 105
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 106
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 106
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr
<210> 107
<211> 94

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 107

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 108
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 108

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 109
<211> 94
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 109

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 110
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 110

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 111
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 111
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85
<210> 112
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域
<400> 112
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85
<210> 113
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 结合c-Met的FN3域

<400> 113

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 114

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合c-Met的FN3域

<400> 114

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 115

<211> 591

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子

<400> 115

atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgaggtta ctgaggacag cgcgcgtctg 60
agctgggacg atccgtgggc gttctacgag agctttctga tccagtatca agagagcgag 120
aaagtcggtg aagcgattgt gctgaccgtc ccgggctccg agcgttccta cgacctgacc 180
ggtttgaagc cgggtaccga gtatacggtg agcatctacg gtgttcacaa tgtctataag 240
gacactaata tccgcggtct gcctctgagc gccattttca ccaccgcacc ggcaccggct 300
ccggctcctg ccccgctgcc ggctccgaag aacttggtgg tgagccgtgt taccgaagat 360
agcgcacgcc tgagctggac ggcaccggat gcggcgttcg atagcttctg gattcgctat 420
tttgagtttc tgggtagcgg tgaggcaatt gttctgacgg tgccgggctc tgaacgctcc 480
tacgatttga ccggtctgaa accgggcacc gagtatgtgg tgaacattct gagcgttaag 540
ggcggtagca tcagcccacc gctgagcgcg atcttcacga ctggtggttg c 591

<210> 116
<211> 582
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 116

atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgcctg 60
agctgggacg acccgtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120
aaagttggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgctccta cgatctgacc 180
ggcctgaaac cgggtacgga gtacacggtg tccatttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240
gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattttca ccaccgcgcc tgcgccagcg 300
cctgcaccgg ctccgctgcc ggcaccgaag aacctggttg tcagccgtgt gaccgaggat 360
agcgcacgtt tgagctggac cgctccggat gcagcctttg acagcttctg gattcgttac 420
tttgaatttc tgggtagcgg tgaggcgatc gttctgacgg tgccgggctc tgaacgcagc 480
tatgatttga cgggcctgaa gccgggtact gagtacgtgg ttaacatcat gggcgttaag 540
ggtggtaaaa tcagcccgcc attgtccgcg atctttacca cg 582

<210> 117
<211> 51
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 白蛋白结合域
<400> 117

Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu
1 5 10 15
Glu Leu Lys Lys Ala Gly Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile
20 25 30

Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile
35 40 45
Leu Lys Ala
50

<210> 118
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 118

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val
130 135 140
Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205
Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
225 230 235 240
Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 119
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 119

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val
130 135 140
Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205
Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
225 230 235 240
Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 120
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 120

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205
Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
225 230 235 240
Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 121
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 121

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205
Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
225 230 235 240
Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 122
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 122

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 123
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 123

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys

65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 124
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 124
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 125
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 125
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 126
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 126

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 127
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 127

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr

85 90 95

<210> 128
<211> 96
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 128

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Phe Asp Ser
20 25 30
Phe Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn
35 40 45
Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys
50 55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr
65 70 75 80
Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 129
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 129

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 130
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 130

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val
65 70 75 80
Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 131
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 131

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 132

<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 132

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val
65 70 75 80
Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 133
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 133

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 134
<211> 95

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 134

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 135
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 135

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 136
<211> 95
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 136

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 137
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域
<400> 137

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 138
<211> 204
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 138

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 139
<211> 203
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 139

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu
115 120 125

Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser
130 135 140

Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val
145 150 155 160

Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys
165 170 175

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys
180 185 190

Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 140

<211> 204

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域

<400> 140

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 141
<211> 204
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 141

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr

115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140

Ser Phe Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190

Leu Val Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 142

<211> 204

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域

<400> 142

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu

165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 143
<211> 204
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 143
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 144

<211> 204
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 144

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 145
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 145

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 146
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 146

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190

Thr

<210> 147

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域

<400> 147

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 148
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 148

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
130 135 140
Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu

165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 149
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 149

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 150
<211> 193
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 150

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 151
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 151

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser
130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190

Thr

<210> 152

<211> 193

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域

<400> 152

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 153
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 153

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 154
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 154
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190

Thr

<210> 155

<211> 193

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域

<400> 155

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser
130 135 140
Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190

Thr

<210> 156

<211> 193

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域

<400> 156

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 157

<211> 193

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域

<400> 157

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 158
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 158

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 159
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 159
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser
130 135 140
Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 160
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 160

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 161
<211> 193

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 161

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175
Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr

<210> 162
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 162

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
130 135 140
Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205
Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220
Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240
Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 163
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 163
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
130 135 140
Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205
Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220
Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240
Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 164
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 164
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205
Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220
Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240
Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 165
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 165
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110
Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125
Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140
Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160
Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met
165 170 175
Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190
Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205
Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220
Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240
Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 166
<211> 588
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 166

ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60
tgggacgatc cgtgggcgtt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120

gtcggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt 180
ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac 240
actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgcc attttcacca ccgcaccggc accggctccg 300
gctcctgccc cgctgccggc tccgaagaac ttggtggtga gccgtgttac cgaagatagc 360
gcacgcctga gctggacggc accggatgcg gcgttcgata gcttctggat tcgctatttt 420
gagtttctgg gtagcggtga ggcaattgtt ctgacggtgc cgggctctga acgctcctac 480
gatttgaccg gtctgaaacc gggcaccgag tatgtggtga acattctgag cgttaagggc 540
ggtagcatca gcccaccgct gagcgcgatc ttcacgactg gtggttgc 588

<210> 167
<211> 579
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met结合域
<400> 167

ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60
tgggacgacc cgtgggcgtt ctatgagtct ttcctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120
gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgagc gctcctacga tctgaccggc 180
ctgaaaccgg gtacggagta cacggtgtcc atttacggtg ttcacaatgt gtataaagac 240
accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca ccgcgcctgc gccagcgcct 300
gcaccggctc cgctgccggc accgaagaac ctggttgtca gccgtgtgac cgaggatagc 360
gcacgtttga gctggaccgc tccggatgca gcctttgaca gcttctggat tcgttacttt 420
gaatttctgg gtagcggtga ggcgatcgtt ctgacggtgc cgggctctga acgcagctat 480
gatttgacgg gcctgaagcc gggtactgag tacgtggtta acatcatggg cgttaagggt 540
ggtaaaatca gcccgccatt gtccgcgatc tttaccacg 579

<210> 168
<211> 282
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 来自ECB97的结合EGFR的FN3域
<400> 168

ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60
tgggacgatc cgtgggcgtt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120
gtcggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt 180
ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac 240
actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgcc attttcacca cc 282

<210> 169
<211> 282

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 来自ECB15的结合EGFR的FN3域
<400> 169

ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60
tgggacgacc cgtgggcgtt ctatgagtct ttcctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120
gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgagc gctcctacga tctgaccggc 180
ctgaaaccgg gtacggagta cacggtgtcc atttacggtg ttcacaatgt gtataaagac 240
accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca cc 282

<210> 170
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 170

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 171
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 171

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 172
<211> 195

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 172

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 173
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 173

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 174
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 174

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 175
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 175

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu

100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 176
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 176
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 177
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 177
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys

195

<210> 178
<211> 195
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR/c-Met的双特异性分子
<400> 178

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 179
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 结合EGFR的FN3域的共有FG环
<220>
<221> 变体
<222> (9)..(9)
<223> Xaa可为Met或Ile
<400> 179
His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Xaa Arg Gly Leu
1 5 10
<210> 180
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域的GF环
<400> 180
Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met Leu
1 5 10
<210> 181
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域的共有BC环
<220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可为Ala、Thr、Gly或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (2)..(2)
<223> Xaa可为Ala、Asp、Tyr或Trp
<220>
<221> 变体
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可为Pro、Asp或Asn
<220>
<221> 变体
<222> (4)..(4)
<223> Xaa可为Leu或不存在

<220>
<221> 变体
<222> (5)..(5)
<223> Xaa可为Asp、His、Arg、Gly、Tyr或Trp
<220>
<221> 变体
<222> (6)..(6)
<223> Xaa可为Glu、Asp或Ala
<220>
<221> 变体
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可为Ala、Phe、Gly、His或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (8)..(8)
<223> Xaa可为Tyr、Phe或Leu
<400> 181
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 182
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合EGFR的FN3域共有序列
<220>
<221> 变体
<222> (22)..(22)
<223> Xaa可为Ala、Thr、Gly或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (23)..(23)
<223> Xaa可为Ala、Asp、Tyr或Trp
<220>
<221> 变体
<222> (24)..(24)
<223> Xaa可为Pro、Asp或Asn
<220>
<221> 变体

<222> (25)..(25)
<223> Xaa可为Leu或不存在
<220>
<221> 变体
<222> (26)..(26)
<223> Xaa可为Asp、His、Arg、Gly、Tyr或Trp
<220>
<221> 变体
<222> (27)..(27)
<223> Xaa可为Gly、Asp或Ala
<220>
<221> 变体
<222> (28)..(28)
<223> Xaa可为Ala、Phe、Gly、His或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (29)..(29)
<223> Xaa可为Tyr、Phe或Leu
<220>
<221> 变体
<222> (84)..(84)
<223> Xaa可为Met或Ile
<400> 182

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Xaa Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 183
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 结合EGFR的FN3域共有序列
<220>
<221> 变体
<222> (22)..(22)
<223> Xaa可为Ala、Thr、Gly或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (23)..(23)
<223> Xaa可为Ala、Asp、Tyr或Trp
<220>
<221> 变体
<222> (24)..(24)
<223> Xaa可为Pro、Asp或Asn
<220>
<221> 变体
<222> (25)..(25)
<223> Xaa可为Leu或不存在
<220>
<221> 变体
<222> (26)..(26)
<223> Xaa可为Asp、His、Arg、Gly、Tyr或Trp
<220>
<221> 变体
<222> (27)..(27)
<223> Xaa可为Gly、Asp或Ala
<220>
<221> 变体
<222> (28)..(28)
<223> Xaa可为Ala、Phe、Gly、His或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (29)..(29)
<223> Xaa可为Tyr、Phe或Leu
<400> 183

```
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1               5                  10                  15
Leu Arg Leu Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Phe
            20                  25                  30
```

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val
65 70 75 80
Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 184
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域C链和CD环共有序列
<220>
<221> 变体
<222> (4)..(4)
<223> Xaa为Trp、Phe或Val
<220>
<221> 变体
<222> (8)..(8)
<223> Xaa为Asp、Phe或Leu
<220>
<221> 变体
<222> (10)..(10)
<223> Xaa为Val、Phe或Leu
<220>
<221> 变体
<222> (11)..(11)
<223> Xaa为Val、Leu或Thr
<220>
<221> 变体
<222> (12)..(12)
<223> Xaa为Val、Arg、Gly、Leu、Thr或Ser
<220>
<221> 变体
<222> (13)..(13)
<223> Xaa为Gly、Ser、Ala、Thr或Lys
<220>

<221> 变体
<222> (15)..(15)
<223> Xaa为Glu或Asp
<400> 184
Asp Ser Phe Xaa Ile Arg Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
1 5 10 15
<210> 185
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 结合c-Met的FN3域F链和FG环共有序列
<220>
<221> 变体
<222> (4)..(4)
<223> Xaa为Tyr、Trp、Ile、Val、Gly或Ala
<220>
<221> 变体
<222> (6)..(6)
<223> Xaa为Asn、Thr、Qln或Gly
<220>
<221> 变体
<222> (8)..(8)
<223> Xaa为Leu、Met、Asn或Ile
<220>
<221> 变体
<222> (9)..(9)
<223> Xaa为Gly或Ser
<220>
<221> 变体
<222> (14)..(14)
<223> Xaa为Ser、Leu、Gly、Tyr、Thr、Arg、His或Lys
<220>
<221> 变体
<222> (15)..(15)
<223> Xaa为Ile、Val或Leu
<220>
<221> 变体
<222> (17)..(17)

<223> Xaa为Val、Thr、His、Ile、Pro、Tyr或Leu

<400> 185

Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser
1 5 10 15

Xaa

<210> 186

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合c-Met的FN3域共有序列

<220>

<221> 变体

<222> (32)..(32)

<223> Xaa为Trp、Phe或Val

<220>

<221> 变体

<222> (36)..(36)

<223> Xaa为Asp、Phe或Leu

<220>

<221> 变体

<222> (38)..(38)

<223> Xaa为Val、Phe或Leu

<220>

<221> 变体

<222> (39)..(39)

<223> Xaa为Val、Leu或Thr

<220>

<221> 变体

<222> (40)..(40)

<223> Xaa为Val、Arg、Gly、Leu、Thr或Ser

<220>

<221> 变体

<222> (41)..(41)

<223> Xaa为Gly、Ser、Ala、Thr或Lys

<220>

<221> 变体

<222> (43)..(43)

<223> Xaa为Glu或Asp

<220>
<221> 变体
<222> (68)..(68)
<223> Xaa为Tyr、Trp、Ile、Val、Gly或Ala
<220>
<221> 变体
<222> (70)..(70)
<223> Xaa为Asn、Thr、Qln或Gly
<220>
<221> 变体
<222> (72)..(72)
<223> Xaa为Leu、Met、Asn或Ile
<220>
<221> 变体
<222> (73)..(73)
<223> Xaa为Gly或Ser
<220>
<221> 变体
<222> (78)..(78)
<223> Xaa为Ser、Leu、Gly、Tyr、Thr、Arg、His或Lys
<220>
<221> 变体
<222> (79)..(79)
<223> Xaa为Ile、Val或Leu
<220>
<221> 变体
<222> (81)..(81)
<223> Xaa为Val、Thr、His、Ile、Pro、Tyr或Leu
<400> 186

```
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1               5                  10                  15
Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Xaa
            20                  25                  30
Ile Arg Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Ile Val Leu Thr
        35                  40                  45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
    50                  55                  60
Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser
65                  70                  75                  80
```

Xaa Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 187
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met分子的EGFR共有FN3域
<220>
<221> 变体
<222> (11)..(11)
<223> Xaa为Glu、Asn或Arg
<220>
<221> 变体
<222> (14)..(14)
<223> Xaa为Glu或Pro
<220>
<221> 变体
<222> (17)..(17)
<223> Xaa为Leu或Ala
<220>
<221> 变体
<222> (25)..(25)
<223> Xaa为His或Trp
<220>
<221> 变体
<222> (29)..(29)
<223> Xaa为Glu或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (37)..(37)
<223> Xaa为Glu或Pro
<220>
<221> 变体
<222> (46)..(46)
<223> Xaa为Asn或Val
<220>
<221> 变体
<222> (73)..(73)

<223> Xaa为Gly或Tyr
<220>
<221> 变体
<222> (83)..(83)
<223> Xaa为Met或Ile
<220>
<221> 变体
<222> (91)..(91)
<223> Xaa为Glu或Ile
<400> 187

```
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Xaa Val Thr Xaa Asp Ser
1               5                  10                  15
Xaa Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Xaa Ala Phe Tyr Xaa Ser Phe Leu
            20                  25                  30
Ile Gln Tyr Gln Xaa Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Xaa Leu Thr
        35                  40                  45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
    50                  55                  60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Xaa Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65                  70                  75                  80
Thr Asn Xaa Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Xaa Phe Thr Thr
                85                  90
```

<210> 188
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 双特异性EGFR/c-Met分子的c-Met共有FN3域
<220>
<221> 变体
<222> (11)..(11)
<223> Xaa为Glu、Asn或Arg
<220>
<221> 变体
<222> (14)..(14)
<223> Xaa为Glu或Pro
<220>
<221> 变体
<222> (17)..(17)

<223> Xaa为Leu或Ala
<220>
<221> 变体
<222> (37)..(37)
<223> Xaa为Glu或Pro
<220>
<221> 变体
<222> (39)..(39)
<223> Xaa为Val或Leu
<220>
<221> 变体
<222> (40)..(40)
<223> Xaa为Gly或Ser
<220>
<221> 变体
<222> (41)..(41)
<223> Xaa为Ser或Lys
<220>
<221> 变体
<222> (43)..(43)
<223> Xaa为Glu或Asp
<220>
<221> 变体
<222> (46)..(46)
<223> Xaa为Asn或Val
<220>
<221> 变体
<222> (72)..(72)
<223> Xaa为Leu或Met
<220>
<221> 变体
<222> (73)..(73)
<223> Xaa为Gly或Ser
<220>
<221> 变体
<222> (78)..(78)
<223> Xaa为Ser或Lys
<220>
<221> 变体

<222> (86)..(86)
<223> Xaa为Glu或Ile
<400> 188

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Xaa Val Thr Xaa Asp Ser
1 5 10 15
Xaa Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30
Ile Arg Tyr Phe Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Ile Xaa Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Ile Ser
65 70 75 80
Pro Pro Leu Ser Ala Xaa Phe Thr Thr
85

<210> 189
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人
<400> 189

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 190
<211> 107
<212> PRT

<213> 智人
<400> 190

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 191
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人
<400> 191

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Lys Lys Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Gly Trp Gly Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 192
<211> 107

<212> PRT
<213> 智人
<400> 192

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 193
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人
<400> 193

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 194

<211> 107
<212> PRT
<213> 智人
<400> 194

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 195
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人
<400> 195

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 196
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人
<400> 196

Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1 5 10 15
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser Ser Ala Leu Ala
20 25 30
Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
35 40 45
Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65 70 75 80
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Gln Ile Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 197
<211> 457
<212> PRT
<213> 智人
<400> 197

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
20 25 30
Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
100 105 110
Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ala

115 120 125

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

130 135 140

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

165 170 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu

180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg

210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu

405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 198
<211> 457
<212> PRT
<213> 智人
<400> 198

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
20 25 30
Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
100 105 110
Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ala
115 120 125
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
130 135 140
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145 150 155 160
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165 170 175
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
180 185 190
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
195 200 205
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
210 215 220
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
245 250 255
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
260 265 270
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
275 280 285
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315 320
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
340 345 350
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
355 360 365
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 199
<211> 455
<212> PRT
<213> 智人
<400> 199

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 200

<211> 214

<212> PRT

<213> 智人

<400> 200

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 201
<211> 449
<212> PRT
<213> 智人
<400> 201
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 202
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人
<400> 202

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 203
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人
<400> 203

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 204
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人
<400> 204

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 205
<211> 1368
<212> DNA
<213> 智人
<400> 205

caggtgcagc tggtcgagag cggcggaggg gtggtgcagc ccggcagaag cctgaggctg 60
tcctgcgccg ccagcggctt caccttcagc acctacggca tgcactgggt gcggcaggcc 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggccgtg atctgggacg acggcagcta caagtactac 180
ggcgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacggc 300
atcaccatgg tgcggggcgt gatgaaggac tacttcgact actggggcca gggcaccctg 360
gtgaccgtga gcagcgccag caccaagggc ccaagcgtgt tcccccctggc ccccagcagc 420
aagagcacca gcggcggcac agccgccctg ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag 480
ccagtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc 540
gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcagc 600
ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
aagagagtgg agcccaagag ctgcgacaag acccacacct gccccccctg cccagcccca 720
gagctgctgg gcggacccag cgtgttcctg ttcccccca agcccaagga caccctgatg 780
atcagcagga cccccgaggt gacctgcgtg gtggtggacg tgagccacga ggacccagag 840
gtgaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcaca acgccaagac caagcccaga 900
gaggagcagt acaacagcac ctacagggtg gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac 960
tggctgaacg gcaaggaata caagtgcaag gtctccaaca aggccctgcc agccccatc 1020
gaaaagacca tcagcaaggc caagggccag ccacgggagc cccaggtgta caccctgccc 1080
cccagccggg aggagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc 1140
taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaacggcc agcccgagaa caactacaag 1200
accacccccc cagtgctgga cagcgacggc agcttcctcc tgtacagcaa gctgaccgtg 1260
gacaagtcca ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg 1320
cacaaccact acacccagaa gtccctgagc ctgagccccg gcaaatga 1368

<210> 206
<211> 642
<212> DNA
<213> 智人
<400> 206

atccagctga cccagagccc cagcagcctg agcgccagcg tgggcgaccg ggtgaccatc 60
acctgccggg ccagccagga catcagcagc gccctggtct ggtatcagca gaagcccggc 120
aaggccccca agctgctgat ctacgacgcc agctccctgg aaagcggcgt gcccagccgg 180
ttcagcggca gcgagagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct gcagcccgag 240
gacttcgcca cctactactg ccagcagttc aacagctacc ccctgacctt tggcggcgga 300

acaaaggtgg agatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt ccccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgct ga 642

<210> 207
<211> 1350
<212> DNA
<213> 智人
<400> 207

caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcgaga cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacacg ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtta cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag ggtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
agaggaacta actactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagcc 360
tccaccaagg gcccaagcgt gttccctctg gcccccagca gcaagagcac atctggcgga 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480
aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagcc tgtccagcgt ggtgaccgtg cccagcagct ccctgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagcgggt ggaacccaag 660
agctgcgaca agacccacac ctgtcccccc tgccctgccc ctgaactgct gggcggaccc 720
tccgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgaa 780
gtgacctgcg tggtggtgga cgtgtcccac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac 840
gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccca gagaggaaca gtacaacagc 900
acctaccggg tggtgtccgt gctgacagtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaggccctg cctgctccca tcgagaaaac catcagcaag 1020
gccaagggcc agccccgcga gcctcaggtg tacacactgc ctcccagccg ggaagagatg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaaaggct tctaccccag cgatatcgcc 1140
gtggaatggg agagcaacgg acagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
gacagcgacg gctccttctt cctgtactct cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 1260
cagggaaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1320
aagtccctga gcctgagccc cgggaagtga 1350

<210> 208
<211> 645
<212> DNA
<213> 智人
<400> 208

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtccgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60
atcacctgtc gggcctccca gggcatctcc aactggctgg cctggttcca gcacaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gcctcctccc tgctgtccgg cgtgccctcc 180
agattctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaactcct tccccatcac cttcggccag 300
ggcacccggc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccc 360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gctga 645

<210> 209
<211> 215
<212> PRT
<213> 智人
<400> 209

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
20 25 30
Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
35 40 45
Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 210
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人
<400> 210
Thr Tyr Gly Met His
1 5
<210> 211
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 211
Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 212
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 212
Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15
<210> 213
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 213
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Val
1 5 10
<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人
<400> 214

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5
<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 215
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 216
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人
<400> 216
Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5
<210> 217
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 217
Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15
Gly
<210> 218
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 218
Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 219
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 219
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10
<210> 220

<211> 7
<212> PRT
<213> 智人
<400> 220
Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser
1 5
<210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 221
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
1 5
<210> 222
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人
<400> 222
Ser Tyr Trp Met Asn
1 5
<210> 223
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 223
Asn Ile Lys Lys Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 224
Asp Leu Gly Trp Gly Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10
<210> 225
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 225
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 226
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人
<400> 226
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 227
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
1 5
<210> 228
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人
<400> 228
Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5
<210> 229
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 229
Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 230
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 230
Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 231
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 231
Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10
<210> 232
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人
<400> 232
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5
<210> 233
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 233
Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Gln Ile Thr
1 5 10
<210> 234
<211> 451
<212> PRT
<213> 智人
<400> 234
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Lys Lys Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Gly Trp Gly Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 235
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人
<400> 235

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 236
<211> 455
<212> PRT
<213> 智人
<400> 236

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 237
<211> 213
<212> PRT
<213> 智人
<400> 237

Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1 5 10 15
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser Ser Ala Leu Ala
20 25 30
Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
35 40 45
Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65 70 75 80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Gln Ile Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 238
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人
<400> 238
Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe
1 5 10 15

<210> 239
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 239
Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala
1 5 10 15

<210> 240
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 240
Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp
1 5 10 15

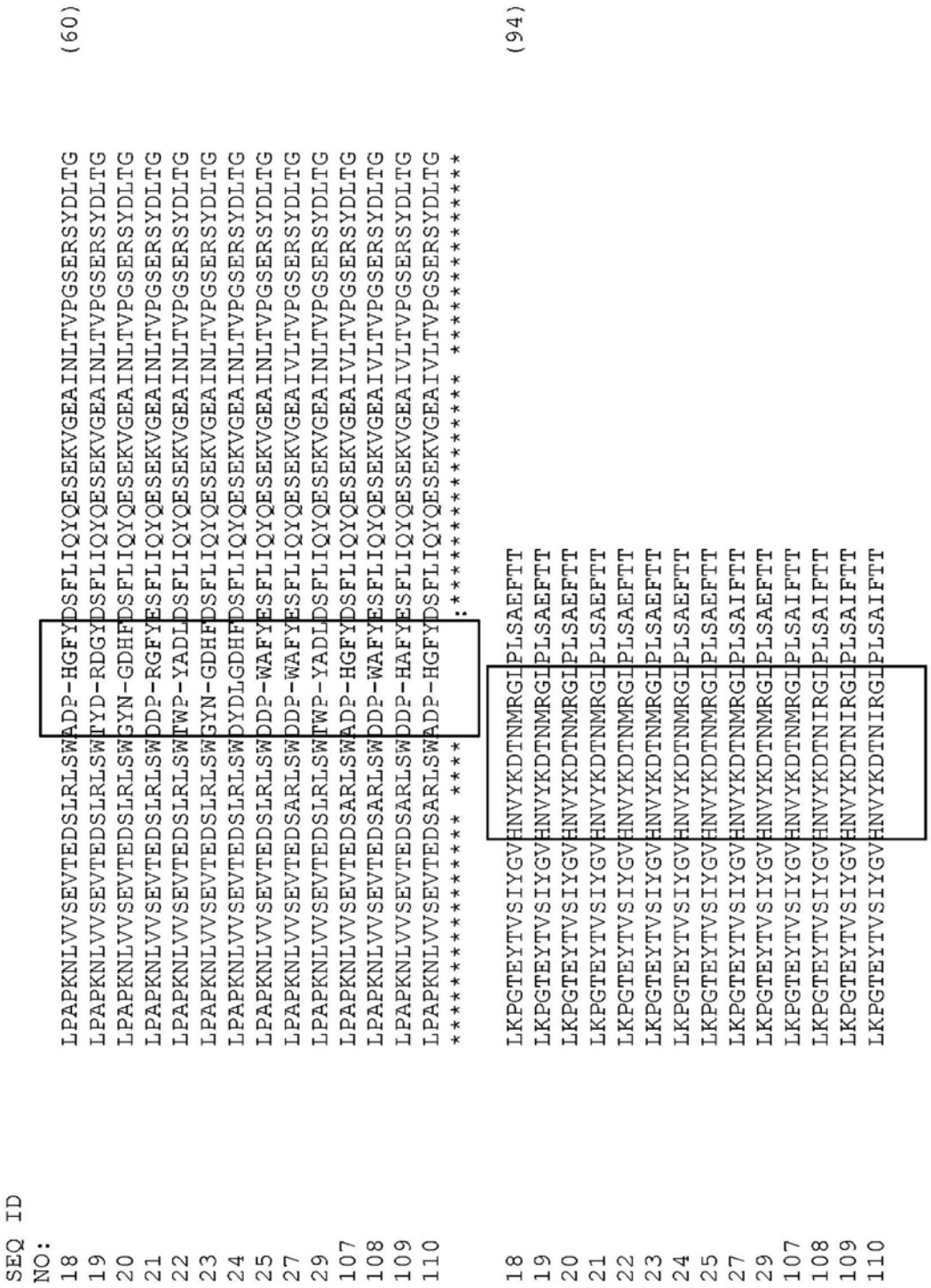

SEQ ID NO:
(60)
(94)
18 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
19 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYD-RDGYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
20 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
21 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-RGFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
22 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
23 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
24 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGDHFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
25 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
27 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
29 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
107 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
108 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
109 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-HAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
110 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
********** **** :********** ********** **********
18 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
19 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
20 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
21 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
22 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
23 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
24 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
25 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
27 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
29 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
107 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
108 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTT
109 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTT
110 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTT

图1A

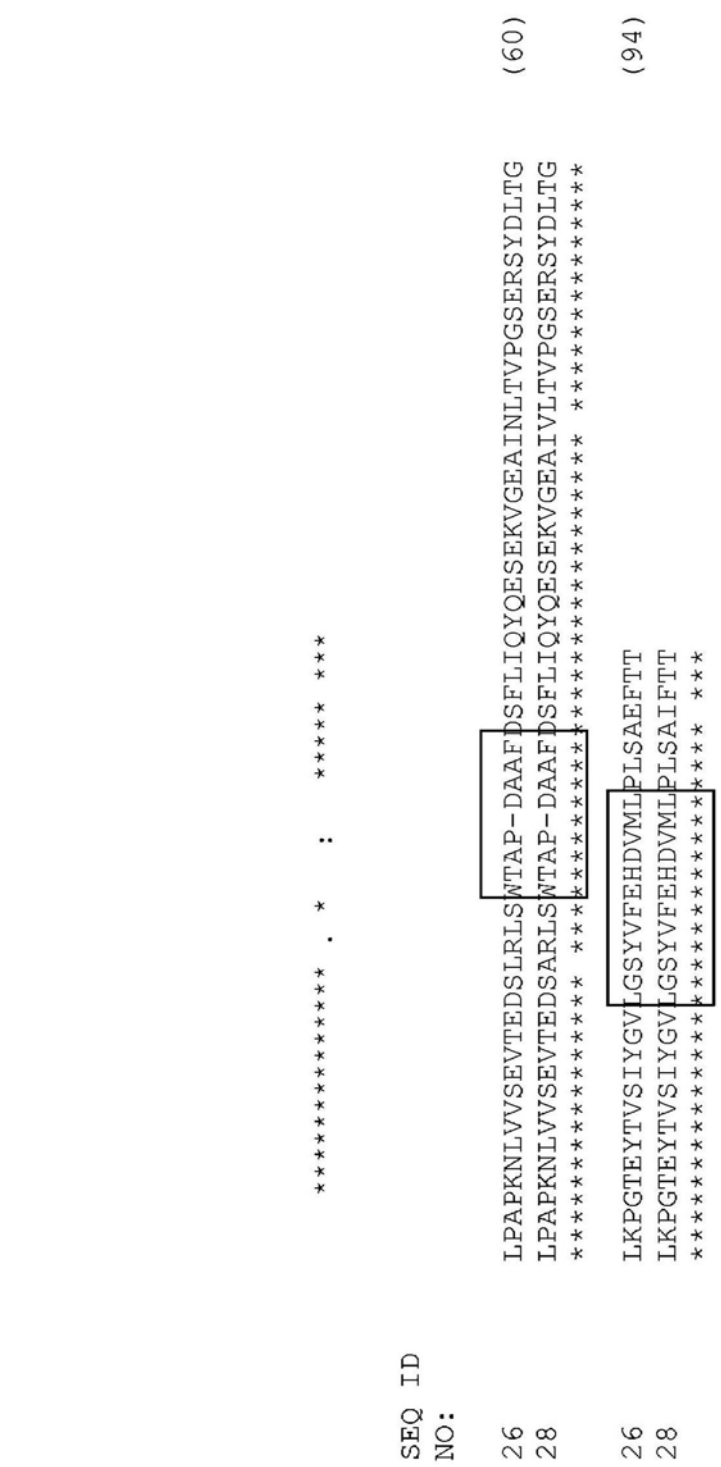

SEQ ID NO:
26 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAP-DAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
28 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAP-DAAFDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
26 LKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (94)
28 LKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT

图1B

```
                A       AB   B     BC
TENCON27  (1)   LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS  (30)
TCL14     (1)   LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS  (30)

                  C      CD     D    DE   E
TENCON27  (31)  FLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG  (60)
TCL14     (31)  FXIXYXEXXXXGEAIVLTVPGSERSYDLTG  (60)

                   EF       F      FG      G
TENCON27  (61)  LKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT  (89)
TCL14     (61)  LKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLSAIFTT  (89)
```

图2

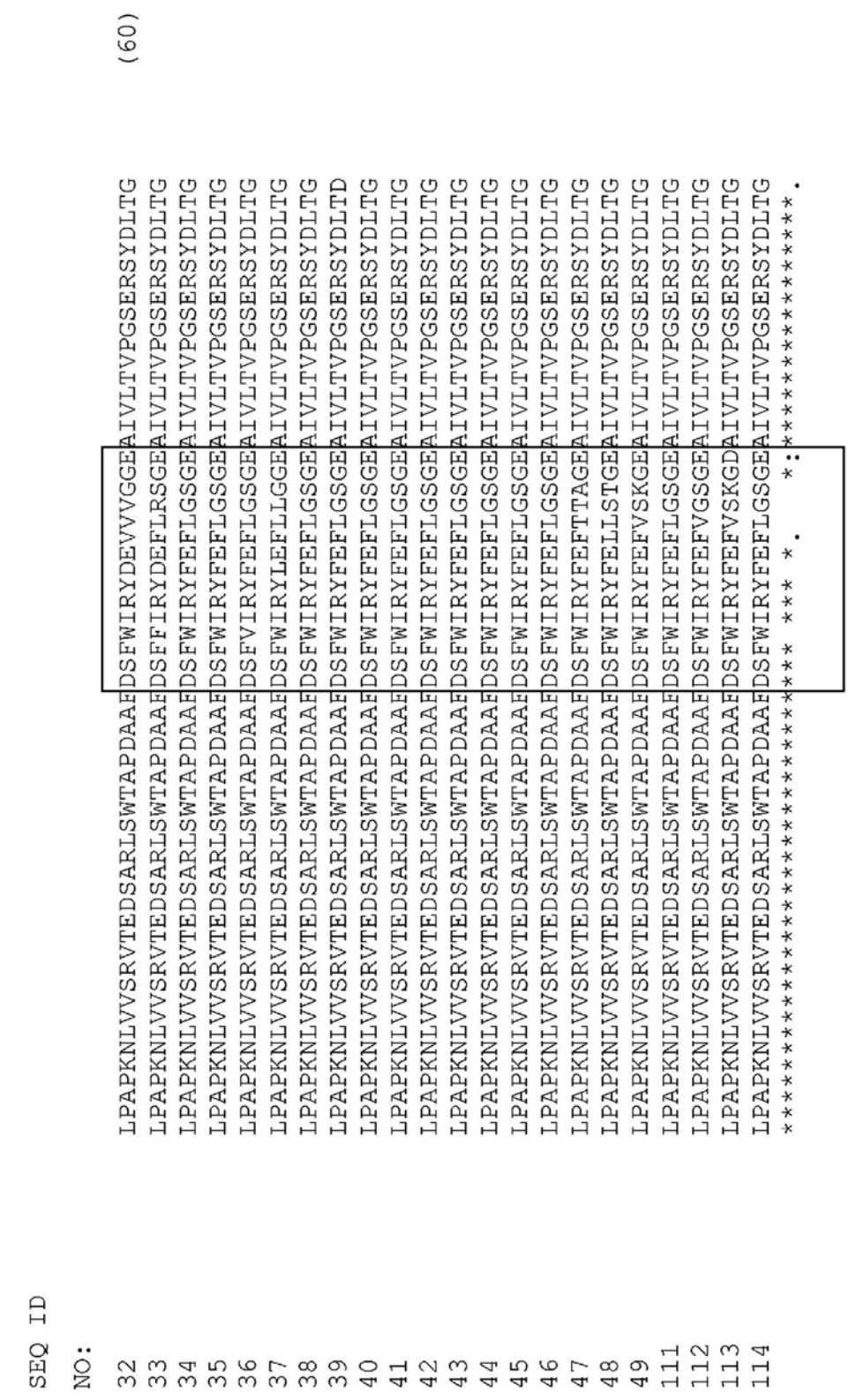

SEQ ID NO:
32 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
33 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
34 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
35 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
36 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
37 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
38 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
39 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTD
40 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
41 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
42 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
43 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
44 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
45 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
46 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
47 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTG
48 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTG
49 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG
111 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
112 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
113 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTG
114 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
**********.**********.**********.**********.**********.**********.
*** *** *. *:

图3

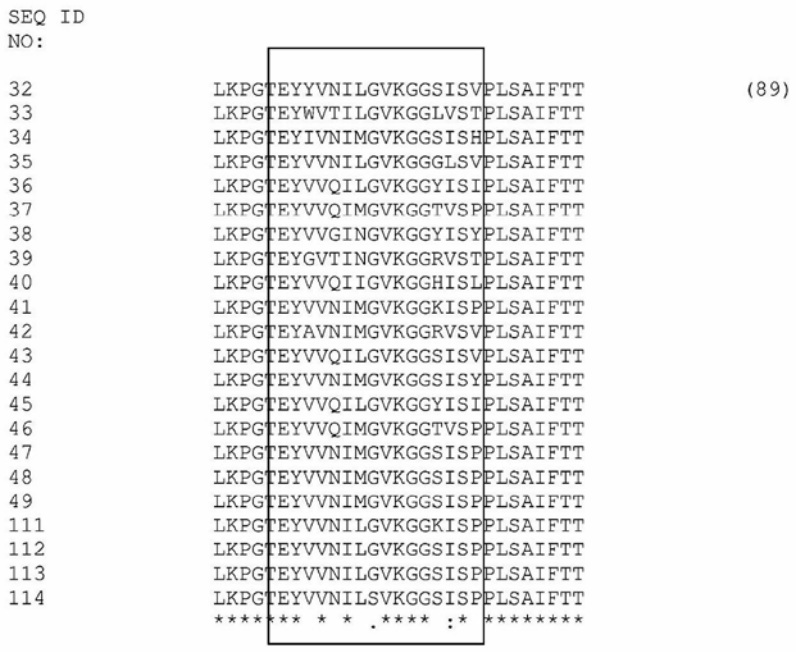

SEQ ID
NO:
32 LKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT (89)
33 LKPGTEYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT
34 LKPGTEYIVNIMGVKGGSISHPLSAIFTT
35 LKPGTEYVVNILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36 LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37 LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38 LKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39 LKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40 LKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41 LKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
42 LKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
43 LKPGTEYVVQILGVKGGSISVPLSAIFTT
44 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISYPLSAIFTT
45 LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46 LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
47 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
48 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
49 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
111 LKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
112 LKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
113 LKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
114 LKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT

图3续

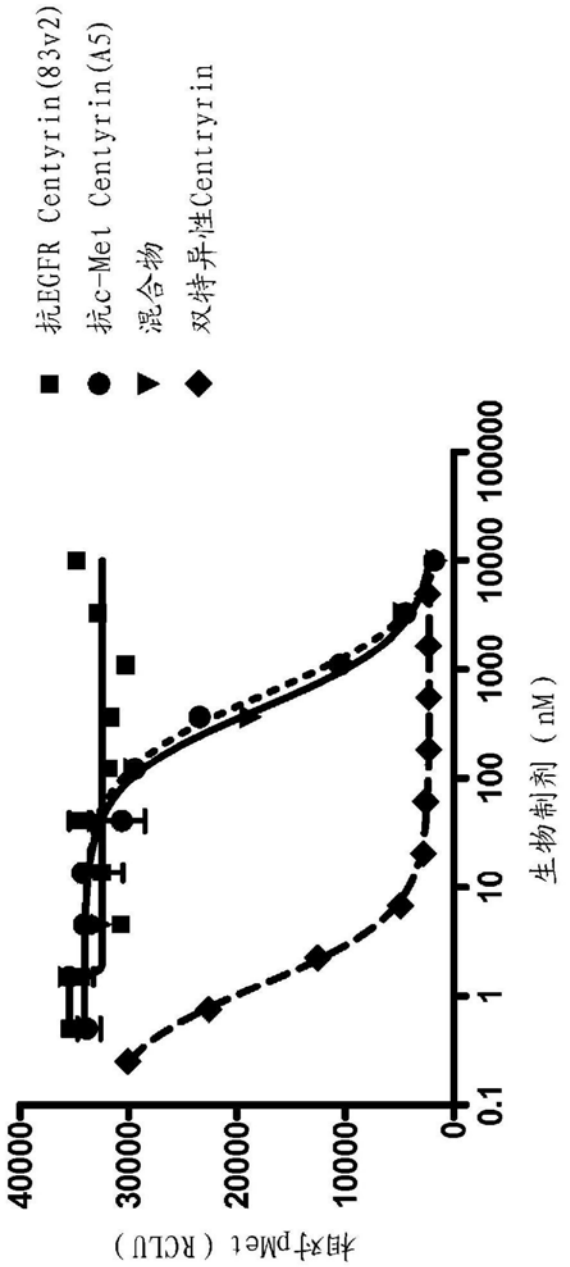
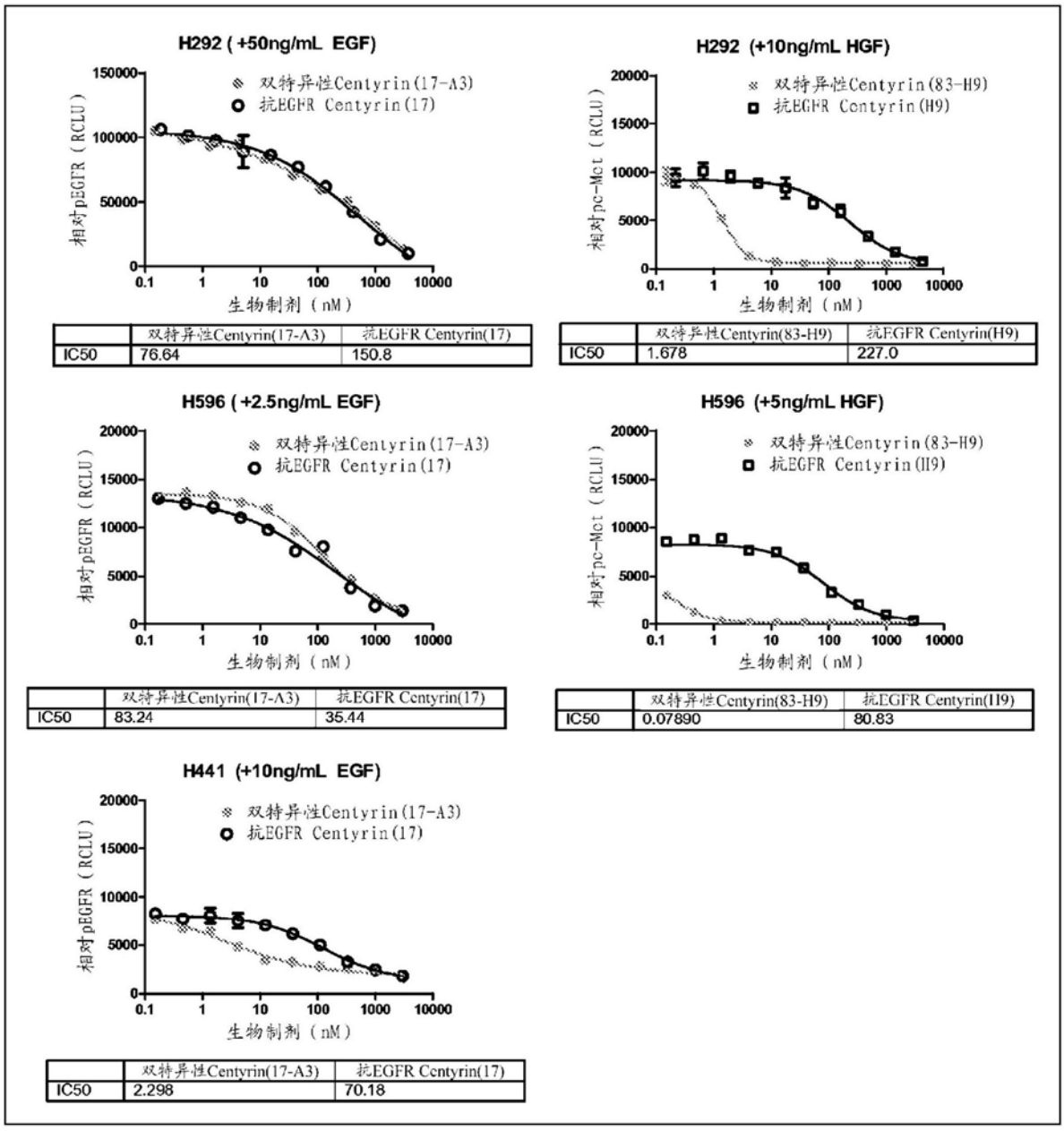

抗EGFR Centyrin(83v2)
抗c-Met Centyrin(A5)
混合物
双特异性Centryrin
相对pMet（RCLU）
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
生物制剂（nM）

图4



	双特异性Centyrin(17-A3)	抗EGFR Centyrin(17)
IC50	76.64	150.8

	双特异性Centyrin(83-H9)	抗EGFR Centyrin(H9)
IC50	1.678	227.0

	双特异性Centyrin(17-A3)	抗EGFR Centyrin(17)
IC50	83.24	35.44

	双特异性Centyrin(83-H9)	抗EGFR Centyrin(H9)
IC50	0.07890	80.83

	双特异性Centyrin(17-A3)	抗EGFR Centyrin(17)
IC50	2.298	70.18

图5

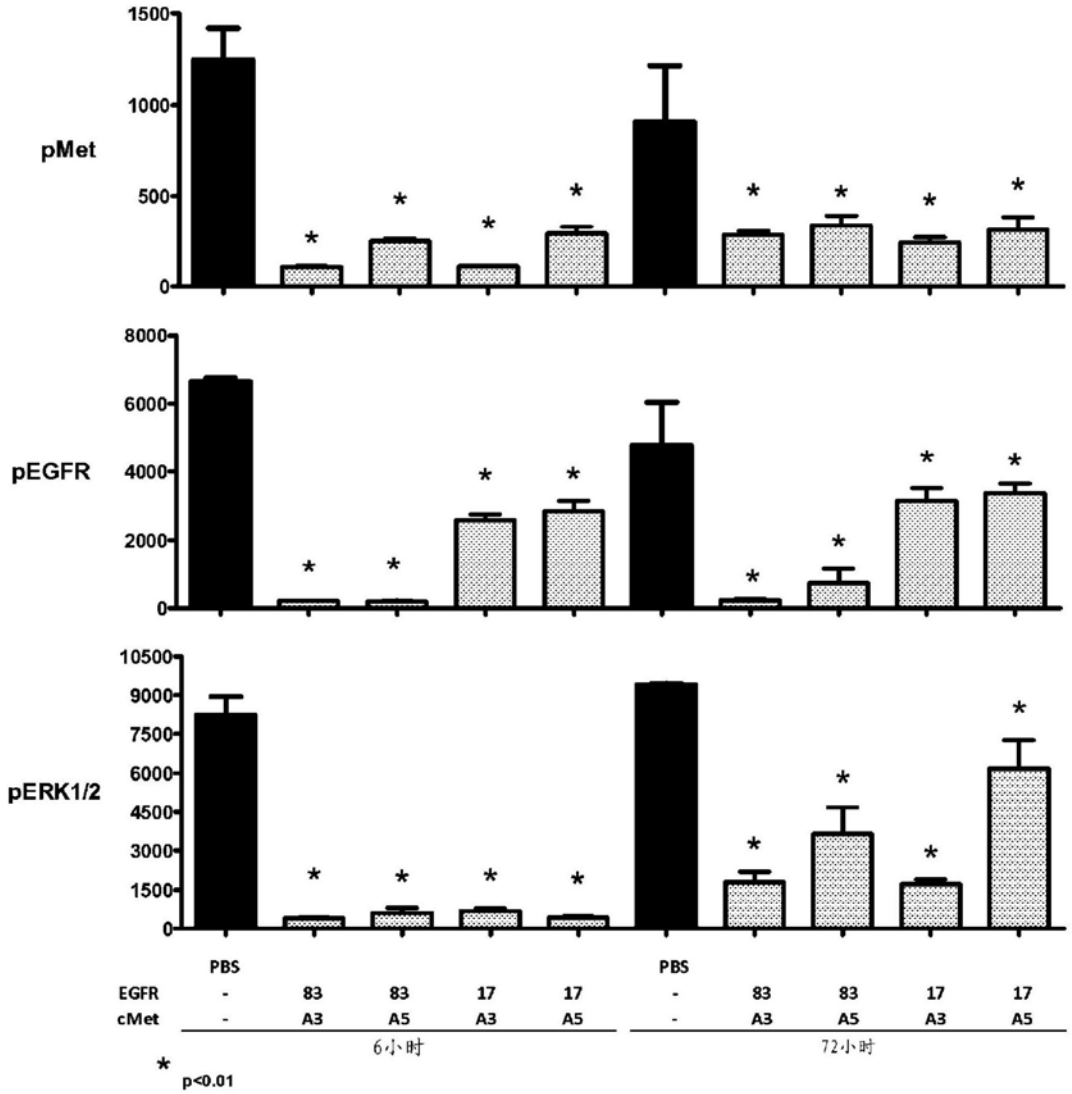

pMet
pEGFR
pERK1/2
1500
1000
500
0
8000
6000
4000
2000
10500
9000
7500
6000
4500
3000
1500
PBS
EGFR - 83 83 17 17 - 83 83 17 17
cMet - A3 A5 A3 A5 - A3 A5 A3 A5
6小时
72小时
* p<0.01

图6

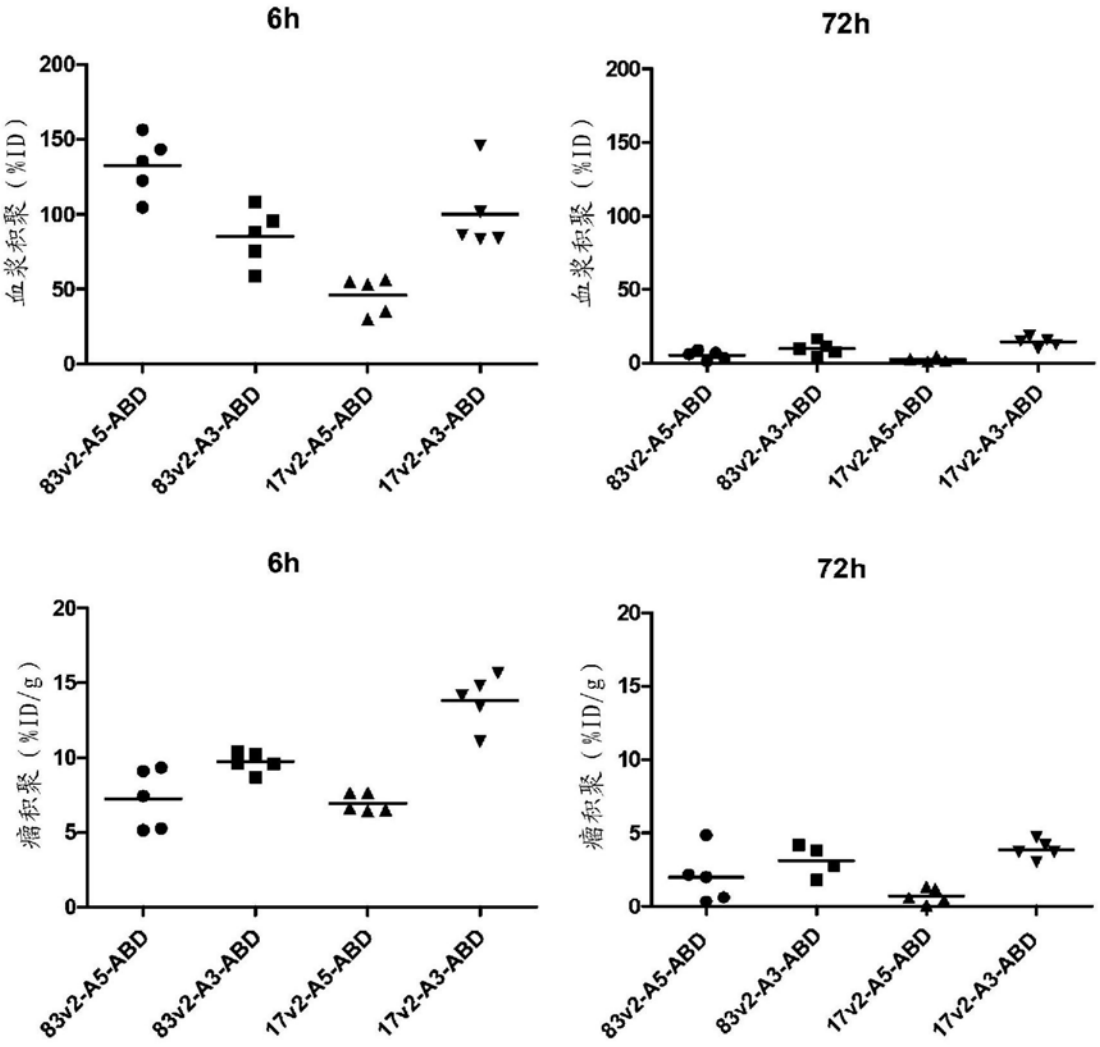

6h
72h
血浆积聚（%ID）
瘤积聚（%ID/g）
200
150
100
50
0
20
15
10
5
83v2-A5-ABD
83v2-A3-ABD
17v2-A5-ABD
17v2-A3-ABD

图7

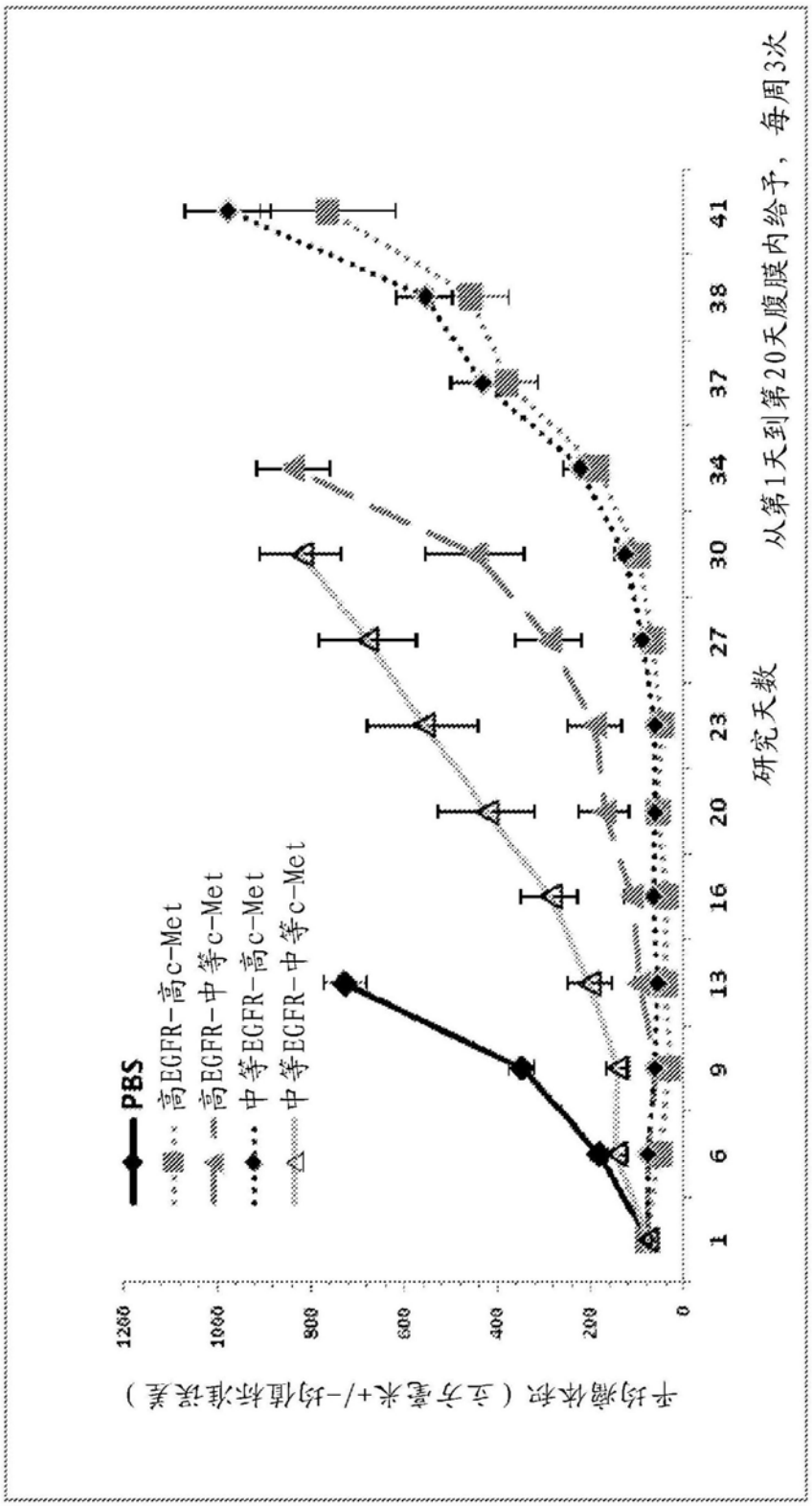

PBS
高EGFR-高c-Met
高EGFR-中等c-Met
中等EGFR-高c-Met
中等EGFR-中等c-Met
平均瘤体积（立方毫米+/-均值标准误差）
研究天数
从第1天到第20天腹膜内给予，每周3次
0
200
400
600
800
1000
1200
1
6
9
13
16
20
23
27
30
34
37
38
41

图8

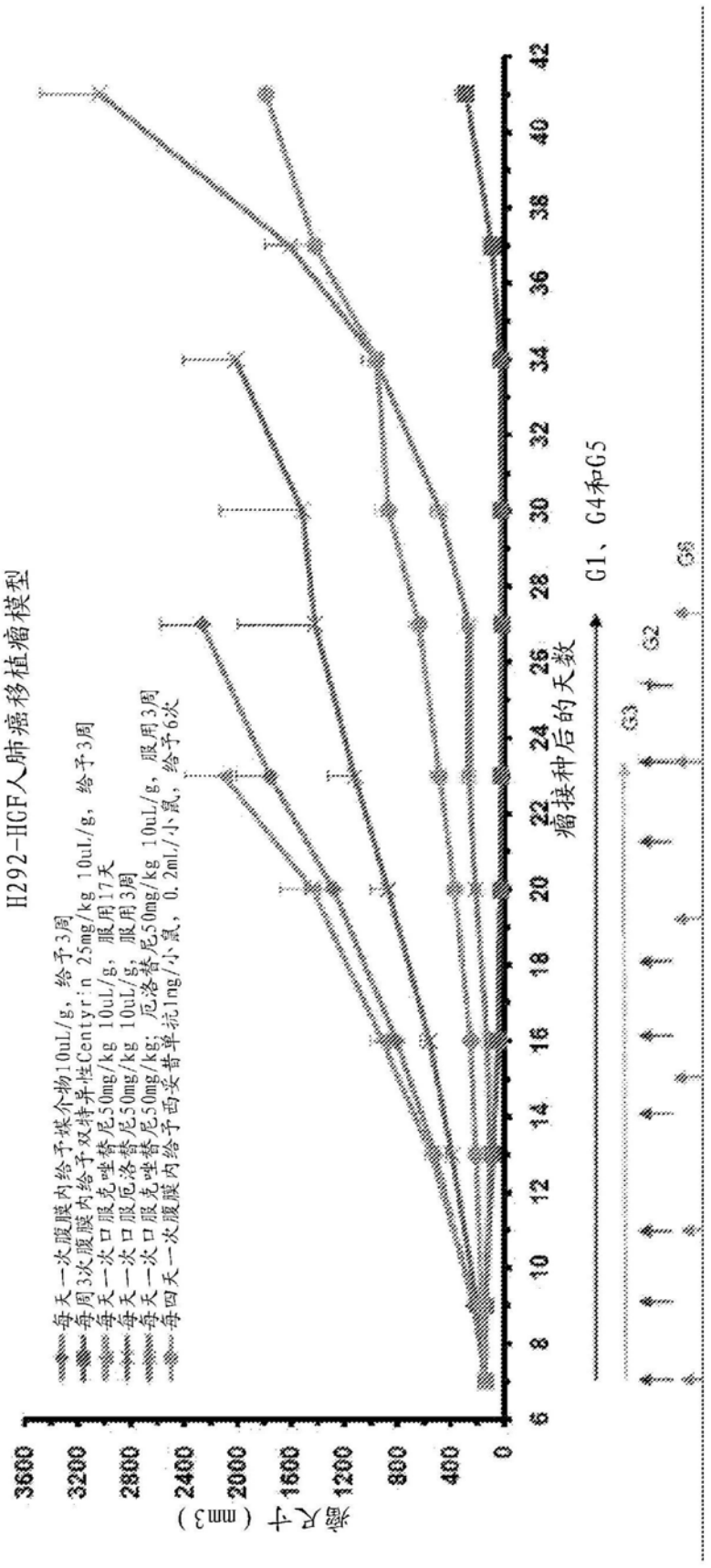

H292-HGF人肺癌移植瘤模型
每天一次腹膜内给予媒介物10uL/g，给予3周
每周3次腹膜内给予双特异性Centyr:n 25mg/kg 10uL/g，给予3周
每天一次口服克唑替尼50mg/kg 10uL/g，服用17天
每天一次口服厄洛替尼50mg/kg 10uL/g，服用3周
每天一次口服克唑替尼50mg/kg；厄洛替尼50mg/kg 10uL/g，服用3周
每四天一次腹膜内给予西妥昔单抗1mg/小鼠，0.2mL/小鼠，给予6次
肿瘤体积（mm3）
3600
3200
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
癌接种后的天数
G1、G4和G5
G3
G2
G6

图9

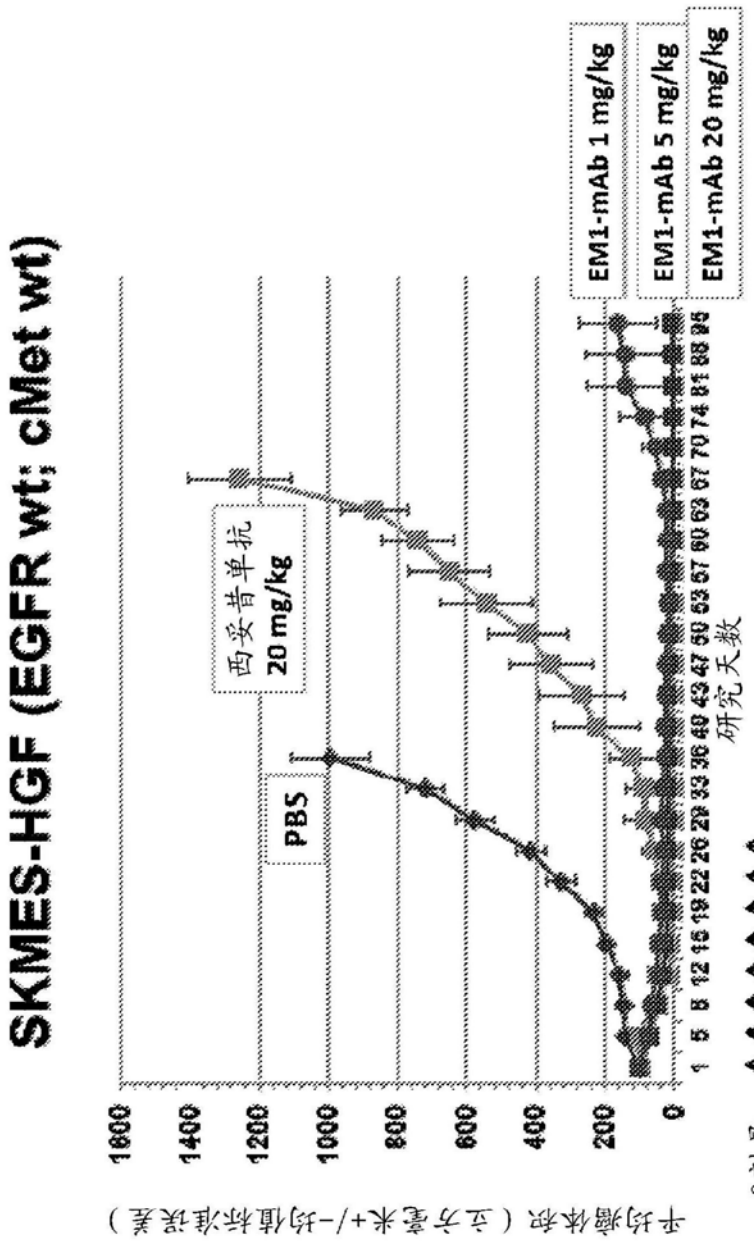

SKMES-HGF (EGFR wt; cMet wt)
PBS
西妥昔单抗
20 mg/kg
EM1-mAb 1 mg/kg
EM1-mAb 5 mg/kg
EM1-mAb 20 mg/kg
平均瘤体积（立方毫米+/-均值标准误差）
研究天数
给剂量

图10

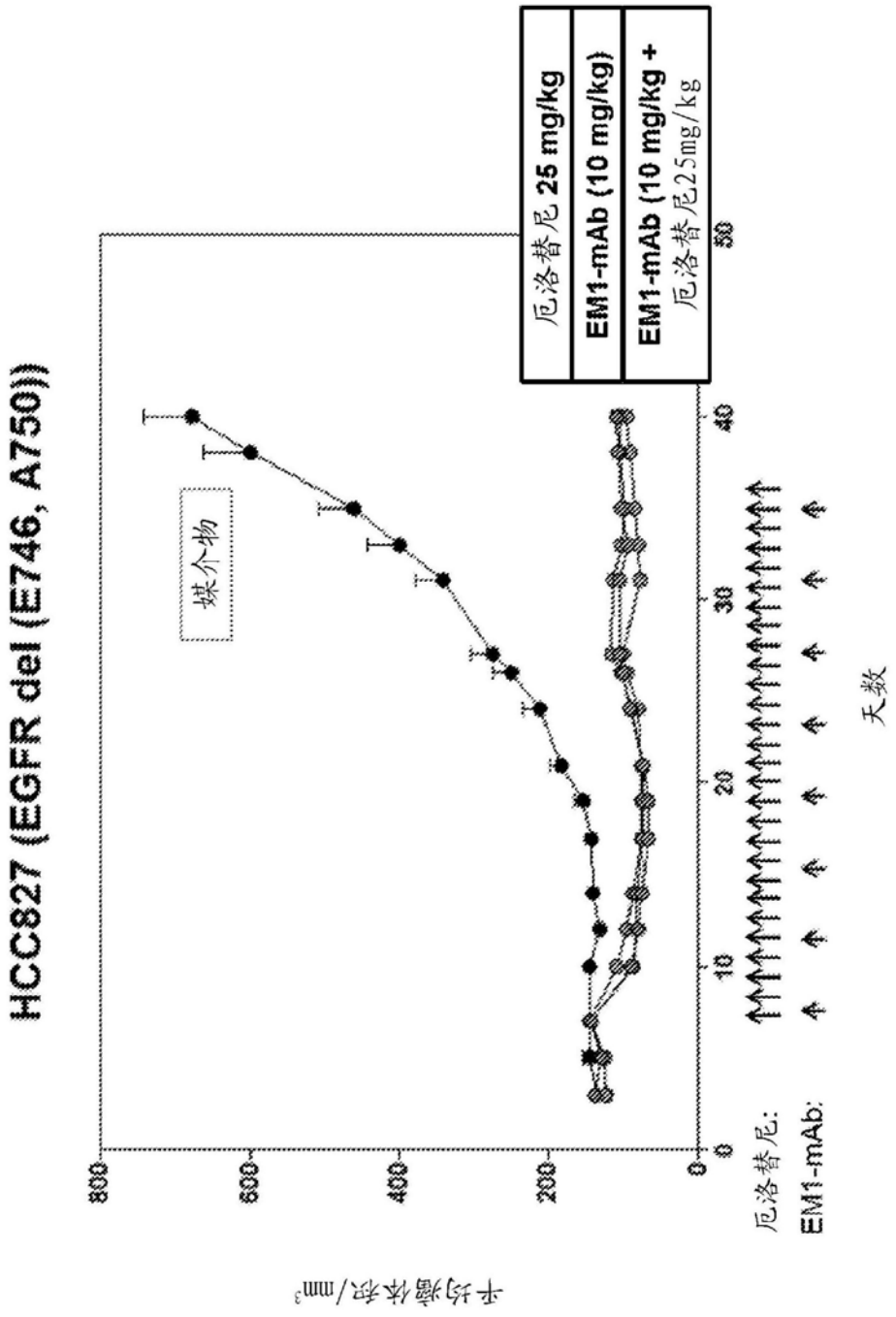

HCC827 (EGFR del (E746, A750))
厄洛替尼 25 mg/kg
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg + 厄洛替尼25mg/kg
媒介物
平均瘤体积/mm³
天数
厄洛替尼:
EM1-mAb:
0
200
400
600
800
10
20
30
40
50

图11

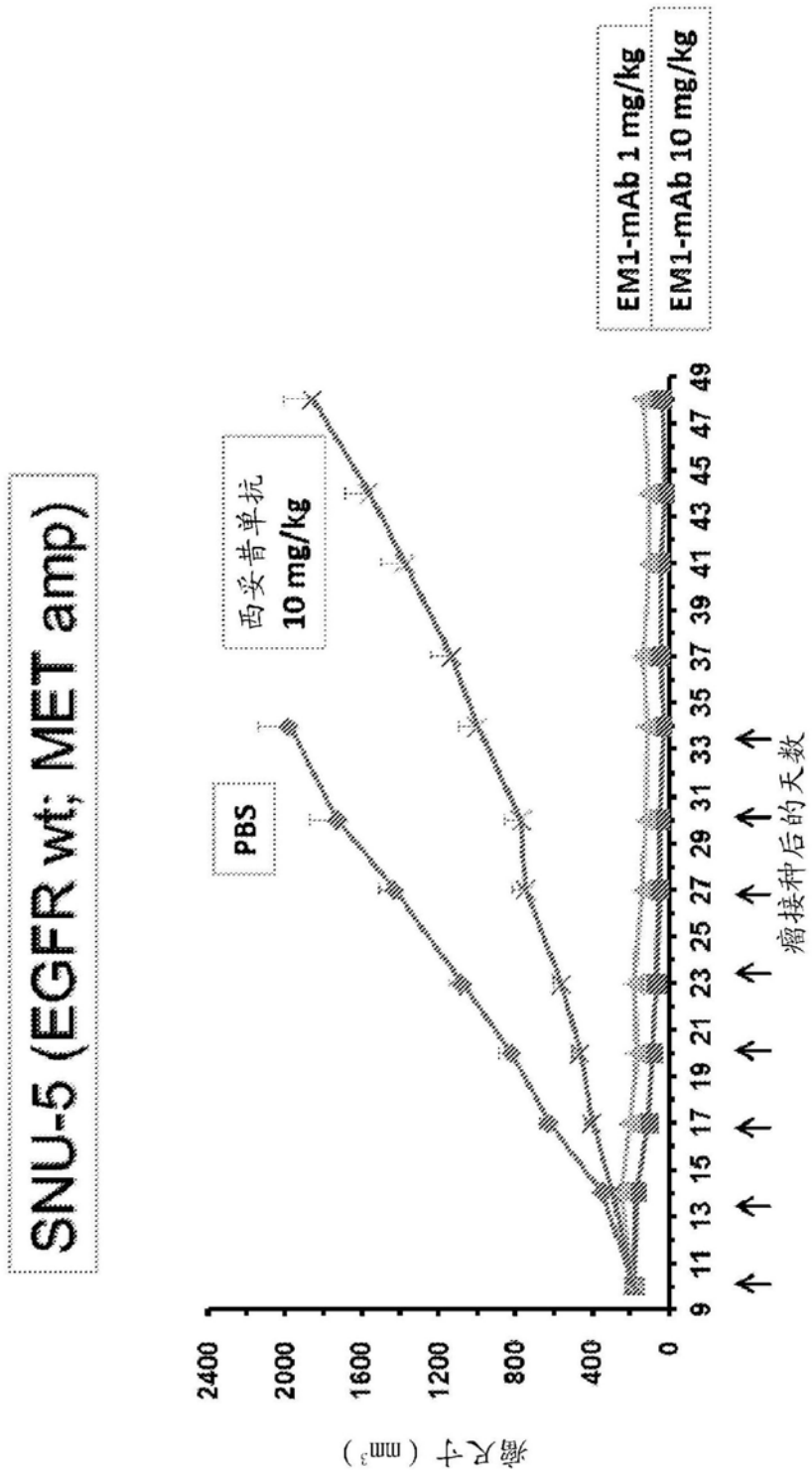

SNU-5 (EGFR wt; MET amp)
PBS
西妥昔单抗
10 mg/kg
EM1-mAb 1 mg/kg
EM1-mAb 10 mg/kg
2400
2000
1600
1200
800
400
0
9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49
癌接种后的天数
癌尺寸 (mm³)

图12

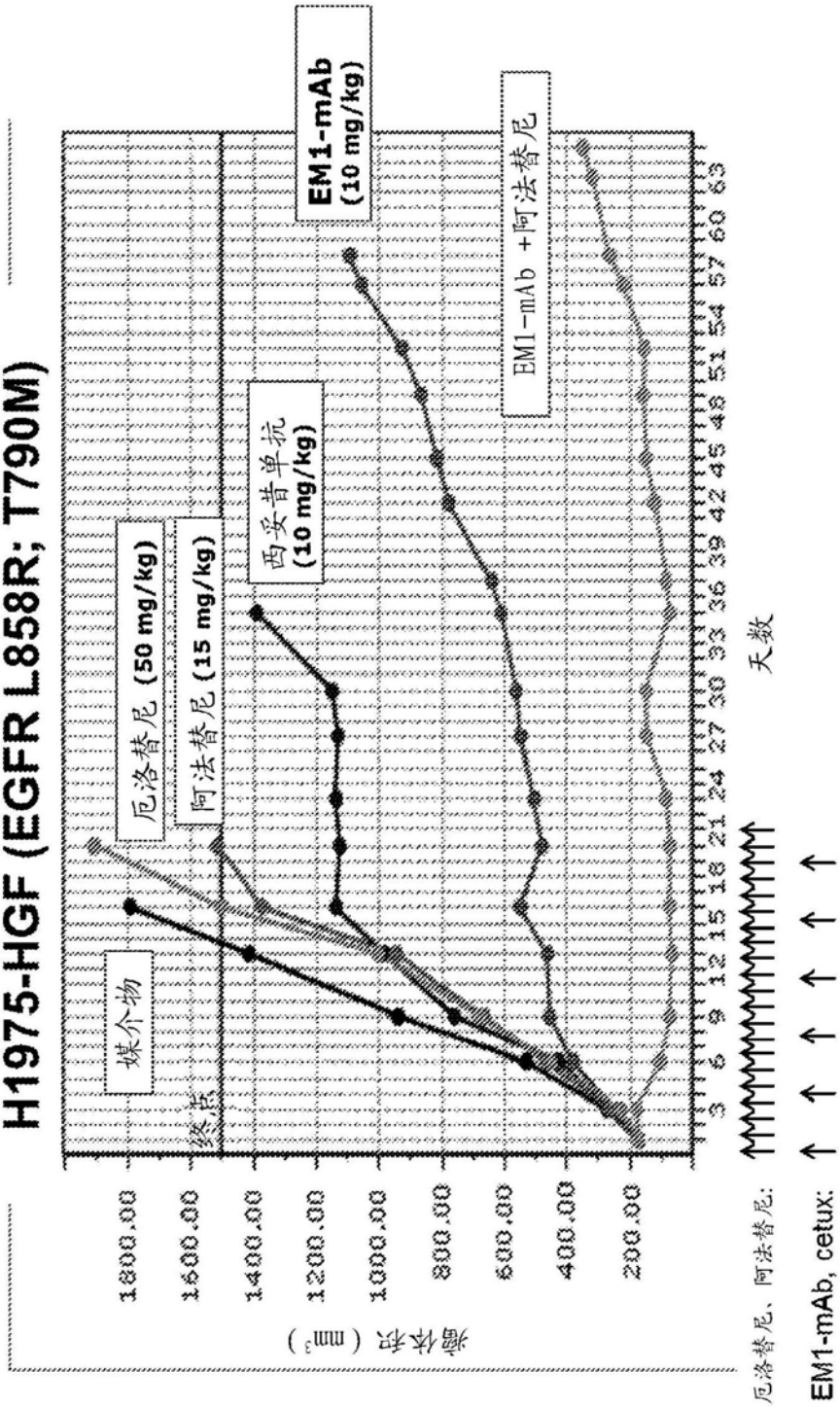

H1975-HGF (EGFR L858R; T790M)
媒介物
厄洛替尼 (50 mg/kg)
阿法替尼 (15 mg/kg)
西妥昔单抗 (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb +阿法替尼
终点
肿瘤体积 (mm³)
天数
厄洛替尼、阿法替尼:
EM1-mAb, cetux:

图13

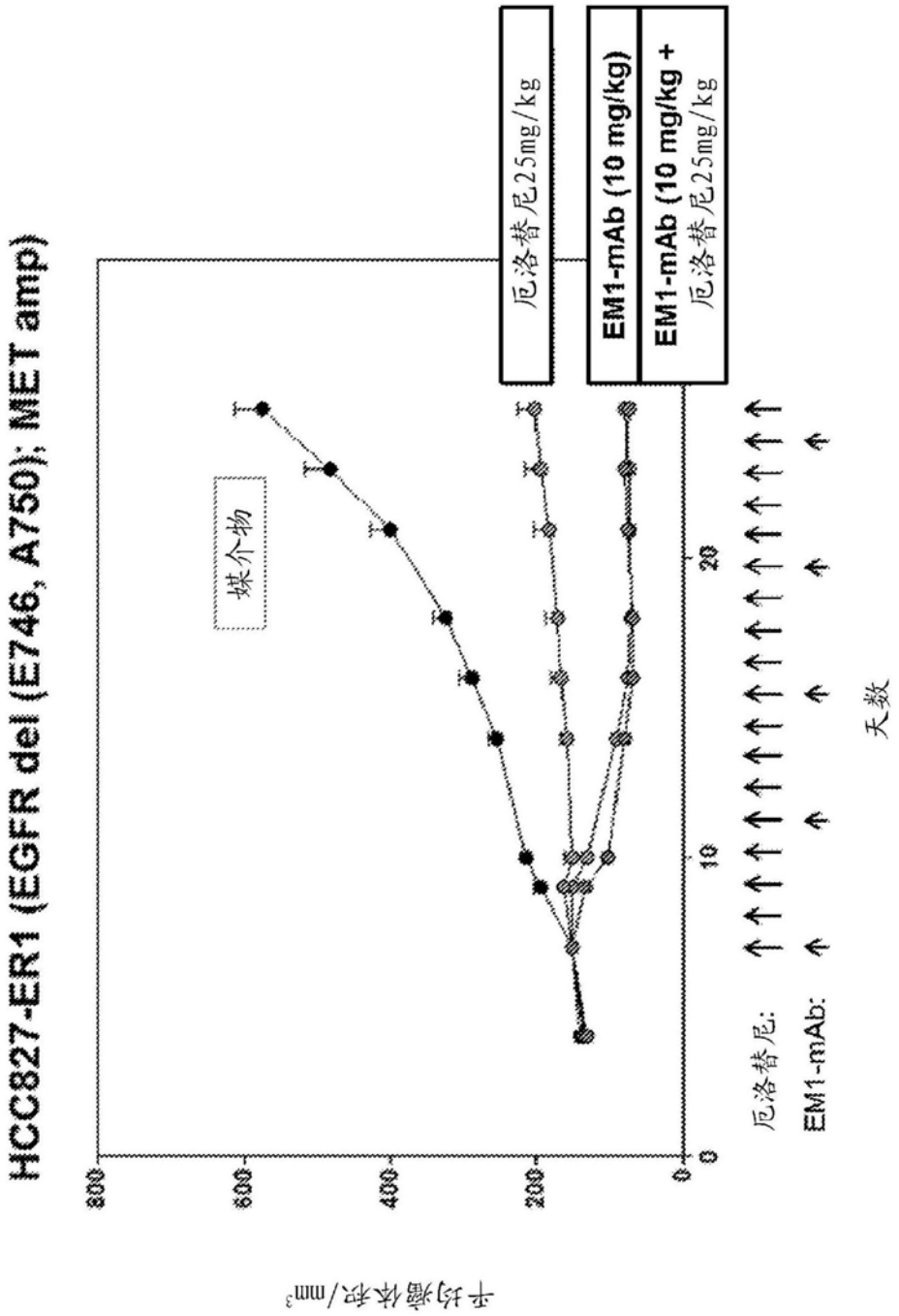

HCC827-ER1 (EGFR del (E746, A750); MET amp)
厄洛替尼25mg/kg
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg + 厄洛替尼25mg/kg
媒介物
平均瘤体积/mm³
800
600
400
200
0
10
20
厄洛替尼:
EM1-mAb:
天数

图14

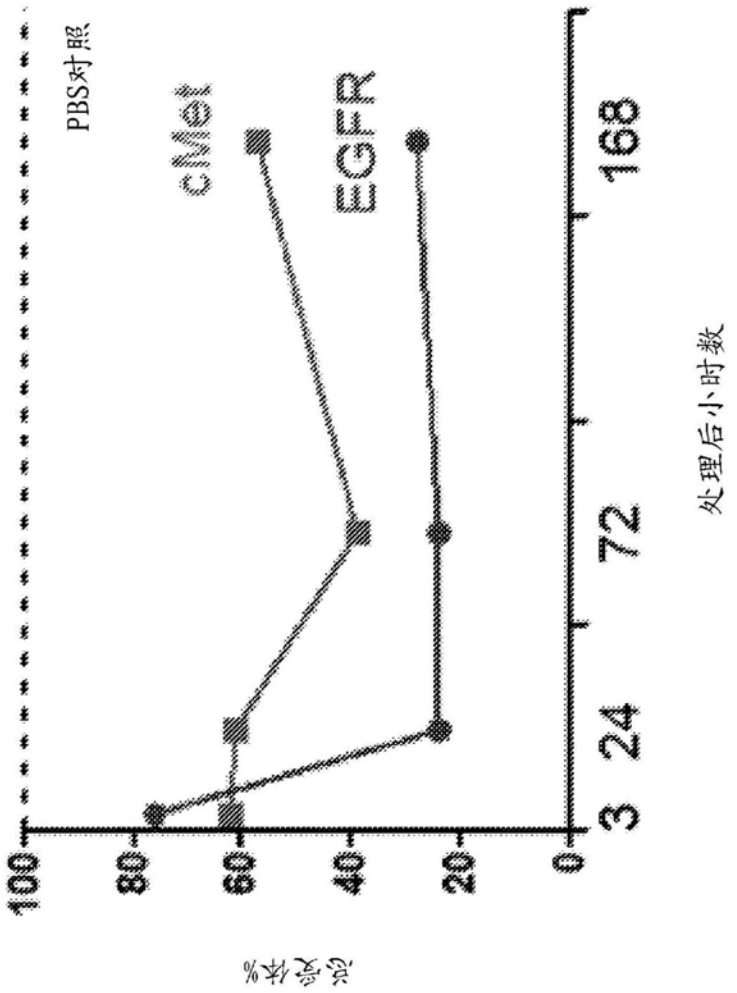


图15

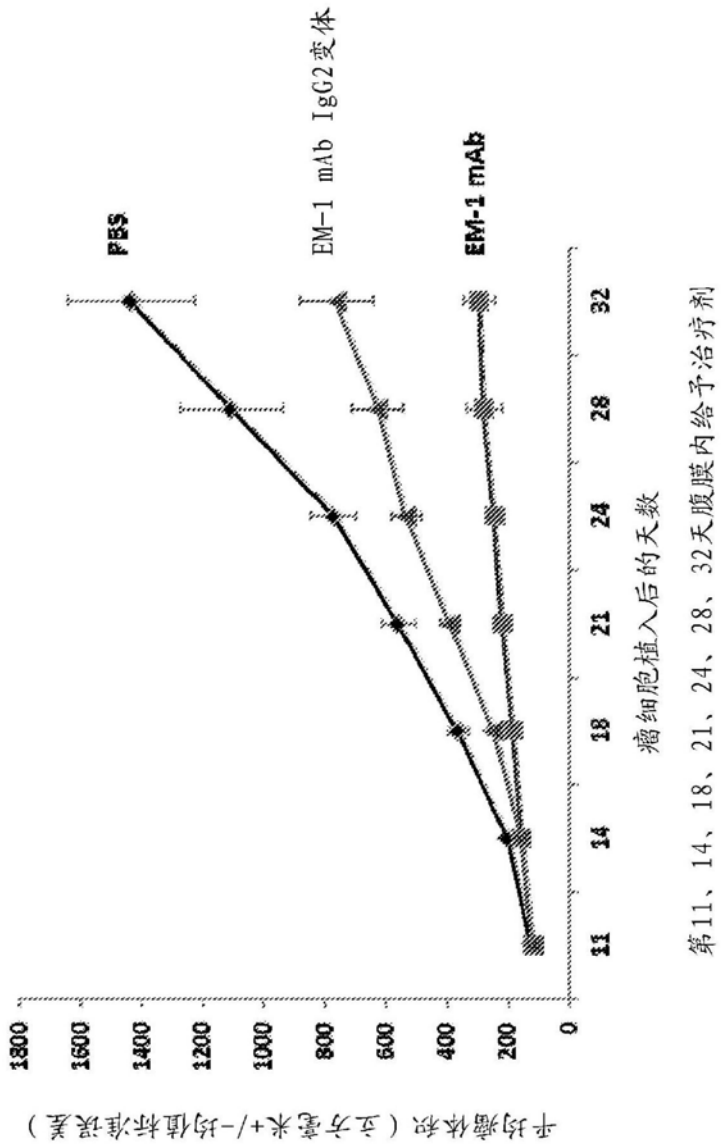

PBS
EM-1 mAb IgG2变体
EM-1 mAb
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
11
14
18
21
24
28
32
癌细胞植入后的天数
第11、14、18、21、24、28、32天腹膜内给予治疗剂
平均癌体积（立方毫米+/-均值标准误差）

图16