



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105189544 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201480022196. 2

(22) 申请日 2014. 03. 06

(30) 优先权数据

13164555. 8 2013. 04. 19 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/054390 2014. 03. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/170063 EN 2014. 10. 23

(71) 申请人 科瓦根股份公司

地址 瑞士施利伦

(72) 发明人 F·布勒 U·维尔纳 K·克卢普施

I·斯宾登 R·桑迪玛利亚

I·阿廷杰-托勒

S·柯尼希-弗里德里克

J·贝尔采钦格曼

D·格拉布洛夫斯基 S·布拉克

M·西拉奇 R·伍兹 H·哈希米

P·埃纳 U·冯德贝

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

C07K 16/46(2006. 01)

权利要求书2页 说明书46页

序列表64页 附图12页

(54) 发明名称

具有抗肿瘤活性的新颖的双特异性结合分子

(57) 摘要

本发明涉及特异性结合 (i)CD3 和 (ii) 癌细胞上的表面靶抗原的双特异性结合分子,其中该结合分子包括:(a) 特异性结合 CD3 的抗体,以及 (b) 结合癌细胞上的表面靶抗原的 Fyn-SH3 源多肽,其中所述 Fyn-SH3 源多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成,其条件是 (i)SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 10 至 19 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加,以及 (ii)SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 29 至 36 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加,其条件是所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 85%序列一致性,其中一致性的确定排除了 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 和 31 至 34。

1. 一种双特异性结合分子,特异性结合 (i)CD3 和 (ii) 癌细胞上的表面靶抗原,其中该结合分子包含
 - (a) 一种抗体,特异性结合 CD3,和
 - (b) 一种 Fyn-SH3 源多肽,结合癌细胞上的表面靶抗原,其中所述 Fyn-SH3 源多肽是由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成,前提是
 - (i)SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 10 至 19 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加,并且
 - (ii)SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 29 至 36 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加,前提是所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 85%序列一致性,其中一致性的确定排除了 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 和 31 至 34。
2. 根据权利要求 1 所述的结合分子,其中该特异性结合 CD3 的抗体是特普利珠单抗、奥特利昔珠单抗、Cris-7 或 SP34。
3. 根据权利要求 1 或 2 中任一项所述的结合分子,其中该结合分子包含两个 Fyn-SH3 源多肽,这些多肽特异性结合 EGFR、HER2、CD33、CD19、CEA、EPA2、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖、IGFR1、成纤维细胞活化蛋白 α 、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、c-MET、EpCAM 或 PSMA。
4. 根据权利要求 1 到 3 中任一项所述的结合分子,其中该结合分子包含两个特异性结合 HER2 的 Fyn-SH3 源多肽,并且其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端。
5. 根据权利要求 1 到 3 中任一项所述的结合分子,其中该结合分子包含两个特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽,并且其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C-末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N-末端,或 (iv) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C-末端。
6. 根据权利要求 1 到 3 中任一项所述的结合分子,其中该结合分子包含两个特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽,并且其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C-末端。
7. 根据权利要求 1 到 6 中任一项所述的结合分子,其中该特异性结合 CD3 的抗体和该 Fyn-SH3 源多肽通过一个接头连接。
8. 根据权利要求 7 所述的结合分子,其中该接头是一个肽接头。
9. 根据权利要求 8 所述的结合分子,其中该接头具有选自由 SEQ ID NO:162、160 和 161 组成的组的序列。
10. 根据权利要求 1 到 4、8 和 9 中任一项所述的结合分子,其中该双特异性结合分子包含 SEQ ID NO 163 和 / 或 164。

11. 根据权利要求 1 到 3、5、8 和 9 中任一项所述的结合分子, 其中该双特异性结合分子包含 SEQ ID NO 171 和 / 或 198。

12. 根据权利要求 1 到 3、6、8 和 9 中任一项所述的结合分子, 其中该双特异性结合分子包含 SEQ ID NO 2 和 / 或 175。

13. 一种核酸分子, 其编码根据权利要求 1 到 12 中任一项所述的结合分子。

14. 一种载体, 包括根据权利要求 13 所述的核酸分子。

15. 一种宿主细胞或一种非人宿主, 其经根据权利要求 14 所述的载体转化。

16. 一种药物组合物, 包含根据权利要求 1 到 12 中任一项所述的结合分子、根据权利要求 13 所述的核酸分子、根据权利要求 14 所述的载体、和 / 或根据权利要求 15 所述的宿主细胞或非人宿主。

17. 根据权利要求 16 所述的药物组合物, 用于在治疗或预防癌症的方法中使用。

18. 根据权利要求 17 使用的药物组合物, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 乳癌; 血液恶性肿瘤, 例如 NHL、B-ALL、AML; 其他癌症, 如前列腺癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌、卵巢癌、头颈癌、结肠直肠癌、胰腺癌、甲状腺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、肾癌、肝癌、或恶性腹水。

19. 根据权利要求 17 或 18 使用的药物组合物, 其中所述癌症以至少两倍高于非肿瘤细胞上表达的量的量表达表面靶抗原, 该表面靶抗原被根据权利要求 1 到 12 中任一项所述的结合分子特异性结合, 被根据权利要求 13 所述的核酸分子编码的结合分子特异性结合, 被根据权利要求 14 所述的载体表达的结合分子特异性结合, 和 / 或被根据权利要求 15 所述的宿主细胞或非人宿主表达的结合分子特异性结合。

具有抗肿瘤活性的新颖的双特异性结合分子

[0001] 本发明涉及特异性结合 (i) CD3 和 (ii) 癌细胞上的表面靶抗原的双特异性结合分子, 其中该结合分子包括: (a) 特异性结合 CD3 的抗体, 以及 (b) 结合癌细胞上的表面靶抗原的 Fyn-SH3 源多肽, 其中所述 Fyn-SH3 源多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成, 其条件是 (i) SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 10 至 19 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加, 以及 (ii) SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 29 至 36 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加, 其条件是所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 85% 序列一致性, 其中一致性的确定排除了 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 和 31 至 34。

[0002] 在本说明书中引用了许多文件, 包括专利申请和制造商手册。这些文件的披露内容被认为与本发明的专利性无关, 通过引用以其全文结合在此。更确切地说, 所有对比文件通过引用而结合, 该引用的程度如同每个单独的文件被特定地并且单独地指明通过引用结合在此一样。

[0003] 对以下现象存在日益增加的证据: 在疾病早期和晚期, T 细胞都能够控制癌症患者中的肿瘤生长和存活 (Mlecnik B. (米伦克尼克) 等人, (2011), *Cancer Metastasis Rev* (癌症与转移综述), 30, 5-12 页)。然而, 在癌症患者中, 肿瘤特异性 T 细胞应答难以建立并且维持, 并且受限于免疫编辑期间选择的肿瘤细胞的多种免疫逃逸机制 (Bauerle PA (鲍厄勒) 等人, (2009) *Cancer Res* (癌症研究) 69(12), 4941-4944 页)。参与癌症治疗的 T 细胞的替代途径是抗体, 这些抗体对于癌细胞上的表面靶抗原, 以及对于 T 细胞上的 CD3, 是双特异性的 (Bargou (巴戈) 等人, (2008) *Science* (科学), 321(5891), 974-977 页)。这些典型地能够将任何种类的细胞毒性 T 细胞连接至癌细胞, 不取决于 T 细胞受体特异性、共同刺激、或多肽抗原呈递。

[0004] 鼠和人源化的抗 CD3 抗体是本领域熟知的, 例如莫罗单抗-CD3 (Norman DJ (诺曼) (1995) *Ther Drug Monit* (治疗药物监测) 17(6), 615-620 页)、特普利珠单抗 (teplizumab) 和奥特利昔珠单抗 (otelixizumab) (Chatenoud L. (切滕诺德) (2010) 6(3), 149-157 页), 以及 Cris-7 (Alberola (阿尔贝罗拉)-IIa (伊拉) J. 等人, (1991), *J Immunol* (免疫学杂志), 146(4), 1085-1092 页)。Conrad (卡雷德) 等人给出了包括 SP34 的其他抗 CD3 抗体的综述 (Conrad (卡雷德) 等人, (2007) *Cytometry* (细胞计量术) 71(11), 925-933 页)。

[0005] 如提及的, 同时识别 CD3 和癌细胞上的表面靶抗原的双特异性抗体是本领域熟知的 (还参见 May C. (梅) 等人, (2012), *Biochemical Pharmacology* (生化药理学), 84, 1105-1112 页)。必须指出的是, 在历史上, 在开发作为治疗剂的双特异性抗体方面的主要障碍已经是难以设计具有有利的药物样特性的这些复杂分子以及按足够的数量和质量来生产它们, 以便支持药物开发 (Chan A. (陈) 和 Carter P. (卡特) (2010), *Nat Rev Immunol* (自然免疫学评论), 10(5), 301-316 页)。这是由 CD3 领域中的早期双特异性途径示例的, 该途径采用了源自表达具有选择特异性的单克隆抗体 (mAb) 的两个独特的鼠杂交瘤克隆的融合的四源杂交瘤技术 (Staerz (施特茨) 等人, (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* (美国国家科学院院刊), 83, 1453-1457 页)。通过这一方法制备的双特异性抗体依靠 IgG 重链和轻链的随机配对。尽管在表达该抗原的细胞上观察到一些生物效应, 但

是这一途径并未导致疾病临床过程中的显著影响 (Kufer P. (库非) 等人, (2004) Trends Biotechnol (生物技术趋势), 22, 238-244 页)。如以上提及的, 这些第一代双特异性抗体展示了两个主要限制, 包括产生大规模均质批次的难度, 以及缺乏鼠抗体片段的功效。此外, 在多数治疗的患者中都发现人抗小鼠抗体反应, 该反应严重降低这些鼠分子的功效并且限制多剂量给药 (May C. (梅) 等人, (2012), Biochemical Pharmacology (生化药理学), 84, 1105-1112 页)。

[0006] Lindhofer (林德霍费尔) 鉴定了用来通过大鼠 IgG2a 和小鼠 IgG2b 的配对来降低异质性的水平的方法 (Lindhofer (林德霍费尔) 等人, (1995) J Immunol (免疫学杂志) 155, 219-225 页)。这些作者发现, 这些大鼠和小鼠同种型特异性杂交瘤的融合增加了正确配对的双特异性抗体的发生率, 这是由于适宜种限制的重链 / 轻链配对。另外, 他们鉴定了促进从亲本抗体纯化功能性双特异性抗体的顺序 pH 洗脱方法。由这一方法产生的杂交抗体合并了两种不同抗原 (例如 CD3 和肿瘤抗原) 的结合位点, 并且保留了可以结合在巨噬细胞、NK 细胞以及类似于常规抗体的树突细胞上表达的 Fc γ R 受体的它的完整 Fc。这些双特异性抗体, 称为 **TriomAbs[®]**, 具有将 T 细胞与 Fc 受体表达细胞重新定向至肿瘤的组合效应, 并且已经报道, 通过 T 细胞介导的裂解和 ADCC 的组合来消除肿瘤细胞 (Linke R. (林克) 等人 (2010) Mabs, 2, 129-136 页)。这一样式导致了已经在临床试验中评估的多种双特异性抗体的发展。这些包括卡妥索单抗 (抗 EpCAM $\times$ 抗 CD3)、厄马索单抗 (抗 HER2 $\times$ 抗 CD3)、以及 FBTA05 (抗 CD20 $\times$ 抗 CD3) (综述于 Chames P. (查恩斯) 等人, (2009), Mabs, 1, 539-547 页)。卡妥索单抗 (catumaxomab) 是第一种 **TriomAb[®]**, 已经开发并且阶段 2/3 展示了在存活方面的显著改善, 这导致在 2009 年卡妥索单抗接受了 EU 批准, 用于治疗患有 EpCAM 阳性肿瘤的患者中的恶性腹水, 并且是批准用于临床使用的第一种双特异性抗体 (Jager M. (耶格尔) 等人, (2012), Cancer Res (癌症研究), 69, 4941-4944)。目前正在具有 HER2 表达的晚期实体瘤患者中进行临床试验, 研究 HER2 靶向的 **TriomAb[®]** 厄马索单抗 (ertumaxomab)。FBTA05, 是正开发的、靶向 B 细胞恶性肿瘤上表达的 CD20 的第三种 **TriomAb[®]**, 显示介导源自慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者的具有低水平 CD20 表达的 B 细胞系的特异性裂解。此外, 当在体外与利妥昔单抗比较时, FBTA05 展示了显著更高的根除。在进行同种异体移植后, 阶段 1/2 研究评估了与供体淋巴细胞组合输注的 FBTA05 用于治疗 CD20 阳性非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 患者中的复发性或难治性疾病的安全性和功效 (Chames P. (查恩斯) 等人, (2009), Mabs, 1, 539-547 页)。由于患者响应非人源化的小鼠 / 大鼠杂交抗体样式的重复给予, 发展了人抗小鼠和抗大鼠抗体, 所以存在对这一 **TriomAb[®]** 型的主要限制 (Linke R. (林克) 等人, (2010) Mabs, 2, 129-136 页)。

[0007] 通过抗体工程化和基于新颖样式的重组双特异性分子的产生, 已经解决了 **TriomAb[®]** 抗体的一些限制 (参见 May C. (梅) 等人, (2012), Biochemical Pharmacology (生化药理学), 84, 1105-1112 页中的综述)。在已经测试的双特异性抗体设计中, 称为 **BiTE[®]** 的样式 (用于双特异性 T 细胞接合器) 至今已经展示了临床方面的最大成功。**BiTE[®]** 重组样式是基于由一个肽接头共价连接的两个单链抗体 (生成双特异性 scFv 抗体片段样式)。在由只一个基因编码的单多肽链上比对了由四个不同基因编码的总计

四个可变结构域。对于在皮摩尔 (pM) 浓度的 BiTEs[®] 的体外和体内选择性 T 细胞激活, 连同它们的作用机制, 已经极其详细地进行了研究 (Baeuerle PA (博伊尔勒) 等人, (2009), Cancer Res (癌症研究), 69, 4941-4944 页)。靶向 CD19 (由大多数人 B 细胞恶性肿瘤表达 (Dreier T. (德雷尔) 等人, (2003), J Immunol (免疫学杂志), 170, 4397-4402 页)) 的 BiTEs[®] 和在多种实体瘤上表达的 EpCAM (Brischwein K. (布里施魏因) 等人, (2006), Mol Immunol (分子免疫学), 43, 1129-1143 页) 是最先进的分子并且目前正在临床试验中对它们进行测试。正研究为重组抗 CD3× 抗 CD19 BiTE[®] 分子的布尔莫单抗 (也称为 MT103), 作为患有复发性非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 和急性成淋巴细胞白血病 (ALL) 的患者的治疗。对作为单一药剂的布尔莫单抗 (blinatumomab) 的首先确认的反应发生在 NHL 患者中 (Bargou R. (巴戈) 等人, (2008), Science (科学), 321, 974-977 页)。新近, 进行了阶段 2 临床研究, 以确定在微小残留病 (MRD) 阳性 B 系 ALL 中布尔莫单抗的功效 (Topp MS (托普) 等人, (2011) J Clin Oncol (临床肿瘤学杂志), 29, 2493-2498 页)。以 0.015mg/m²/天的剂量水平治疗了二十一名患者, 其中十六名患者变成 MRD 阴性的。报道了在中位数 405 天的随访中, 无复发存活概率为 78%。在患有 MRD 阳性 B 系 ALL 的患者中, 布尔莫单抗是有效的并且是耐受良好的, 并且治疗导致延长的无白血病存活。除了 CD19 和 EpCAM, 临床前研究已经示出 BiTE[®] 抗体也可以特异性靶向表达 EGFR、CEA、EPhA2、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖、IGFR1、CD33、成纤维细胞活化蛋白 α、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、c-MET、PSMA 和 HER2 的肿瘤细胞 (Baeuerle PA (博伊尔勒) 等人, (2009), Cancer Res (癌症研究), 69, 4941-4944 页; Friedrich M. (弗里德里希), (2012) Mol Cancer Ther (分子癌症治疗学), 11(12), 2664-2673 页)。

[0008] 由于 BiTE[®] 抗体的小尺寸 (约 55kDa), 它们特征在于短的血清半衰期。例如, 对于给予这一药物, 需要由轻便泵连续静脉内输注布尔莫单抗。因此, 短的体内半衰期是 BiTE[®] 抗体的主要限制之一 (Kontermann R. (柯特尔曼) (2005) Acta Pharmacologica Sinica (药理学报), 26(1), 1-9 页)。

[0009] 基于同时识别 CD3 和癌细胞上的表面靶抗原的 scFv 抗体片段的其他双特异性样式是本领域已知的, 例如 DART[™] 平台, 它由两种不同的多肽组成, 这两种多肽共表达以产生具有针对 2 种特异性中的每一种的一个结合位点的共价连接的异源二聚体复合物 (Moore (摩尔) 等人, (2011), Blood (血液), 117, 4542-4551 页), 以及称为 tandab[®] 的四价串联双体抗体结构, 其中具有来自两个不同抗体的每四个可变结构域的两个多肽与同源二聚体分子头尾安排 (Mølhoj M. 等人 (2007), Mol Immunol (分子免疫学), 44(8), 1935-1943 页)。

[0010] 除了基于 scFv 的双特异性策略的相当短的半衰期, 基于 scFv 的构建体由于 V 区与来自其他分子的配伍物的 ‘结构域交换’, 具有形成聚集的倾向 (Moore (摩尔) 等人, (2011), Blood (血液), 117, 4542-4551 页), 或者如对 DART[™] 平台所示, 它们依赖于更复杂的表达系统, 以形成异源二聚体复合物 (Moore (摩尔) 等人, (2011), Blood (血液), 117, 4542-4551 页)。

[0011] 近年, 已经产生了多种其他双特异性样式 (综述于 Chan A. (陈) 和 Carter P. (卡

特) (2010), *Nat Rev Immunol* (自然免疫学评论), 10(5), 301-316 页, 以及 Kontermann R. (柯特尔曼) (2012), *Mabs*, 4(2), 182-197 页), 它们中的一些已经被设计为靶向 CD3 和肿瘤细胞表面抗原。在这一领域里已经发展了人 IgG 样双特异性技术, 例如基于使用了单一轻链抗体的 Biclomics™ ENGAGE 平台的 CD3 双特异性 (www.merus.nl), 依赖单一重链抗体的“κ-λ 体™” (www.novimmune.com), 以及双特异性 IgG1/IgG2 抗体 (Strop (施特罗普) 等人 (2012) *J Mol Biol* (分子生物学杂志), 420, 204-219 页)。尽管存在用于重定向 T 细胞杀伤的双特异性样式的工程化方面的这些近期进展, 这些较新的技术仍然存在缺陷, 例如需要两个重链与一个单一轻链的共表达, 或一个重链与两个轻链的共表达, 以及随后更复杂的下游纯化过程, 或者在 IgG1/IgG2 双特异性的情况下, 需要用于异源二聚体化的适合的氧化还原条件。因此, 在产生具有药物样特性的双特异性方面存在大的医学需求, 例如高水平表达、有利的理化特性 (例如高溶解度和稳定性加上聚集的低倾向) 以及长的血清半衰期。讨论双特异性化合物的科学会议的出现还示例了对改进的双特异性的需要。例如, 已经在第二届世界双特异性抗体峰会上陈述了对双特异性的行业关注正在强化。已经考虑到, 在过去的 2 年, 双特异性已经是价值超过 65 亿美元的若干令人难忘的交易的主题。一方面, 存在令人兴奋的包含机遇和生长的巨大生长空间, 但是在这一新类别的药物可以达到它的全部潜能之前仍存在很多需要解决的问题 (http://www.nature.com/natureevents/science/events/14667;2nd_World_Bispecific_Antibody_Summit)。

[0012] 因此, 对于在肿瘤治疗中有用的新颖双特异性样式存在大的医疗需求, 这些双特异性样式具有有利的药物样特性, 可以按足够的数量和质量生产, 以支持药物开发并且适合作为治疗剂。相应地, 本发明的目标是提供靶向 CD3 和肿瘤细胞表面抗原的此类新颖的双特异性结合分子。

[0013] 因此, 在一个第一实施例中, 本发明涉及特异性结合 (i) CD3 和 (ii) 癌细胞上的表面靶抗原的双特异性结合分子, 其中该结合分子包括: (a) 特异性结合 CD3 的抗体, 以及 (b) 结合癌细胞上的表面靶抗原的 Fyn-SH3 源多肽, 其中所述 Fyn-SH3 源多肽由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成, 其条件是 (i) SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 10 至 19 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加, 以及 (ii) SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 29 至 36 内的至少一个氨基酸被取代、缺失或添加, 其条件是所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 85% 序列一致性, 其中一致性的确定排除了 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 和 31 至 34。

[0014] 术语“特异性结合 (i) CD3 和 (ii) 癌细胞上的表面靶抗原的双特异性结合分子”是指本发明的结合分子能够特异性结合 CD3 的抗原和癌细胞上的表面靶抗原的抗原, 所述抗原不同于 CD3。此外, 本发明的双特异性结合分子能够同时结合所述两个靶标。因此, 本发明的术语“CD3 双特异性结合分子”也包括两种结合特异性, 一种针对 CD3 (“抗 CD3”), 并且第二种针对癌细胞上的不同表面靶抗原 (“抗癌细胞上的表面靶抗原”或“抗肿瘤抗原”)。

[0015] 根据本发明, 当相应分子不或基本上不与类似结构的表位交叉反应时, 一个分子被认为是特异性结合的 (在此也称为特异性相互作用)。可以测试在调查中的一组分子的交叉反应性, 例如, 通过在常规条件下, 评价所述组的分子与感兴趣的表位连同与许多或多或少 (结构上和/或功能上) 密切相关的表位的结合。只有在其相关背景下, 结合感兴趣的表位 (例如在蛋白结构中的特定基序) 但是并不或基本上不结合任何其他表位的那些分子才被认为是特异性针对感兴趣的表位的。在以下中描述了相应的方法, 例如 Harlow (哈洛)

和 Lane(拉内), *Antibodies: A Laboratory Manual* (抗体: 实验室手册), 冷泉港实验室出版社, 1988, 或 Harlow(哈洛) 和 Lane(拉内), *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (抗体使用: 实验室手册), 冷泉港实验室出版社, 1999。如在此使用, 术语“基本上不与类似结构的表位交叉反应的分子”是指与类似结构的表位相比, 结合靶抗原的分子具有至少 5 倍更高的亲和力, 更优选至少 10 倍更高的亲和力, 例如像至少 50 倍更高的亲和力, 更优选地至少 100 倍更高的亲和力, 例如像至少 500 倍更高的亲和力。甚至更有选地, 与类似结构的表位相比, 它与靶抗原的结合具有至少 1.000 倍更高的亲和力, 例如像至少 10.000 倍更高的亲和力, 以及最优选地, 至少 100.000 倍更高的亲和力。

[0016] 优选地, 本发明的双特异性结合分子与 CD3 的结合具有 5×10^{-7} 至 10^{-12} M, 更优选地, 10^{-8} 至 10^{-12} M, 最优选地, 10^{-9} 至 10^{-12} M 的 K_D 。同样, 本发明的双特异性结合分子与所选择的癌细胞上的表面靶抗原的结合具有 10^{-7} 至 10^{-12} M, 更优选地, 10^{-8} 至 10^{-12} M, 最优选地, 10^{-9} 至 10^{-12} M 的 K_D 。

[0017] 表位可以是构象的或连续的表位。在多肽抗原中, 构象的(或不连续的)表位特征在于, 在一级序列中分开的两个或更多个离散的氨基酸残基的存在, 但是当该多肽折叠为天然的三维结构以构成表位时, 这些氨基酸残基定位为在分子的表面上彼此接近(Sela(塞拉), (1969) *Science* (科学) 166, 1365 和 Laver(拉韦尔), (1990) *Cell* (细胞) 61, 553-6)。构成表位的这两个或更多个离散的氨基酸残基存在于分开的区段中或甚至存在于抗原的多于一个多肽链中。相反, 线性的或连续的表位由在多肽链的单个线性区段中相邻定位的两个或更多个离散的氨基酸残基组成。

[0018] 术语“癌细胞上的表面靶抗原”是指不在非肿瘤细胞上表达的或以比非肿瘤细胞更高的量在肿瘤细胞上表达的抗原。术语“癌细胞上的表面靶抗原”、“肿瘤抗原”和“肿瘤相关抗原”在此可互换地使用。癌细胞上的表面靶抗原不是 CD3 抗原, 并且更优选地, 不是 T 细胞受体的组分内的抗原。优选地, 该抗原以非肿瘤细胞上至少两倍更高的量在肿瘤细胞上表达, 更优选地至少五倍更高的量, 例如像至少 10 倍更高的量, 甚至更优选地, 至少 100 倍更高的量, 例如像至少 1000 倍更高的量, 并且最优选地, 至少 10.000 倍更高的量。适合的靶抗原包括在肿瘤细胞上表达更强的任何此类抗原。优选地, 该抗原是以下在此定义的抗原中的一种。

[0019] 术语“肽”是指高达 30 个氨基酸的线性分子链。另一方面, 如在此使用, 与术语“蛋白”可互换的术语“多肽”描述了氨基酸的线性分子链, 包括单链蛋白或它们的片段, 包含多于 30 个氨基酸。如在此使用, 术语“多肽”同时指肽和的多肽这二者。多肽可以进一步形成由至少两个相同的或不同的分子组成的寡聚物。相应地, 此类多聚体的相应的更高级结构称为同源二聚体或异源二聚体、同源三聚体或异源三聚体等。融合蛋白的同源二聚体、三聚体等也落在术语“多肽”的定义下。此外, 本发明也涵盖这样的多肽的肽模拟物(其中一个或多个氨基酸和/或肽键已被功能类似物替代)。此类功能性类似物包括除了 20 种基因编码的氨基酸之外的所有已知氨基酸, 例如硒代半胱氨酸。术语“多肽”和“肽”也指天然修饰的多肽, 其中修饰是例如由糖基化、乙酰化、磷酸化和本领域熟知的类似修饰等实现的。

[0020] 根据本发明, 结合分子包括以下项或由以下项组成: 如在 (a) 中定义的抗体, 和如在 (b) 中定义的 Fyn-SH3 源多肽。

[0021] 将理解, 所述 Fyn-SH3 源多肽的一个或多个拷贝可以存在于本发明的双特异性结

合分子中,例如像 Fyn-SH3 源多肽的两个、三个或四个拷贝。优选的是存在 Fyn-SH3 源的两个拷贝。如果存在 Fyn-SH3 源多肽的两个拷贝,则以下优选的选项是可获得的:(i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端(即换句话说,所述两个多肽的拷贝中的第一个连接至所述抗体的第一重链的 N-末端,并且所述两个多肽的第二拷贝连接至所述抗体的第二重链的 N-末端), (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C-末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N-末端,或 (iv) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C-末端。

[0022] 在此与术语“**Fynomer[®]**”可互换地使用的术语“Fyn SH3 源多肽 (Fyn SH3-derived polypeptide)”是指源自人 Fyn SH3 结构域的非免疫球蛋白源结合多肽(例如所谓的支架)。Fyn SH3 源多肽是本领域熟知的并且已经描述于例如以下文献中: Grabulovski(格拉博夫斯基)等人(2007)JBC, 282, 3196-3204 页, WO 2008/022759, Bertschinger(博程)等人(2007)Protein Eng Des Sel(蛋白质工程设计与选择)20(2):57-68, Gebauer(加保尔)和 Skerra(斯克拉)(2009)Curr Opin in Chemical Biology(化学生物学新见)13:245-255, 或 Schlatter(施拉特)等人(2012), MAbs 4:4, 1-12)。

[0023] Fyn 激酶的 SH3 结构域 (Fyn SH3) 包括 63 个残基,即由以下文献报道的序列的氨基酸 83 至 145: Semba(仙叶)等人(1986)(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A(美国科学院院刊)83(15):5459-63) 和 Kawakami(川上)等人(1986)(Mol Cell Biol.(分子细胞生物学)6(12):4195-20), 具有序列 GVTLFVALYDYEARTEDDL SFHKGEKFQIL NSSE GDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ, 如 SEQ ID NO:1 中所示。Fyn 是酪氨酸激酶的 Src 家族中的一个 59kDa 成员。由于可变剪接的结果, Fyn 蛋白以不同于它们的激酶结构域的两种不同的亚型存在:一种形式发现于胸腺细胞、脾细胞和一些血液系统淋巴样(hematolymphoid)细胞系,而第二种形式主要在脑中累积(Cooke(库克)和 Perlmutter(佩尔穆特)(1989), New Biol.(新生物学)1(1):66-74)。为一种细胞内蛋白的 Fyn 的生物学功能是多样的,并且包括经由 T 细胞受体的信号传导,脑功能的调节,连同粘附介导的信号传导(Resh(列什)(1998)Int. J. Biochem. Cell Biol.(生物化学和细胞生物学国际杂志)30(11):1159-62)。正如其他 SH3 结构域一样, Fyn SH3 由两个逆平行的 β 片组成,并且包含两个柔性环(RT-Src 和 n-Src-环),以便与其他蛋白相互作用。两个柔性环(称为 RT-Src 和 n-Src 环)的序列分别在 SEQ ID NO:1 中加下划线和双下划线。在人、小鼠、大鼠和猴(长臂猿)中, SEQ ID NO:1 的 Fyn SH3 的氨基酸序列是完全保守的。

[0024] 如在本领域中已经示出(WO 2008/022759; Grabulovski(格拉博夫斯基)等人(2007)JBC, 282, 3196-3204 页),对于产生结合多肽,即 **Fynomers[®]**, Fyn SH3 结构域是特别有吸引力的支架。对此,原因是由于 **Fynomers[®]** (i) 可以按高量的可溶形式在细菌中表达,

(ii) 当储存在溶液中时并不聚集, (iii) 非常稳定 (T_m 70.5°C), (iv) 缺少半胱氨酸残基, 以及 (v) 最初源自人, 特征在于从小鼠至人, 氨基酸序列完全保守, 由此减少了不想要的免疫原性反应。

[0025] 优选地, 本发明的 Fynomer[®] 并不是自然中存在或从自然分离的含天然 SH3 结构域的蛋白。换言之, 优选地, 本发明的范围排除了含野生型 SH3 结构域的蛋白。自然中存在丰富量的含 SH3 结构域的蛋白。这些天然 SH3 结构域具有对它们的天然配体的结合亲和力。多数这些天然 SH3 配体具有 PxxP 基序。本发明的 Fynomers[®] 是被设计为对不同于野生型 SH3 结构域的靶标的非天然靶标具有亲和力的工程化蛋白。SH3 结构域的非天然靶标可以是任何靶标, 其条件是所述靶标不是自然中存在的野生型 SH3 结构域的天然的 (即野生型的)、细胞内的配体。例如, SH3 结构域的非天然靶标可以是自然中存在的任何靶标, 优选地是哺乳动物中存在的, 更优选是人中存在的, 其条件还是所述靶标不是自然中存在的野生型 SH3 结构域的天然的、细胞内的配体。更优选地, 本发明的 Fynomers[®] 对任何天然的、细胞内的 SH3 结合配体, 最优选地对具有 PxxP 基序的任何天然的、细胞内的 SH3 结合配体基本上不具有结合亲和力。

[0026] 本领域已经描述了特异性结合针对具体靶抗原的 Fyn SH3 源多肽的衍生物。例如, 可以产生不同 Fyn SH3 的文库, 其中如以上 SEQ ID NO:1 中所示的序列已经被改变。优选地, 在以下方面进行了改变: (i) 在表示 RT 环的序列中 (如以上在 SEQ ID NO:1 中加下划线的部分所示), 或任选地在邻近所述序列多达两个氨基酸的位置中 (即 SEQ ID NO:1 中的序列 DYEARTEDDL), 或 (ii) 在 Scr 环中 (如以上在 SEQ ID NO:1 中加双下划线的部分所示) 或任选地在邻近所述序列多达两个氨基酸的位置中 (即 SEQ ID NO:1 中的序列 ILNSSEGD), 或 (iii) 同时在两个序列中。优选地, 改变是取代、缺失或添加, 如本领域所述 (参见例如 WO 2008/022759; Grabulovski (格拉博夫斯基) 等人 (2007) JBC, 282, 3196-3204 页)。用于改变氨基酸序列的装置和方法是本领域熟知的, 并且在本领域已经做了描述, 例如在 Grabulovski (格拉博夫斯基) 等人 (2007) JBC, 282, 3196-3204 页中。

[0027] 随后, 将 Fyn Sh3 文库克隆为噬菌粒载体, 例如像 pHEN1 (Hoogenboom (霍根布姆) 等人, “Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains (在丝状噬菌体表面上的多亚基蛋白: 用于展示抗体 (Fab) 重链和轻链的方法学”, Nucleic Acids Res (核酸研究), 19(15):4133-7, 1991), 并且随后可以在噬菌体上展示, 并且经历针对相应抗原的淘选, 优选重复多轮的淘选, 例如至少两轮, 更优选至少三轮的淘选。然后, 可以通过建立的技术, 例如像单克隆噬菌体 ELISA, 来进行对结合多肽的筛选。然后可以采用由此鉴定的克隆的测序, 以便揭示富集的序列。由此鉴定的结合多肽可以进一步经历另一个突变步骤, 例如像通过基于鉴定的序列的改变和重复的噬菌体展示以及淘选步骤, 产生另外的文库。最终, 可以分析生成的 Fyn SH3 源多肽的交叉反应性和免疫原性, 并且可以选择特异性针对靶抗原的 Fyn SH3 源多肽。

[0028] 结合多肽的噬菌体展示筛选和优化的方法是本领域通常已知的。

[0029] 在本发明的背景下, Fyn 激酶 SH3 结构域的 RT 环 (有时也指定为 RT-Scr 环) 由位于 SEQ ID NO:1 中的位置 12 至 17 的氨基酸 “EARTED” 组成。根据本发明, 在 RT 环中或

邻近 RT 环,待取代、缺失和 / 或添加 (即突变) 的位置是氨基酸 10 至 19,优选是 11 至 18,并且更优选是 12 至 17。

[0030] 同样,在本发明的背景下,FYN 激酶的 src 环 (有时也指定为 n-Src 环) 由位于 SEQ ID NO:1 中的位置 31 至 34 的氨基酸 NSSE 组成。根据本发明,在 Rsrc 环中或邻近 src 环,待取代、缺失和 / 或添加 (即突变) 的位置是氨基酸 29 至 36,优选是 30 至 35,并且更优选是 31 至 34。

[0031] 列举的至少 85% 序列一致性包含了序列一致性的任何更高值。序列一致性的设想值是至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89% 至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 和 100%。当确定序列一致性时,指示的氨基酸位置 (12 至 17 和 31 至 34) (这些位置是关于由 SEQ ID NO:1 组成的序列而限定的) 是不考虑的。换句话说,尽管主要实施例项 (i) 和 (ii) 要求关于 SEQ ID NO:1 的野生型 SH3 结构域序列的差异,但是 Fynomer[®] 序列的剩余部分仍具有 85% 和 100% 之间的与野生型的序列一致性。可以完成此类限定的序列一致性的确定,例如,通过进行配对序列比对,忽视由比对程序报道的序列一致性,并且重新评估序列一致性的程度,这样使得不考虑 SEQ ID NO:1 的位置 12 至 17 和 31 至 34。鉴于这些确定说明,技术人员可以立即完成序列一致性的此类重新评估。如提及的,在上文 SEQ ID NO:1 的序列的呈现中,从 12 至 17 和 31 至 34 的范围是加下划线的。当包括在任一侧的两个侧翼氨基酸时,获得了从 10 至 19 和 29 至 36 的范围 (总是就由 SEQ ID NO:1 组成的序列的氨基酸而言),它是根据主实施例项 (i) 和 (ii) 的区域,其中,在任一种情况下,一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸取代、缺失或添加都受影响。

[0032] 如在此使用,氨基酸序列之间的术语“氨基酸序列一致性”是指涉及生物化学方面的技术人员常见并且广泛使用的比对和比较技术。可以用常见比对方法和工具来确定两个氨基酸序列的氨基酸序列一致性。例如,为了确定任意多肽相对于 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的氨基酸序列一致性的程度,优选采用 SIM 局部相似性程序 (Xiaoquin Huang (黄小琴) 和 Webb Miller (韦伯米勒) (1991), *Advances in Applied Mathematics* (应用数学进展,卷 12:337-357),该软件是从作者处和他们的研究所免费可获得的 (参见万维网:<http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>)。对于多重对比分析,优选使用 ClustalW (Thompson (汤普森) 等人 (1994) *Nucleic Acids Res.* (核酸研究), 22(22):4673 - 4680)。相对于 SEQ ID NO:1 的完全序列,确定了多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的氨基酸序列一致性的程度,除了 SEQ ID NO:1 的位置 12 至 17 和 31 至 34 以外。

[0033] 取代可以是保守的或非保守的取代,但是优选是保守取代。在一些实施例中,取代还包括天然发生的氨基酸与非天然发生的氨基酸的交换。保守取代包括用具有类似于取代的氨基酸的化学特性的另一氨基酸取代氨基酸。优选地,保守取代是选自下组的取代,该组由以下各项组成:(i) 用不同的碱性氨基酸取代碱性氨基酸;(ii) 用不同的酸性氨基酸取代酸性氨基酸;(iii) 用不同的芳族氨基酸取代芳族氨基酸;(iv) 用不同的非极性脂肪族氨基酸取代非极性脂肪族氨基酸;以及 (v) 用不同的极性不带电氨基酸取代极性不带电氨基酸。碱性氨基酸选自下组,该组由以下各项组成:精氨酸、组氨酸、和赖氨酸。酸性氨基酸选自天冬氨酸和谷氨酸。芳族氨基酸选自下组,该组由以下各项组成:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。非极性脂肪族氨基酸选自下组,该组由以下各项组成:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮

氨酸、蛋氨酸和异亮氨酸。极性不带电氨基酸选自下组,该组由以下各项组成:丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。与保守氨基酸取代相反,非保守氨基酸取代是氨基酸与并不归入以上概述的保守取代(i)直至(v)下的任何氨基酸的交换。

[0034] CD3(分化群3)T细胞辅助受体或在此简称为“CD3”是一种蛋白复合物并且由四个不同的链组成。在哺乳动物中,该复合物包含一个CD3 γ 链、一个CD3 δ 链、和两个CD3 ϵ 链。这些链与称为T细胞受体(TCR)的分子相关,并且 ζ 链用来产生T淋巴细胞中的激活信号。TCR、 ζ 链、和CD3分子一起包括TCR复合物。如以上讨论,鼠和人源化的抗CD3抗体是本领域熟知的,例如莫罗单抗-CD3(Norman DJ(诺曼)(1995)Ther Drug Monit(治疗药物监测)17(6)615-620页)、特普利珠单抗和奥特利昔珠单抗(Chatenoud L.(切滕诺德)(2010)6(3)149-157),Cris-7(Alberola(阿尔贝罗拉)-Ila(伊拉)J.等人,(1991),J Immunol(免疫学杂志),146(4),1085-1092页)以及其他抗体,例如SP34(Conrad(卡雷德)等人,(2007)Cytometry(细胞计量术)71(11),925-933页)。此外,在文献中已经描述了同时识别CD3和癌细胞上的表面靶抗原的用于治疗癌症患者的若干双特异性抗体样式。然而并且如提及的,很多双特异性CD3样式显示出差的药物样特性,例如不满足易于生产、产品收得率、产品溶解度和产品的药物代谢动力学参数。

[0035] 根据本发明,如使用的术语“抗体”包括例如多克隆的或单克隆的抗体。此外,还有仍保留了结合特异性的其衍生物或片段,也包括在术语“抗体”中。抗体片段尤其包括Fab或Fab'片段、Fd、F(ab')₂、Fv或scFv片段,单个结构域V_H或V_L样结构域,例如V_HH或V-NAR结构域,连同多聚体样式,例如迷你抗体、双抗体、三抗体、四体抗体或化学上偶联的Fab'多聚体(参见例如Altshuler(阿特舒勒)等人,2010.,Holliger(霍利格)和Hudson(哈得孙),2005)。术语“抗体”还包括多个实施例,例如嵌合的(人恒定域、非人可变域),单链的和人源化的(除了非人CDR之外的人抗体)抗体。由两个重链和两个轻链组成的人源化全长IgG抗体是最优选的。因此术语“全长抗体”是指由两个重链和两个轻链组成的抗体。

[0036] “抗体的Fc段”是技术人员熟知的术语,并且是在抗体的木瓜蛋白酶切割的基础上定义的。取决于它们的重链的恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白被分为以下类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的若干种可以进一步分为多个亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4、IgA1、以及IgA2。根据重链恒定区,不同类别的免疫球蛋白被分别称为“ α ”、“ δ ”、“ ϵ ”、“ γ ”和“ μ ”。基于补体激活、C1q结合和Fc受体结合,抗体的Fc段直接涉及ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和CDC(补体依赖性细胞毒性)。四种人IgG同种型结合不同受体,例如新生儿Fc受体、激活的Fc γ 受体、Fc γ RI、Fc γ RIIa、和Fc γ RIIIa,具有不同亲和力的抑制性受体Fc γ RIIb、和C1q,产生了非常不同的活性。已知人抗体的Fc段的激活性和抑制性受体可以被工程化和修饰(参见Strohl W.(斯佐霍)(2009)Curr Opin Biotechnol(生物技术新见),20,685-691页)。

[0037] 特异性结合本发明的双特异性结合分子内的CD3的抗体优选地包括允许延长本发明的双特异性结合分子的体内半衰期的Fc段。此类Fc段优选来自人源,更优选是IgG1抗体的人Fc段,甚至更优选是具有激活或沉默效应子功能的IgG1的工程化的人Fc段,其中沉默效应子功能优选优于激活的效应子功能。最优选地,这样一个Fc段是具有沉默效应子功能的IgG1的工程化的人Fc段,具有突变L234和L235,这些突变是根据Kabat(卡巴特)的EU指数进行编号的(参见Johnson G.(约翰逊)和Wu T.T.(吴)(2000)Nucleic

Acids Res. (核酸研究) 28214-218 页)。具有已经用于下文实例的,用于制备构建体 COVA420、COVA422 和 COVA467 的 SEQ ID NO 2 和 3 的抗体是具有沉默效应子功能和在位置 L234 和 L235 具有的突变的抗 CD3 抗体。而且,具有已经用于下文实例的,用于制备构建体 COVA493、COVA494、COVA497 和 COVA499 的 SEQ ID NO 171 和 172 的抗体是在位置 D265 和 P329 具有沉默效应子突变的抗 CD3 抗体,这些位置是根据 Kabat(卡巴特)的 EU 指数进行编号的(参见 Shields RL.(希尔兹)等人(2001)J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 276, 6591-6604 页)。

[0038] 用于产生抗体及其片段的不同技术是本领域熟知的并且例如描述于 Altshuler(阿特舒勒)等人 2010 中。因此,多克隆抗体可以获得自用添加剂和佐剂的混合物中的抗原免疫后的动物的血液,并且可以通过提供由传代细胞系培养产生的抗体的任何技术,产生单克隆抗体。例如针对此类技术的实例描述于 Harlow(哈洛)和 Lane(拉内)(1988) 和 (1999),并且包括最初由 Köhler(科勒)和 Milstein(米尔斯坦),1975 描述的杂交瘤技术,以及三源杂交瘤技术,人 B 细胞杂交瘤技术(参见例如 Kozbor(柯兹波尔), 1983; Li(李)等人, 2006),以及 EBV 杂交瘤技术,以产生人单克隆抗体(Cole(科尔)等人, 1985)。此外,重组抗体可以获得自单克隆抗体,或者可以使用不同展示方法,例如噬菌体展示、核糖体展示、mRNA 展示、或细胞展示,从头制备。用于表达重组的(人源化的)抗体或其片段的适合系统可以选自,例如细菌的、酵母的、昆虫的、哺乳动物的细胞系,或转基因的动物或植物(参见美国专利 6,080,560; Holliger(霍利格)和 Hudson(哈得孙), 2005)。另外,描述用于产生单链抗体的技术(特别地参见美国专利 4,946,778)可以适应于产生特异性针对本发明的靶标的单链抗体。如用于 BIAcore 系统,表面等离子共振可以用于增加噬菌体抗体的功效。

[0039] 可以通过很多常规的并且熟知的技术中的任一种来制备本发明的双特异性结合分子,这些技术例如是普通有机合成策略、固相辅助合成技术或通过可商购的自动合成仪。另一方面,还可以通过单独地或与常规合成技术组合,用常规重组技术来制备它们。可以通过组合如本文以上(a)和(b)中限定的化合物,来获得根据本发明所述的双特异性结合分子。

[0040] 如以上提及的,同时识别 CD3 和癌细胞上的表面靶抗原的一些双特异性抗体展示了非常强的抗肿瘤杀伤活性。因此, BiTE[®] 抗体展示了表达靶肿瘤抗原的细胞的重新定向裂解的高效能。BiTE[®] 抗体的 EC₅₀ 值一般是在从 0.1 至 50pM 的范围中(Bauerle PA(鲍厄勒)和 Reinhardt C.(莱因哈特)(2009) Cancer Res. (癌症研究) 69(12), 4941-4944 页)。为了发挥药理学上希望的效果,需要肿瘤细胞的强细胞杀伤力。在一篇综述中, Rader C.(雷德)报道了 BiTE[®] 样式的强杀伤活性是归因于(1)它的小尺寸,使靶标和效应细胞非常接近,使得能够形成溶细胞突触,以及(2)在不存在靶细胞的情况下,防止效应细胞系统激活 TCR 复合物的单价接合(Rader C(雷德), (2011), Blood(血液), 117(17), 4403-4404 页)。此外,现有技术描述,在肿瘤细胞裂解方面,相对于其他 CD3 双特异性样式和完全单克隆 IgG1 抗体, BiTE[®] 类别的双特异性抗体典型地具有 100-10000 倍更高的功效(Wolf(沃尔夫)等人(2005) Drug Discov Today(药物发现今日) 10(18), 1237-1244 页)。完全抗

体也形成了本发明的双特异性结合分子的一部分。MØlhøj M. 等人进一步示出,与较大的二价 tandabs[®] 样式 (约 115kDa) 相比,较小并且单价的 BiTE[®] 样式 (55kDa) 远远更强 (在某些测定中多于 2000 倍) (MØlhøj M 等人 (2007), Mol Immunol (分子免疫学), 44 (8), 1935-1943 页)。作者注意到, BiTE[®] 与 CD3 的单价结合有助于 BiTE[®] 分子的强杀伤活性。

[0041] 总之,现有技术教授了与大的二价的 CD3 双特异性样式相比,小的单价的抗 CD3x 抗肿瘤抗原双特异性抗体样式 (例如 BiTE[®] 样式) 展示了更强的重定向 T 细胞杀伤活性。因此现有技术劝阻不要使用大的二价的 CD3 双特异性样式,因为典型地用小的单价 CD3 双特异性样式获得了强抗肿瘤杀伤力。

[0042] 联系本发明,令人惊讶地发现,由完全抗 CD3 抗体和结合肿瘤相关抗原的 Fynomer 的两个拷贝组成的双特异性结合分子能够介导强的重定向 T 细胞杀伤活性。值得注意的是,本发明的双特异性结合分子具有约 165kDa 的大小。在如典型地对小的单价的 CD3 双特异性分子,即 BiTE[®] 样式所见的可比较范围中,出乎意料地,本发明的大的双特异性结合分子的 T 细胞介导的细胞毒性与以上讨论的现有技术教授内容相反。证实了本发明的 CD3 双特异性结合分子和现有技术的单价 CD3 双特异性分子这二者的非常强的抗肿瘤杀伤活性的比较数据提供在本说明书的实例中。更确切地,示出了由抗 CD3 抗体和结合三种不同的肿瘤相关抗原的 Fynomer 组成的融合蛋白的实例。如在实例 1 和图 5 中所示,本发明的 CD3/HER2 双特异性分子 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 示出了与小的单价双特异性 scFv 对照 (SEQ ID NO:167) 一样好的细胞毒性功效,二者都具有两位数的 pM 范围中的 EC₅₀ 值 (分别为 87pM 和 60pM 的 EC₅₀ 值)。描述了本发明的 EGFR/CD3 双特异性分子 COVA493 (SEQ ID NO:170 和 172)、COVA494 (SEQ ID NO:171 和 198)、COVA497 (SEQ ID NO:199 和 172)、COVA499 (SEQ ID NO:171 和 200) 的实例 2,连同描述了本发明的 CD33/CD3 双特异性分子 COVA467 (SEQ ID NO:2 和 175) 的实例 3 另外示出了本发明的双特异性分子的强的重定向 T 细胞杀伤活性。此外,图 6 示出,在使用富集的 T 细胞作为中介物的杀伤测定中,对于本发明的双特异性分子 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 及 COVA422 (SEQ ID NO:165 和 166) 这二者,都获得了皮摩尔的 EC₅₀ 值 (分别为 8pM 和 175pM)。此外,如在此的实例所示,本发明的 Fynomer 抗体融合示出了非常有利的表达量 (在瞬时转染 CHO 细胞后,在两位数的 mg/1 范围中),可比的双特异性 scFv 对照抗体样式 (SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:173 和 SEQ ID NO:176)。此外,本发明的 Fynomer 抗体融合具有有利的生物物理特性并且并不聚集 (图 3; 图 11 和图 15. A),并且展示了长的 IgG 样体内半衰期 (图 8)。增加的半衰期直接转化为它对患者的显著益处,因为将不再需要连续输注,和 / 或连续治疗之间的更长间隔变得可能,这还有助于降低保健系统的成本负担。在每周两次注射后,在体内肿瘤模型中,COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 展示了显著的肿瘤生长迟滞,如与 scFv 对照分子 (COVA446 (SEQ ID NO:167); 每天注射) 相比,这是优异的,进一步证明了 COVA420 的强抗肿瘤功效 (图 9)。

[0043] 此外,并且如提及的,由于它们的小尺寸,单价 CD3 双特异性分子特征在于仅数个小时的短血清半衰期。因此通常需要用轻便小型泵连续静脉内输注来给予小尺寸单价 CD3 双特异性分子,这对于待治疗的患者而言是不方便的。有利地,本发明的双特异性分子具有与如典型地用全长抗体获得的分子大致相同的血清半衰期 (参见实例),该血清半衰期是

优于单价 CD3 双特异性分子的血清半衰期的。单价 CD3 双特异性分子的另一主要限制是它们缺少与功能特性（例如结合 F_c受体）相关的抗体的恒定区。本发明的双特异性分子包括抗 CD3 抗体的恒定区。

[0044] 因此，本发明的 CD3 双特异性结合抗体组合了单价 CD3 双特异性分子和完全抗 CD3 抗体的优点。

[0045] 本发明的 CD3 双特异性结合分子优于单价 CD3 双特异性分子，具体地优于 BiTE[®] 抗体的另一优点归因于熟知的并且以上讨论的事实：在非肿瘤细胞上也表达在癌细胞中过表达的很多表面靶抗原，虽然是以显著更低的水平表达。介导强的重定向 T 细胞杀伤活性的双特异性分子理想地在具有高水平的表面抗原的癌细胞上选择性地发挥其活性，并且在具有低水平的表面抗原的正常细胞上不发挥活性。

[0046] 因此，虽然 BiTE[®] 抗体展示了表达肿瘤抗原的细胞的重新定向的裂解的高效能，但是 BiTE[®] 抗体的主要缺陷之一是它们还达到相当大的程度地杀伤以低水平表达肿瘤抗原的非肿瘤细胞。例如，Lutterbuese（卢特布斯）等人报道了在猴中，以 31 和 154 $\mu\text{g/kg/d}$ 的剂量，开始输注后 56 小时内，抗 CD3/EGFR BiTE[®] 示出了严重的毒性症状（Lutterbuese R.（卢特布斯）等人（2010）PNAS, 107 卷, 28 期, 12605-12610 页）。以 31 或 154 $\mu\text{g/kg/d}$ 接收 C-BiTE 的动物的组织学分析示出肝和肾毒性的症状，这可能是由于在这些器官中，表达低水平的 EGFR 的细胞的重新定向的裂解。此外，作者注意到，在已知表达 EGFR 的所有组织中的细胞死亡，这些组织即唾液腺、肝、胃、小肠、结肠、直肠、肾、肾上腺、输尿管、膀胱、前列腺和附睾。

[0047] 在本文以下的实例中，也确认了由双特异性 scFv 抗体片段对 EGFR 表达细胞的非选择性杀伤。乳癌 MDA-MB-468 细胞大量过表达 EGFR，而结肠癌 HT-29 细胞具有与非肿瘤细胞几乎相等的 EGFR 表达水平（Yingjie（英杰）等人（2005）；Mol Cancer Ther（分子癌症治疗学），4（3）：435-442）。如在实例 2.3 中所示，双特异性抗 CD3/EGFR scFv 抗体片段（SEQ ID NO:173）介导了具有高 EGFR 表达水平的细胞（MDA-MB-468 细胞）连同具有低 EGFR 表达水平的细胞（HT-29 细胞）的强的重新定向的裂解。杀伤 MDA-MB-468 和 HT-29 细胞的 EC₅₀ 值分别为 0.2 pM 和 2.5 pM（即仅 12.5 倍差异的一个因子）。如对 EGFR 所示例，双特异性 scFv 抗体片段因此并不能够介导选择性地针对过表达表面肿瘤抗原的细胞的强的重定向 T 细胞杀伤活性。由本发明的诸位发明人连同以上讨论的文件，Lutterbuese R.（卢特布斯）等人观察到了非肿瘤细胞的相当大的不希望的细胞杀伤副作用。

[0048] 相反，令人惊讶地发现，由抗 CD3 抗体和结合肿瘤相关抗原的 Fynomer 组成的双特异性结合分子能够介导选择性地针对过表达该抗原的细胞的强的重定向 T 细胞杀伤活性，而即使处在高浓度，具有低水平的抗原的细胞不被杀伤。如在针对各自由一个抗 CD3 抗体和结合 EGFR 的 Fynomer 的两个拷贝组成的四种不同双特异性结合分子的实例 2.3 中所示，在高和低 EGFR 表达细胞之间的杀伤活性方面的差异范围是在 580 和 >3'500 的一个因子之间。

[0049] 此外，从本发明的实例 1.7 中明显的是，靶向 CD3 和 HER2 表达细胞的双特异性 scFv 抗体片段还非选择性地杀伤以高水平连同以低水平表达 HER2 的两种细胞。卵巢癌 SKOV-3 细胞大量过表达 HER2，而乳癌 MCF-7 细胞具有 HER2 的远远更低的表达水平

(Lattrich(拉特里奇)等人(2008), *Oncology Reports*(肿瘤学报道), 19:811-817)。如在实例 1.7 中所示, 双特异性抗 CD3/HER2scFv 抗体片段 (SEQ ID NO:167) 介导了具有高 HER2 表达水平的细胞 (SKOV-3 细胞) 连同具有低 HER2 表达水平的细胞 (HER2 细胞) 的强的重新定向的裂解。杀伤 SKOV-3 和 MCF-7 细胞的 EC_{50} 值分别为 2.3pM 和 53pM (即仅 23 倍差异的一个因子)。因此, 针对 CD3 和 HER2 的双特异性 scFv 抗体片段也不能够介导选择性地针对过表达表面肿瘤抗原的细胞的强的重新定向 T 细胞杀伤活性。诸位发明人再一次观察到了非肿瘤细胞的相当大的不希望的细胞杀伤副作用, 联系针对 CD3 和 EGFR 的双特异性 scFv 抗体片段, 由此确认了获得的结果。

[0050] 再次令人惊讶地发现, 由抗 CD3 抗体和结合肿瘤相关抗原 (即 HER2) 的 Fynomer 组成的双特异性结合分子能够介导选择性地针对过表达该抗原的细胞的强的重新定向 T 细胞杀伤活性, 而即使处在高浓度, 具有低水平的抗原的细胞不被杀伤。如在针对由一个抗 CD3 抗体和结合 HER2 的 Fynomer (SEQ ID NO 163 和 164) 的两个拷贝组成的双特异性结合分子的实例 1.7 和图 10 中所示, 在高和低 HER2 表达细胞之间的杀伤活性方面的差异为 >4310 的一个因子。

[0051] 选择性杀伤过表达该抗原的肿瘤细胞同时放过具有正常抗原水平的细胞直接转化为对患者的显著益处, 因为改进了基于 CD3 的方法的治疗窗。因此, 通过使用本发明的双特异性构建体, 可以最小化甚至避免非肿瘤细胞的不想要的细胞杀伤副作用。

[0052] 根据本发明的优选实施例, 特异性结合 CD3 的抗体是特普利珠单抗、奥特利昔珠单抗、Cris-7 或 SP34。

[0053] 抗体特普利珠单抗、奥特利昔珠单抗 (Chatenoud L. (切滕诺德) (2010) 6(3) 149-157 页)、Cris-7 (Alberola (阿尔贝罗拉) 等人, (1991), *J Immunol* (免疫学杂志), 146(4), 1085-1092 页) 和 SP34 是从现有技术中获知的。抗体特普利珠单抗 (CAS 号: 876387-05-2), 也称为 MGA031 和 hOKT3- γ 1 (Ala-Ala), 是人源化的抗 CD3 单克隆抗体。特普利珠单抗结合在成熟 T 淋巴细胞上表达的 CD3 ϵ 链的表位, 并且通过这样做, 可以调节在多种自身免疫疾病下的病理免疫性反应。确切地, 特普利珠单抗可以抑制不想要的效应 T 细胞, 并且增强有益的调节 T 细胞功能, 由此促进免疫耐受。奥特利昔珠单抗 (CAS 号 881191-44-2), 也称为 TRX4, 同样靶向 CD3 的 ϵ 链。单克隆抗体 Cris-7 识别成熟人 T 细胞上的 CD3 抗原。该 CD3 抗原是由与 T 细胞受体 (TCR) 关联的四个不同的链 (CD3 γ 、CD3 δ 和两个 CD3 ϵ) 组成的蛋白复合物, 并且该 ζ 链用来产生 T 淋巴细胞中的激活信号。该抗体可以获得自 BMA BIOMEDICALS 公司。SP34 可以获得自 BD Biosciences 公司。

[0054] 根据本发明, 优选的是, 将 Cris-7 或 SP34 的人源化型式 (version) 用作特异性结合 CD3 的抗体。

[0055] 用于人源化抗体的装置和方法是本领域中良好确立的; 参见例如 Riechmann (里艾克曼) 等人 (1988), *Nature* (自然) 332(6162): 332-323 或 Kashmiri (克什米尔) 等人, *Methods* (方法) 36(1): 25-34。

[0056] 抗体特普利珠单抗和奥特利昔珠单抗是具有沉默的效应子功能的抗体。还优选的是, 将具有沉默的效应子功能的 Cris-7 或 SP34 的修饰型式用作特异性结合 CD3 的抗体。如以上在此进一步详述的, 最优选的是, 具有沉默的效应子功能的抗体具有在 L234 和 L235, 或在位置 D265 和 P329 处的突变, 这些位置是根据 Kabat (卡巴特) 的 EU 指数进行编号的。

必须理解的是,还优选的是,将具有沉默的效应子功能的Cris-7或SP34的人源化型式用作特异性结合CD3的抗体。

[0057] 根据本发明的优选实施例,该抗CD3抗体包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3,或包括或由SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3组成。

[0058] 贯穿本说明书必须理解的是,SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3分别是抗CD3抗体的V_H和V_L区。在本发明的抗CD3抗体包括SEQ ID NO:2的V_H区并且同时不包括SEQ ID NO:3的V_L区的情况下,应理解的是,该抗CD3抗体包括抗CD3抗体的V_L区(非SEQ ID NO:3)。同样,在本发明的抗CD3抗体包括SEQ ID NO:3的V_L区并且同时不包括SEQ ID NO:2的V_H区的情况下,应理解的是,该抗CD3抗体包括抗CD3抗体的V_H区(非SEQ ID NO:2)。

[0059] 在本发明的另一优选实施例中,该抗CD3抗体包括SEQ ID NO:171和/或SEQ ID NO:172,或包括或由SEQ ID NO:171和SEQ ID NO:172组成。

[0060] 贯穿本说明书必须理解的是,SEQ ID NO:171和SEQ ID NO:172分别是抗CD3抗体的V_H和V_L区。在本发明的抗CD3抗体包括SEQ ID NO:171的V_H区并且同时不包括SEQ ID NO:172的V_L区的情况下,应理解的是,该抗CD3抗体包括抗CD3抗体的V_L区(非SEQ ID NO:172)。同样,在本发明的抗CD3抗体包括SEQ ID NO:172的V_L区并且同时不包括SEQ ID NO:171的V_H区的情况下,应理解的是,该抗CD3抗体包括抗CD3抗体的V_H区(非SEQ ID NO:171)。

[0061] 从以下实例中可以看出,已经将包括SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的抗CD3抗体与包括SEQ ID NO:171和SEQ ID NO:172的抗CD3抗体用于说明本发明。

[0062] 根据本发明的另一个优选实施例,结合分子包括特异性结合HER2、CD19、EGFR、CEA、EPHA2、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖、IGFR1、CD33、成纤维细胞活化蛋白 α 、前列腺干细胞抗原(PSCA)、c-MET、EpCAM、或PSMA的两个Fyn-SH3源多肽。在这一清单内,HER2和CD33是最优选的。在三个靶的这一清单内,EGFR和HER2是优选的,EGFR是最优选的。

[0063] 因此,本发明的优选结合分子包括特异性结合HER2的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合CD19的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合EGFR的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合CEA的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合EPHA2的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合IGFR1的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合CD33的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合成纤维细胞活化蛋白 α 的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合前列腺干细胞抗原(PSCA)的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合c-MET的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合EpCAM的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3;包括特异性结合PSMA的两个Fyn-SH3源多肽并且包括SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3。

[0064] 同样,本发明的优选结合分子包括特异性结合HER2的两个Fyn-SH3源多肽并且包

括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 CD19 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 EGFR 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 CEA 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 EPHA2 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 IGFR1 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 CD33 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合成纤维细胞活化蛋白 α 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合前列腺干细胞抗原 (PSCA) 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 c-MET 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 EpCAM 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172 ;包括特异性结合 PSMA 的两个 Fyn-SH3 源多肽并且包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 SEQ ID NO:172。

[0065] 以上讨论的蛋白和抗原在本领域中被良好地表征为或包括在癌细胞上表达的表面靶抗原。

[0066] HER2(人表皮生长因子受体 2),也称为 Neu、ErbB-2、CD340(分化群 340)或 p185,在人中是由 ERBB2 基因编码的蛋白。HER2 是 185-kDa 受体,第一次描述于 1984 年 (Schlechter(施莱希特)等人 (1984)Nature(自然)312:513-516)。HER2 是表皮生长因子受体 (EGFR/ErbB) 家族的一个成员。由 NCBI 参考序列 :NP_004439 表示人 HER2。已经示出,在某些侵略性乳癌的病理和进展中,这一基因的扩增或过表达发挥了重要作用,并且在近年,它已经发展为变成对该疾病进行治疗的重要生物标记和靶标。其他 HER2 阳性肿瘤包括卵巢癌和胃癌。

[0067] B 淋巴细胞抗原 CD19 或 CD19(分化群 19)在人中是由 CD19 基因编码的蛋白 (NCBI 参考序列 :NP_001171569)。由于 CD19 是 B 细胞的印记,所以该蛋白已经被用于诊断并且作为靶标来治疗由这一类型的细胞引起的癌症——值得注意的是 B 细胞淋巴瘤,包括 B-ALL 和非霍奇金淋巴瘤 (NHL)。

[0068] 表皮生长因子受体 (人中的 EGFR ;ErbB-1 ;HER1)是针对胞外蛋白配体的表皮生长因子家族 (EGF 家族)的成员的细胞表面受体 (NCBI 参考序列 :NP_005219)。EGFR 在肺癌、头颈癌和结肠直肠癌中的作用是已知的。

[0069] 癌胚抗原 (CEA)是细胞粘附中涉及的糖蛋白 (NCBI 参考序列 :AAA66186)。发现来自患有结肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌和乳癌的个体,连同来自患有甲状腺髓样癌的个体的血清具有比健康个体更高水平的 CEA(高于 2.5ng/ml)。

[0070] EPH 受体 A2(肝配蛋白类型 A 受体 2)在人中是由 EPHA2 基因编码的蛋白 (NCBI 参考序列 :AAH37166)。EPHA2 在癌症中的作用是已知的,例如从 Kinch MS(金奇),Carles(卡尔斯)-Kinch K(金奇) (2003),Clin. Exp. Metastasis(临床与实验转移)20(1):59-68 可知。研究已经报道,在很多癌症类型,包括皮肤黑素瘤中,过表达 EphA2。报道 EphA2 促进神经胶质瘤和前列腺癌细胞以配体独立的方式迁移 (Udayakumar(乌迪库马尔)等人 (2011),Oncogene(癌基因)30:4921-4929)。

[0071] 硫酸软骨素蛋白多糖 4 (NCBI 参考序列 :NP_001888), 也称为黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖 (MCSP) 或神经元胶质抗原 2 (NG2), 在人中是由 CSPG4 基因编码的硫酸软骨素蛋白多糖。在内皮基膜上的黑色素瘤细胞扩散的早期事件期间, CSPG4 在稳定细胞-基底相互作用中发挥作用。它表示由人恶性黑色素瘤细胞表达的整合膜硫酸软骨素蛋白多糖。

[0072] 胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 受体 (NCBI 参考序列 :P08069) 是在人细胞表面上发现的蛋白。它是由称为胰岛素样生长因子 (IGF-1) 的激素和由称为 IGF-2 的相关激素激活的跨膜受体。在若干癌症中牵连 IGF-1R, 这些癌症包括乳癌、前列腺癌、和肺癌。

[0073] CD33 或涎免凝集素 3 (Siglec-3) 是在髓系的细胞上表达的跨膜受体。CD33 可以用作用于治疗急性髓细胞白血病的靶标。人 CD33 是由 NCBI 参考序列 :NP_001763.3 表示的并且已经描述于本领域, 例如描述于 Raponi (拉波尼) 等人 (2011) Leuk. Lymphoma (白血病和淋巴瘤) 52 (6):1098-1107 中。

[0074] 成纤维细胞活化蛋白 (NCBI 参考序列 :AAB49652), α (FAP), 也称为 seprase 或 170kDa 黑色素瘤膜结合明胶酶, 在人中是由 FAP 基因编码的蛋白。它选择性地表达于上皮癌的反应性基质成纤维细胞、愈合伤口的肉芽组织、以及骨与软组织肉瘤的恶性细胞中。

[0075] 前列腺干细胞抗原 (NCBI 参考序列 :AAC39607) 在人中是由 PSCA 基因编码的蛋白。这一基因在前列腺癌中以比例的上调, 并且在膀胱癌和胰腺癌中也检测到了。

[0076] c-Met (MET 或 MNNG HOS 转化基因) 是编码称为肝细胞生长因子受体 (HGFR) (NCBI 参考序列 :NP_000236) 的蛋白的原癌基因。在癌症中异常 MET 激活与预后不良相关, 其中异常活跃的 MET 触发肿瘤生长, 触发供应肿瘤营养素的新血管的形成, 并触发至其他器官的癌症扩散。在很多类型的人恶性肿瘤中 MET 被解除控制, 这些恶性肿瘤包括肺癌、肾癌、肝癌、胃癌、乳癌、和脑癌。

[0077] 上皮的细胞粘附分子 (EpCAM) 在人中是由 EPCAM 基因编码的蛋白。EpCAM 是在几乎所有恶性肿瘤上表达的泛上皮分化抗原。由 UniProtKB/Swiss-Prot 登录号 P16422.2 表示人 EpCAM (公开日 2012 年 2 月 22 日), 并且已经描述于本领域, 例如 Strnad (斯特纳德) 等人 (1989) Cancer Res. (癌症研究) 49 (2):314-317。

[0078] 前列腺特异性膜抗原 (PSMA) (也称为谷氨酸羧肽酶 II) (NCBI 参考文献 :AAA60209) 是类型 2 整合膜糖蛋白, 发现于前列腺组织和少数其他组织中。它是前列腺癌的治疗靶标。

[0079] 如从以上内容明显的是, HER2、CD19、EGFR、CEA、EPHA2、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖、IGFR1、CD33、成纤维细胞活化蛋白 α 、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、c-MET、EpCAM、或 PSMA 涉及具体癌症类型的病理和治疗。在本发明的结合分子包括特异性结合 HER2、CD19、EGFR、CEA、EPHA2、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖、IGFR1、CD33、成纤维细胞活化蛋白 α 、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、c-MET、EpCAM、或 PSMA 的两个 Fyn-SH3 源多肽的情况下, 优选的是, 对应的结合分子被分别用于治疗与 HER2、CD19、EGFR、CEA、EPHA2、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖、IGFR1、CD33、成纤维细胞活化蛋白 α 、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、c-MET、EpCAM、或 PSMA 的过表达关联的癌症。

[0080] 本发明的结合分子可以包括特异性结合 HER2 的两个 Fyn-SH3 源多肽, 其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端 (即换句话说, 所述两个多肽的拷

贝中的第一个连接至所述抗体的第一重链的 N- 末端, 并且所述两个多肽的第二拷贝连接至所述抗体的第二重链的 N- 末端), (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端, 或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0081] 在以上选项的背景下, 优选的是, 结合分子包括特异性结合 HER2 的两个 Fyn-SH3 源多肽, 其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端。

[0082] 与 HER2 的特异性结合是指本发明的多肽特异性结合 HER2 而不结合其他相关蛋白, 例如 EGFR。“特异性结合 HER2 的多肽”优选地是“抑制 HER2 的活性的多肽”。此类多肽具有降低或完全消除 HER2 的活性的能力, 在上文详细描述了该活性。在此方面, 优选的是, 抑制 HER2 活性是指抑制受体与其配体的结合。另外, 优选并且优选顺序渐增的是, 该多肽抑制 HER2 活性的是至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或 100%。还优选并且优选顺序渐增的是, 本发明的多肽抑制 HER2 的 IC_{50} 值是 1000nM 或更低、500nM 或更低、400nM 或更低、300nM 或更低、200nM 或更低、100nM 或更小、或 75nM 或更小。优选地, 如通过 FACS 确定, 本发明的多肽结合 HER2, 以 10^{-7} 至 10^{-12} M 的、更优选地 10^{-8} 至 10^{-12} M 的、最优选地 10^{-9} 至 10^{-12} M 的 EC_{50} 值。

[0083] 特异性结合 HER2 的两个 Fyn-SH3 源多肽优选结合 HER2 的相同表位。从以下实例中可以看出, 抗 HER2 结合 Fynomer[®] C12 (SEQ ID NO:4) 已经被用于说明本发明。因此, 优选的是, 该结合分子包括 SEQ ID NO:4 的两个拷贝。

[0084] 因此优选并且优选顺序渐增的是, 特异性结合 HER2 的 Fyn-SH3 源多肽具有与 SEQ ID NO:4 (Fynomer[®] C12) 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性。

[0085] 更优选地, 特异性结合 HER2 的 Fyn-SH3 源多肽具有下式 I, 其条件是, 所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 85% 序列一致性, 其中一致性的确定排除了对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 和 31 至 34 的氨基酸位置。

[0086] $GVTLFVALYDYX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}LSFHKGEKFQILX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}GX_{17}WWX_{18}ARSLTTGEX_{19}GX_{20}IP SX_{21}YVAPVDSIQ$ (式 I),

[0087] 其中 X_1 至 X_7 和 X_{11} 至 X_{13} 以及 X_{17} 至 X_{21} 是各自独立地选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P、N 和 C; 更优选地, 选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P 和 N; 并且其中 X_8 至 X_{10} 和 X_{14} 至 X_{16} 是各自独立地选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P、N 和 C; 更优选地, 选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P 和 N; 或其中 X_8 至 X_{10} 和 X_{14} 至 X_{16} 中的一个或多个缺失 (分别是 SEQ ID NO:5 或优选地是 SEQ ID NO:168)。还优选的是, 本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:5 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体或由它们组成, 其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗

体的两个重链中的第二 N- 末端。同样优选的是,本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:168 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体或由它们组成,其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体、的两个重链中的第二 N- 末端。

[0088] 甚至更优选地,

[0089] X_1 选自 :T、E、D、Q、Y、V、W、N、S、F 或 K

[0090] X_2 选自 :S、A、R 或 T

[0091] X_3 选自 :Y、R、H、T、N、V、W 或 S

[0092] X_4 选自 :N、D、M、Y、R、P、E、L、H、T、G 或 F

[0093] X_5 选自 :T、S、P、Q、R、K、G、A、D、M、N、L、F、Y 或 E

[0094] X_6 选自 :R、M、K、D、F、T、G、H、S、P、N、Q、Y、L、A 或 P

[0095] X_7 选自 :D、G、V、L、H、N、R、F、S 或 A

[0096] X_8 选自 :G、S、E、D、P、Y 或缺失

[0097] X_9 选自 :Q、D、S、H 或缺失

[0098] X_{10} 选自 :D、V 或缺失

[0099] X_{11} 选自 :R、K、Q、N、S、G、W、M、H、L、F、E、T、P、A、D 或 V

[0100] X_{12} 选自 :M、R、E、G、N、D、S、A、Q、F、P、K、Y、T、H、V、L 或 W

[0101] X_{13} 选自 :E、W、P、R、K、S、V、N、D、H、G、T、Q、A、Y、L 或 M

[0102] X_{14} 选自 :D、R、Q、S、A、N、P、I、H、T、Y、E、L、K、M、V、I、W 或缺失

[0103] X_{15} 选自 :G、S、I、L、A、V、T、E、D、Q、R、P、K、M、H、Y 或缺失

[0104] X_{16} 选自 :K、G、R、A、T、V、S、I、E、Q、P、D、N、H 或缺失

[0105] X_{17} 选自 :V、D、T、I 或 Y

[0106] X_{18} 选自 :E、A、R、T 或 Q

[0107] X_{19} 选自 :T、I 或 V

[0108] X_{20} 选自 :Y、L 或 F 并且

[0109] X_{21} 选自 :N 或 S(SEQ ID NO:6)。

[0110] 另外优选的是,本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:6 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体或由它们组成,其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端。

[0111] 在另一更优选的实施例中,式 I 中的残基 X 独立地选自以下: X_1 至 X_{10} 是 TSYNTRD(即其中 X_8 至 X_{10} 缺失;SEQ ID NO:7); X_{11} 至 X_{16} 是 RMED(即其中 X_{14} 至 X_{16} 缺失;SEQ ID NO:8); X_{17} 是 V; X_{18} 是 E; X_{19} 是 T; X_{20} 是 Y 和 / 或 X_{21} 是 N。因此,另外优选的是,本发明的结合分子包括式 I 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体或由它们组成,其中式 I 中的残基 X 独立地选自以下: X_1 至 X_{10} 是 TSYNTRD(即其中 X_8 至 X_{10} 缺失;SEQ ID NO:7); X_{11} 至 X_{16} 是 RMED(即其中 X_{14} 至 X_{16} 缺失;SEQ ID NO:8); X_{17} 是 V; X_{18} 是 E; X_{19} 是 T; X_{20} 是 Y 和 / 或 X_{21} 是 N,其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端。还优选的是,将以上列举的特定残基 X_{11} 至 X_{21} 组合使用。

[0112] 优选并且优选顺序渐增的是,包括具有与 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的特异性结合 HER2 的以上定义的 Fyn-SH3 源多肽保留了或基本上保留了由 SEQ ID NO:4 组成的结合多肽的结合能力,即保留了或基本上保留了与对应的靶表位结合的强度(例如,如经由解离常数确定)。基本上保留了特异性结合 HER2 的 Fyn-SH3 源多肽的结合能力,如果保留了其结合能力的至少 60% 的话。优选地,保留了其结合能力的至少 75% 或更优选地至少 80%。更优选的是,保留了结合能力的至少 90%,例如至少 95%,甚至更优选至少 98%,例如至少 99%。更优选的是,结合能力是完全的,即达到 100% 保留。

[0113] 当通过表面等离子体共振 (SPR) 确定时,对于 HER2 上的特异性表位, Fyn SH3 源多肽 C12 (SEQ ID NO:4) 具有 7×10^{-8} M 的解离常数。为此,捕获了该 Fyn SH3 源多肽,例如通过已经固定在 BIAcore 传感器芯片上的 His- 标记特异性抗体。当注射包含特异性表位的抗原时,监测复合物的形成,并且通过使用 BIAcore 评估软件的曲线拟合,获得了动力学结合常数 (k_{on}) 和动力学解离常数 (k_{off}), 或解离常数 (K_D)。相应地,包括(优选顺序渐增)具有与 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的结合多肽基本上保留了结合能力,如果优选地在相同条件下,保留至少 1×10^{-6} M, 优选至少 1×10^{-7} M 的 HER2 结合的解离常数的话。而且根据本发明地是与由 SEQ ID NO:4 组成的结合多肽相比,具有增加的结合能力,即多于 100% 活性的结合多肽。例如,在此设想的是,结合多肽具有至少 1×10^{-8} M 的解离常数,例如像至少 1×10^{-9} M, 更优选至少 1×10^{-10} M, 例如像至少 1×10^{-11} M, 甚至更优选至少 1×10^{-12} M 并且最优选至少 1×10^{-13} M。评价结合能力的方法是本领域熟知的,包括而不限于表面等离子体共振 (SPR) 技术或 ELISA。

[0114] 在本发明的另一优选实施例中,该 Fyn SH3 源多肽(即无抗 CD3 抗体的多肽)具有选自下组的序列,该组由 SEQ ID NO 4 和 9 至 159 组成。该 Fyn SH3 源多肽最优选是 C12 (SEQ ID NO:4)。相应地,还优选的是,本发明的结合分子由选自下组的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体组成,该组由 SEQ ID NO 4 和 9 至 159 组成(其中 SEQ ID NO 4 是最优选的),其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端。

[0115] 在以上实施例中,其中该 Fyn-SH3 源多肽是特异性结合 HER2 的 Fyn-SH3 源多肽,因此,特别优选地是,该特异性结合 CD3 的抗体包括 SEQ ID NO:2 和 / 或 3。

[0116] 根据本发明的另一优选实施例,特异性结合 CD3 的抗体和 Fyn-SH3 源多肽是通过接头连接的。在本发明的双特异性结合分子包括两个 Fyn-SH3 源多肽和特异性结合 CD3 的抗体或由它们组成的情况下,第一个 Fyn-SH3 源多肽通过接头连接至特异性结合 CD3 的抗体,并且第二个 Fyn-SH3 源的多肽通过接头连接至特异性结合 CD3 的抗体。

[0117] 如根据本发明使用,术语“接头”涉及氨基酸的后续(即肽接头)连同涉及非肽接头,该接头分开了本发明的特异性结合 CD3 的抗体和 Fyn-SH3 源多肽。将理解的是,在本发明的结合分子包括单多肽链的情况下,该接头是一个肽接头。

[0118] 该接头的性质,即长度和 / 或构成(例如像氨基酸序列)可以改性或增强该双特异性分子的稳定性和 / 或溶解度,这可以增强生成的结合分子的灵活性和 / 或可以通过降

低空间位阻改进对靶抗原的结合。接头的长度和构成取决于本发明的结合分子的对应结合多肽的构成。技术人员非常清楚用来测试不同接头的溶解度的方法。例如,当使用不同类型的接头时,可以通过分析其结合亲和力,容易地测试结合分子的特性。此外,可以单独针对各个结合多肽进行对应的测量,并且与结合分子结合亲和力进行比较。可以通过本领域已知的方法来测量生成的分子的稳定性,例如在 37℃ 在人血清中孵育若干时段后,使用 ELISA 方法来确定该分子的残余结合能力。

[0119] 如根据本发明使用,术语“非肽接头”是指具有两个或更多个反应基但是排除了肽接头的连接基团。例如,非肽接头可以是聚合物,例如像聚乙二醇,该聚合物在两端具有反应基,这些反应基单独地结合本发明的分子的结合部分的反应基,例如氨基端、赖氨酸残基、组氨酸残基或半胱氨酸残基。非肽接头的反应基包括羟基、醛基、丙醛基、丁醛基、马来酰亚胺基、酮基、乙烯基砜基、硫醇基、酰肼基、羰基二咪唑(CDI)基、硝苯基碳酸(NPC)基、甲苯磺酸基、异氰酸基、以及琥珀酰亚胺衍生物。琥珀酰亚胺衍生物的实例包括琥珀酰亚胺基丙酸酯(SPA)、琥珀酰亚胺基丁酸(SBA)、琥珀酰亚胺基羧甲基化物(SCM)、琥珀酰亚胺基琥珀酰胺(SSA)、琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(SS)、琥珀酰亚胺基碳酸酯、以及 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。在非肽聚合物的两端的反应基可以是相同的或不同的。例如,非肽聚合物可以在一端具有马来酰亚胺基并且在另一端具有醛基。优选地,该聚合物是聚乙二醇。

[0120] 给出的首选是肽的(或肽)接头,更确切地是具有从 2 至 30 个氨基酸的长度的寡肽。还谨慎地设想了单氨基酸的使用。肽接头的优选长度范围是从 5 至 15 个氨基酸。其他优选长度是 3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、19 或 20 个氨基酸。

[0121] 特别优选的是,接头是由至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或 100% 的小氨基酸(例如甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸)组成的肽。特别优选的是仅由甘氨酸和丝氨酸组成的接头。最优选的是 SEQ ID NO:160 至 162 的接头,其中给出的特别首选是由 SEQ ID NO:162 的序列组成的肽的接头。

[0122] 根据本发明的一个更优选的实施例,该接头是一个肽接头。根据本发明的甚至更优选的实施例,该接头具有一个选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:162、160 和 161。SEQ ID NO:162 的接头是最优选的。

[0123] 在以上实施例中,在该 Fyn-SH3 源多肽是特异性结合 HER2 的 Fyn-SH3 源多肽的情况下,此外,特别优选的是,特异性结合 CD3 的抗体和特异性结合 HER2 的两个 Fyn-SH3 源多肽是经由包括 SEQ ID NO:162 的接头连接的。

[0124] 从以下实例中可以看出,已经经由具有 SEQ ID NO:162 的接头,将包括 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗体融合至 Fynomer[®] C12(SEQ ID NO:4)。产生了与所述抗体的重链的 N-末端(COVA420)连同 C-末端(COVA422)的融合。

[0125] 根据本发明的另外的优选实施例,结合分子包括特异性结合 EGFR 的两个 Fyn-SH3 源多肽,其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C-末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N-末端,或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻

链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0126] 与 EGFR 的特异性结合是指本发明的多肽特异性结合 EGFR 而不结合其他相关蛋白, 例如 HER2。“特异性结合 EGFR 的多肽”优选地是“抑制 EGFR 的活性的多肽”。此类多肽具有降低或完全消除 EGFR 的活性的能力, 在上文详细描述了该活性。在此方面, 优选的是, 抑制 EGFR 活性是指抑制受体与其配体的结合。另外, 优选并且优选顺序渐增的是, 该多肽抑制 EGFR 活性至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或 100%。还优选并且优选顺序渐增的是, 本发明的多肽抑制 EGFR 的 IC_{50} 值是 1000nM 或更低、500nM 或更低、400nM 或更低、300nM 或更低、200nM 或更低、100nM 或更低、或 75nM 或更小。优选地, 如通过 FACS 确定, 本发明的多肽结合 EGFR, 以 10^{-7} 至 10^{-12} M 的、更优选地 10^{-8} 至 10^{-12} M 的、最优选地 10^{-9} 至 10^{-12} 的 EC_{50} 值。

[0127] 特异性结合 EGFR 的两个 Fyn-SH3 源多肽优选结合 EGFR 的相同表位。从以下实例中可以看出, 抗 EGFR 结合 Fynomer[®] ER7L2D6 (SEQ ID NO:169) 和 ER9L3D7 (SEQ ID NO:187) 已经被用于说明本发明。因此, 优选的是, 该结合分子包括 SEQ ID NO:169 或 SEQ ID NO:187 的两个拷贝。

[0128] 优选并且优选顺序渐增的是, 特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽具有与 SEQ ID NO:169 (Fynomer[®] ER7L2D6) 或 ER9L3D7 (SEQ ID NO:187) 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性。还优选的是, 特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽包括选自下组的氨基酸序列或由它们组成, 该组由以下各项组成: (a)

[0129] GVTFLFVAX₁YDYEARGLX₂RX₃FDLSFHKGEKFQILX₄X₅X₆X₇X₈GDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVD SIQ (式 II),

[0130] 其中氨基酸位置 X₁ 至 X₈ 可以是任何氨基酸序列, 并且氨基酸位置 X₄ 至 X₈ 之一任选地缺失, 以及 (b) 与 (a) 的氨基酸序列至少 85% 一致性、优选至少 90% 一致性并且更优选至少 95% 一致的氨基酸序列, 其中一致性确定排除了氨基酸位置 X₃ 至 X₇ 并且其条件是式 (II) 的氨基酸位置 12 至 20 中, 氨基酸序列 EARGLX₂RX₃F (SEQ ID NO:209) (其中 X₂ 优选为 N 或 H 并且 X₃ 优选为 M 或 L (SEQ ID NO:204)) 是保守的。

[0131] 更优选地, 特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽具有下式 II, 其条件是, 所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 85% 序列一致性, 其中一致性的确定排除了对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 和 31 至 34 的氨基酸位置。在此方面, 注意到在以下式 II 中, 由于添加了三个氨基酸至 SEQ ID NO:1 的 RT 环中, 所以 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 对应于氨基酸位置 12 至 20。

[0132] GVTFLFVAX₁YDYEARGLX₂RX₃FDLSFHKGEKFQILX₄X₅X₆X₇X₈GDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVD SIQ (式 II),

[0133] 其中 X₁ 至 X₇ 各自独立地选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P、N 和 C; 更优选地, 选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P 和 N; 并且其中 X₈ 是各自独立地选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P、N 和 C; 更优选地, 选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P 和 N; 或其中 X₈ 缺失 (分别是 SEQ ID NO:201 或优选地

是 SEQ ID NO:202)。还优选地是,本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:201 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:171 和 SEQ ID NO:172 的抗 CD3 抗体或由它们组成,其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端,并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端,或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。同样优选地是,本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:202 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:171 和 SEQ ID NO:172 的抗 CD3 抗体或由它们组成,其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端,并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端,或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0134] 甚至更优选地,

[0135] X_1 选自 :L 或 V

[0136] X_2 选自 :N 或 H

[0137] X_3 选自 :M 或 L

[0138] X_4 选自 :S、N、Q、A、D、T 或 L

[0139] X_5 选自 :F、T、R 或 P

[0140] X_6 选自 :S、E、T 或 Q

[0141] X_7 选自 :E、T、S 或 N 并且

[0142] X_8 选自 :S 或缺失 (SEQ ID NO:203)。

[0143] 因此,另外优选地是,本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:203 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:171 和 SEQ ID NO:172 的抗 CD3 抗体或由它们组成,其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端,并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端,或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0144] 优选并且优选顺序渐增的是,以上定义的特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽包括具有与 SEQ ID NO:169 或 SEQ ID NO:187 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成,该

Fyn-SH3 源多肽保留了或基本上保留了由 SEQ ID NO:169 或 SEQ ID NO:187 组成的结合多肽的结合能力,即保留了或基本上保留了与对应的靶表位结合的强度(例如,如经由 EC₅₀ 值确定)。基本上保留了特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽的结合能力,如果保留了其结合能力的至少 60%的话。优选地,保留了其结合能力的至少 75%或更优选地至少 80%。更优选的是,保留了结合能力的至少 90%,例如至少 95%,甚至更优选至少 98%,例如至少 99%。更优选的是,结合能力是完全的,即达到 100%保留。

[0145] 在 FACS 实验中,针对结合,对于 EGFR 上的特异性表位,Fyn SH3 源多肽 ER7L2D6(SEQ ID NO:169) 具有 3.3nM 的 EC₅₀值,并且 ER9L3D7(SEQ ID NO:187) 具有 15.0nM 的 EC₅₀值。为了确定这些 EC₅₀值,将在 0.46nM 和 333nM 之间的浓度的纯化的多种 Fynomer 与 EGFR 阳性 MDA-MB-468 细胞一起孵育。借助小鼠抗 myc 标记抗体 9E10(以 3:2 的 Fynomer:9E10 的摩尔比与 Fynomer 共孵育),然后借助抗小鼠 IgG Alex488 偶联物来检测结合的多种 Fynomer,随后是在细胞仪上进行分析。确定平均荧光强度值,并且将其对比 Fynomer 浓度的 log₁₀ 值作图,以使用曲线拟合软件 GraphPad prism 确定 EC₅₀值。相应地,包括(优选顺序渐增)具有与 SEQ ID NO:169 或 187 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的结合多肽基本上保留了结合能力,如果优选地在相同条件下,保留至少 1×10^{-6} M,优选至少 1×10^{-7} M 的 EGFR 结合的解离常数的话。而且根据本发明地是与由 SEQ ID NO:169 或 SEQ ID NO:187 组成的结合多肽相比,具有增加的结合能力,即多于 100%活性的结合多肽。例如,在此设想的是,结合多肽具有至少 1×10^{-8} M 的解离常数,例如像至少 1×10^{-9} M,更优选至少 1×10^{-10} M,例如像至少 1×10^{-11} M,甚至更优选至少 1×10^{-12} M 并且最优选至少 1×10^{-13} M。评价结合能力的方法是本领域熟知的,包括而不限于表面等离子体共振 (SPR) 技术或 ELISA。

[0146] 还优选并且优选顺序渐增的是,本发明的结合分子包括以上定义的、特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽中的两种以及 SEQ ID NO:171 和 SEQ ID NO:172 的抗 CD3 抗体或由其组成的,该 Fyn-SH3 源多肽具有与 SEQ ID NO:169 或 SEQ ID NO:187 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性的氨基酸序列,其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端,(ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C-末端,(iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N-末端,或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C-末端。

[0147] 在本发明的另一优选的实施例中,该 Fyn SH3 源多肽具有一个选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO 169 和 187 至 197。该 Fyn SH3 源多肽最优选地是 ER7L2D6(SEQ ID NO:169)。因此,还优选的是,本发明的结合分子包括两个选自下组的 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:171 与 SEQ ID NO:172 的抗 CD3 抗体,该组由以下各项组成:SEQ ID NO 169 以及 187 至 197(其中 SEQ ID NO:169 是最优选的),其中 (i) 所述两个

多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端, 或 (iv) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0148] 在以上实施例中, 其中该 Fyn-SH3 源多肽是特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽, 因此, 特别优选的是, 该特异性结合 CD3 的抗体包括 SEQ ID NO:171 和 / 或 172。

[0149] 如所提及的, 根据本发明的另一个优选实施例, 该特异性结合 CD3 的抗体和该 Fyn-SH3 源多肽是通过一个接头连接。根据本发明的一个更优选的实施例, 该接头是一个肽接头。根据本发明的甚至更优选的实施例, 该接头具有一个选自下组的序列, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:162、160 和 161。

[0150] 在以上实施例中, 当该 Fyn-SH3 源多肽是特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽时, 另外特别优选的是, 该特异性结合 CD3 的抗体和这两个特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽经由一个包括 SEQ ID NO:162 的接头相连。

[0151] 从以下实例中可以看出, 一个包括 SEQ ID NO:171 和 SEQ ID NO:172 的抗 CD3 抗体已经经由一个具有 SEQ ID NO:162 的接头融合到该 Fynomer[®] ER7L2D6 (SEQ ID NO:169)。产生至所述抗体的轻链的 N- 末端的融合 (即, 由 SEQ ID NO:171 和 198 组成的 COVA494)。

[0152] 因为本发明首次提供了特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽, 在一个实施例中, 本发明还涉及一特异性结合 EGFR 的多肽, 其中该多肽包括或由一个选自下组氨基酸序列组成, 该组由以下各项组成: (a)

[0153] GVTLFVAX₁YDYEARGLX₂RX₃FDLSFHKGEKFQILX₄X₅X₆X₇X₈GDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVD SIQ (式 II),

[0154] 其中氨基酸位置 X₁ 至 X₈ 可以是任何氨基酸序列, 并且氨基酸位置 X₄ 至 X₈ 之一任选地缺失, 以及 (b) 与 (a) 的氨基酸序列至少 85% 一致性、优选至少 90% 一致性并且更优选至少 95% 一致的氨基酸序列, 其中一致性确定排除了氨基酸位置 X₃ 至 X₇ 并且其条件是式 (II) 的氨基酸位置 12 至 20 中, 氨基酸序列 EARGLX₂RX₃F (SEQ ID NO:209) (其中 X₂ 优选为 N 或 H 并且 X₃ 优选为 M 或 L (SEQ ID NO:204)) 是保守的。

[0155] 在此使用的短语“一致性确定排除了氨基酸位置 X₄ 至 X₇”是指该关于式 (II) 的序列一致性的计算不考虑氨基酸位置 X₄ 至 X₇ 但限于 SEQ ID NO:1 的剩余氨基酸位置。在此使用的条件“条件是式 (II) 的氨基酸位置 12 至 20 中, 氨基酸序列 EARGLX₂RX₃F (SEQ ID NO:209) (其中 X₂ 优选为 N 或 H 并且 X₃ 优选为 M 或 L (SEQ ID NO:204)) 是保守的”是指无氨基酸变化可以被引入氨基酸位置 12 至 20。在其他术语中, 对应于式 (II) 的氨基酸位置 12 至 20 的这些氨基酸位置具有在所有多肽中落入本发明以上实施例及其以下优选实例的范畴中的序列 EARGLX₂RX₃F (SEQ ID NO:209) (其中 X₂ 优选为 N 或 H 并且 X₃ 优选为 M 或 L (SEQ ID NO:204))。

[0156] 在特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽的一个优选的实施例中

[0157] X₁ 选自: L 或 V

[0158] X_2 选自 :N 或 H

[0159] X_3 选自 :M 或 L

[0160] X_4 选自 :S、N、Q、A、D、T 或 L

[0161] X_5 选自 :F、T、R 或 P

[0162] X_6 选自 :S、E、T 或 Q

[0163] X_7 选自 :E、T、S 或 N, 并且

[0164] X_8 选自 :S 或不存在 (SEQ ID NO:203)

[0165] 在该特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽的一个更优选的实施例中, 该多肽包括或由一个选自下组的氨基酸序列组成, 该组由以下各项组成 :SEQ ID NO 169 和 187 至 197 中任一个。

[0166] 如以下实例中所示, 发现 SEQ ID NO 169 和 187 至 197 特异性结合 EGFR。

[0167] 此外, 本发明还在一个实施例中涉及一种融合构建体, 该构建体包括本发明的特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽融合到一种另外的化合物, 所述另外的化合物优选地不是一种抗 CD3 抗体。该另外的化合物优选地是一种药学上有活性的化合物、一种前药、一种药学上可接受的载体、一种诊断上有活性的化合物、一种细胞渗透促进剂、和 / 或一种调整血清半衰期的化合物。更详细地, 该另外的化合物优选地选自下组, 该组由以下各项组成 : (a) 一种荧光染料, (b) 一种光敏剂, (c) 一种放射性核素, (d) 一种用于医学成像的造影剂, (e) 一种细胞因子, (f) 一种有毒化合物, (g) 一种趋化因子, (h) 一种促凝因子, (i) 一种用于活化前药的酶, (k) 一种白蛋白结合剂, (l) 一种白蛋白, (m) 一种 IgG 粘合剂, 或 (n) 聚乙二醇。最优选地, 该另外的化合物由以下组成或包括 : 一个抗体轻链, 一个抗体重链, 一个抗体的 F_c 结构域、一个抗体、或其组合。在这个列表中, 最优选的是一个抗体。该抗体优选地融合到两个拷贝本发明的特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽。

[0168] 此外, 本发明在一个实施例中涉及编码本发明的特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽的核酸分子, 以及在适用的情况下, 融合构建体。

[0169] 在一个实施例中, 本发明还涉及一种药用组或诊断组合物, 其包括本发明的特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽和 / 或编码本发明的特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽的核酸分子和 / 或融合构建体, 该构建体包括本发明的特异性结合 EGFR 的 Fyn-SH3 源多肽融合到一种另外的化合物。该药物组合物优选地用于在一个治疗或预防癌症的方法中使用。

[0170] 在特异性地结合至 (i) CD3 和 (ii) 癌细胞上的表面靶抗原的结合分子的又一个优选的实施例中, 本发明涉及一种结合分子, 该结合分子包括两个特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽, 其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端, 或 (iv) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0171] 在以上选项的上下文中, 优选的是, 该结合分子包括两个特异性结合 CD33 的

Fyn-SH3 源多肽,其中所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C-末端并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C-末端。

[0172] 特异性结合 CD33 意味着本发明的多肽特异性结合 CD33 而不是其他相关蛋白,例如涎凝集素 (Siglec) 家族的其他成员。该“特异性结合 CD33 的多肽”优选地是一种“抑制 CD33 活性的多肽”。这样一种多肽具有减少或完全消除 CD33 活性的能力,该活性在以上进行了详细描述。在此方面,优选的是,抑制 CD33 活性意味着抑制该受体与其配体的结合。此外,优选并且优选顺序渐增的是,该多肽抑制至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或 100% 的 CD33 活性。还优选并且优选顺序渐增的是,本发明的多肽抑制 CD33 的 IC_{50} 值是 1000nM 或更小、500nM 或更小、400nM 或更小、300nM 或更小、200nM 或更小、100nM 或更小、或 75nM 或更小。优选地,如通过 FACS 确定,本发明的多肽结合 CD33,以 10^{-7} 至 10^{-12} M,更优选 10^{-8} 至 10^{-12} M,最优选 10^{-9} 至 10^{-12} M 的 EC_{50} 值。

[0173] 这两个特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽优选地结合至 CD33 的相同表位。从以下实例中可以看出,结合该抗 CD33 的 Fynomer® EE1L1B3 (SEQ ID NO:174) 已经被用于说明本发明。因此,优选的是,该结合分子包括两个拷贝的 SEQ ID NO:174。

[0174] 优选的是,该特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽与 SEQ ID NO:174 (Fynomer® EE1L1B3) 的氨基酸序列具有优选顺序渐增地至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性。还优选的是,该特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽包括或由一个选自下组氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:(a)

[0175] GVTLFVALYDYEALGAHEL SFHKGEKFQILX₁X₂X₃X₄X₅X₆GPFWEAHS LTTGETGWIPS NYVAPVDSIQ (式 III),

[0176] 其中氨基酸位置 X₁ 至 X₆ 可以是任何氨基酸序列,并且氨基酸位置 X₁ 至 X₆ 中的一个或两个可任选地缺失,以及 (b) 与 (a) 的氨基酸序列至少 85% 一致性、优选至少 90% 一致性并且更优选至少 95% 一致的氨基酸序列,其中一致性确定排除了氨基酸位置 X₁ 至 X₄ 并且其条件是在式 (III) 的氨基酸位置 12 至 18 中,氨基酸序列 EALGAHE (SEQ ID NO:208) 是保守的。

[0177] 更优选地,特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽具有下式 III,其条件是,所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 85% 序列一致性,其中一致性的确定排除了对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸位置 12 至 17 和 31 至 34 的氨基酸位置。

[0178] GVTLFVALYDYEALGAHEL SFHKGEKFQILX₁X₂X₃X₄X₅X₆GPFWEAHS LTTGETGWIPS NYVAPVDSIQ (式 III),

[0179] 其中 X₁ 至 X₄ 各自独立地选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P、N 和 C;更优选地,选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P 和 N;并且其中 X₅ 和 X₆ 各自独立地选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P、N 和 C;更优选地,选自 G、V、T、L、F、A、Y、D、S、H、K、E、Q、I、W、R、M、P 和 N;或其中 X₅ 和 X₆ 不存在(分别为 SEQ ID NO:205 或优选地 SEQ ID NO:206)。还优选地是,本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:205 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体或由它们组成,其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端,并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端, (ii) 所述两个多肽中的第

一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端, 或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。同样优选地是, 本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:206 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体或由它们组成, 其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端, 或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0180] 甚至更优选地,

[0181] X_1 选自 :N、R、S、L、M、D 或 Y

[0182] X_2 选自 :S、G、P、R、M 或 V

[0183] X_3 选自 :L、T、G、S、V、R 或 A

[0184] X_4 选自 :S、A、L、Q、D、V、K 或 E

[0185] X_5 选自 :E、V、Q、L、A、R 或不存在, 并且

[0186] X_6 选自 :L、G 或不存在 (SEQ ID NO:207)。

[0187] 另外优选地是, 本发明的结合分子包括 SEQ ID NO:207 的两个 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体或由它们组成, 其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N- 末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C- 末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N- 末端, 或 (iv) 所述连个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C- 末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C- 末端。

[0188] 优选并且优选顺序渐增的是, 以上定义的特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽包括具有与 SEQ ID NO:174 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成, 该 Fyn-SH3 源多肽保留了或基本上保留了由 SEQ ID NO:174 组成的结合多肽的结合能力, 即保留了或基本上保留了与对应的靶表位结合的强度 (例如, 如经由 EC_{50} 值确定)。如果保留了其至少 60% 的结合能力, 该特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽的结合能力被基本上保留。优选地, 保留了其结合能力的至少 75% 或更优选地至少 80%。更优选的是, 保留了结合能力的至少 90%, 例如至少 95%, 甚至更优选至少 98%, 例如至少 99%。更优选的是, 结合能力是完全的, 即达到 100% 保留。

[0189] 在 FACS 实验中, 针对结合, 对于 CD33 上的特异性表位, Fyn SH3 源多肽 EE1L1B3 (SEQ ID NO:174) 具有 5.7nM 的 EC_{50} 值。为了确定该 EC_{50} 值, 在 300nM 和 0.41nM 之间浓度的纯化 Fynomer 与 CD33 阳性 U937 细胞进行孵育, 这些细胞用 Fc 受体阻滞剂进行预处理。借助小鼠抗 myc 标记抗体 9E10 (以 4:1 的 Fynomer:9E10 的摩尔比与 Fynomer 共孵育), 然后借助抗小鼠 IgG Alex488 偶联物来检测结合的多种 Fynomer, 随后是在细胞仪上进行分析。确定平均荧光强度值, 并且将其对比 Fynomer 浓度的 log10 值作图, 以使用曲线拟合软件 GraphPad prism 确定 EC_{50} 值。相应地, 包括 (优选顺序渐增) 具有与 SEQ ID NO:174 的氨基酸序列至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、以及至少 95% 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的结合多肽基本上保留了结合能力, 如果优选地在相同条件下, 保留至少 $1 \times 10^{-6}M$, 优选至少 $1 \times 10^{-7}M$ 的 CD33 结合的解离常数的话。而且根据本发明地是与由 SEQ ID NO:174 组成的结合多肽相比, 具有增加的结合能力, 即多于 100% 活性的结合多肽。例如, 在此设想的是, 结合多肽具有至少 $1 \times 10^{-8}M$ 的解离常数, 例如像至少 $1 \times 10^{-9}M$, 更优选至少 $1 \times 10^{-10}M$, 例如像至少 $1 \times 10^{-11}M$, 甚至更优选至少 $1 \times 10^{-12}M$ 并且最优选至少 $1 \times 10^{-13}M$ 。评价结合能力的方法是本领域熟知的, 包括而不限于表面等离子体共振 (SPR) 技术或 ELISA。

[0190] 在本发明的另一优选的实施例中, 该 Fyn SH3 源多肽具有一个选自下组的序列, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO 174 和 177 至 186。该 Fyn SH3 源多肽最优选地是 EE1L1B3 (SEQ ID NO:174)。因此, 还优选的是, 本发明的结合分子包括两个选自下组的 Fyn-SH3 源多肽以及 SEQ ID NO:2 与 SEQ ID NO:3 的抗 CD3 抗体, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO 174 以及 177 至 186 (其中 SEQ ID NO:174 是最优选的), 其中 (i) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 N-末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 N-末端, (ii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个重链中的第一 C-末端, 并且所述两个多肽中第二个连接至所述抗体的两个重链中的第二 C-末端, (iii) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 N-末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 N-末端, 或 (iv) 所述两个多肽中的第一个连接至所述抗体的两个轻链中的第一 C-末端, 并且所述两个多肽中的第二个连接至所述抗体的两个轻链中的第二 C-末端。

[0191] 在以上实施例中, 其中该 Fyn-SH3 源多肽是特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽, 因此, 特别优选的是, 该特异性结合 CD3 的抗体包括 SEQ ID NO:2 和 / 或 3。

[0192] 根据本发明的另一个优选实施例, 该特异性结合 CD3 的抗体和该 Fyn-SH3 源多肽是通过一个接头连接。如所提及的, 根据本发明的一个更优选的实施例, 该接头是一个肽接头。根据本发明的甚至更优选的实施例, 该接头具有一个选自下组的序列, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:162、160 和 161。

[0193] 在以上实施例中, 当该 Fyn-SH3 源多肽是特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽时, 另外特别优选的是, 该特异性结合 CD3 的抗体和这两个特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽经由一个包括 SEQ ID NO:162 的接头相连。

[0194] 从以下实例中可以看出, 一个包括 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗体已经经由一个具有 SEQ ID NO:162 的接头融合到该 EE1L1B3 (SEQ ID NO:174)。产生至所述抗体的轻链的 C-末端的融合 (即, 由 SEQ ID NO:2 和 175 组成的 COVA467)。

[0195] 因为本发明首次提供了特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽,在一个实施例中,本发明还涉及一种特异性结合 CD33 的多肽,其中该多肽包括或由一个选自下组氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:(a)

[0196] GVTLFVALYDYEALGAHEL SFHKGEKFQILX₁X₂X₃X₄X₅X₆GPFWEAHS LTTGETGWIPS NYVAPVDSIQ (式 III),

[0197] 其中氨基酸位置 X₁至 X₆可以是任何氨基酸序列,并且氨基酸位置 X₁至 X₆中的一个或两个可任选地缺失,以及(b)与(a)的氨基酸序列至少 85%一致性、优选至少 90%一致性并且更优选至少 95%一致的氨基酸序列,其中一致性确定排除了氨基酸位置 X₁至 X₄并且其条件是在式(III)的氨基酸位置 12 至 18 中,氨基酸序列 EALGAHE (SEQ ID NO:208) 是保守的。

[0198] 在此使用的短语“一致性确定排除了氨基酸位置 X₁至 X₄”是指该关于式(III)的序列一致性的计算不考虑氨基酸位置 X₁至 X₄但限于 SEQ ID NO:1 的剩余氨基酸位置。在此使用的条件“条件是在式(III)的氨基酸位置 12 至 18 中,氨基酸序列 EALGAHE (SEQ ID NO:208) 是保守的”是指无氨基酸变化可以被引入氨基酸位置 12 至 18。在其他术语中,对应于式(III)的氨基酸位置 12 至 18 的这些氨基酸位置具有在所有多肽中落入本发明以上实施例及其以下优选实例的范畴中的序列 EALGAHE (SEQ ID NO:208)。

[0199] 在该特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽的一个优选的实施例中

[0200] X₁选自:N、R、S、L、M、D 或 Y

[0201] X₂选自:S、G、P、R、M 或 V

[0202] X₃选自:L、T、G、S、V、R 或 A

[0203] X₄是选自:S、A、L、Q、D、V、K 或 E

[0204] X₅是选自:E、V、Q、L、A、R 或不存在,并且

[0205] X₆选自:L、G 或不存在 (SEQ ID NO:207)。

[0206] 在该特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽的一个更优选的实施例中,该多肽包括或由一个选自下组氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO 174 和 177 至 186 中任一个。

[0207] 如以下实例中所示,发现 SEQ ID NO 174 和 177 至 186 特异性结合 CD33。

[0208] 此外,本发明还在一个实施例中涉及一种融合构建体,该构建体包括本发明的特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽融合到一种另外的化合物,所述另外的化合物优选地不是一种抗 CD3 抗体。该另外的化合物优选地是一种药学上有活性的化合物、一种前药、一种药学上可接受的载体、一种诊断上有活性的化合物、一种细胞渗透促进剂、和/或一种调整血清半衰期的化合物。更详细地,该另外的化合物优选地选自下组,该组由以下各项组成:(a)一种荧光染料,(b)一种光敏剂,(c)一种放射性核素,(d)一种用于医学成像的造影剂,(e)一种细胞因子,(f)一种有毒化合物,(g)一种趋化因子,(h)一种促凝因子,(i)一种用于活化前药的酶,(k)一种白蛋白结合剂,(l)一种白蛋白,(m)一种 IgG 粘合剂,或(n)聚乙二醇。最优选地,该另外的化合物由以下组成或包括:一个抗体轻链,一个抗体重链,一个抗体的 F_c结构域、一个抗体、或其组合。在这个列表中,最优选的是一个抗体。该抗体优选地融合到两个拷贝本发明的特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽。

[0209] 此外,本发明在一个实施例中涉及编码本发明的特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多

肽的核酸分子,以及在适用的情况下,融合构建体。

[0210] 在一个实施例中,本发明还涉及一种药用组或诊断组合物,其包括本发明的特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽和 / 或编码本发明的特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽的核酸分子 / 或融合构建体,该构建体包括本发明的特异性结合 CD33 的 Fyn-SH3 源多肽融合到一种另外的化合物。该药物组合物优选地用于在一个治疗或预防癌症的方法中使用。

[0211] 根据本发明的另一个优选实施例,本发明的双特异性结合分子包括 SEQ ID NO 163 和 / 或 164,或包括或由以下各项组成:SEQ ID NO 163 和 164。

[0212] 从以下实例中可以看出,由 SEQ ID NO 163 和 164 (COVA420) 组成的该双特异性结合分子已经被产生用以说明本发明。描述于本文实例中的化合物 COVA420 由 SEQ ID NO:2 和 3 的抗体组成,其中该特异性地结合至 SEQ ID NO:4 的 HER2 的 Fyn-SH3 源多肽的一个拷贝经由该具有 SEQ ID NO:162 的接头连接到所述抗体的两个重链的第一和第二 N-末端。在实例中提供的靶向 HER2 的化合物中,COVA420 显示出最高的表达量、最低的 EC₅₀ 值以及最佳的肿瘤细胞选择性,因此显示出最优的肿瘤细胞杀伤特性。

[0213] 根据本发明的一个优选实施例,该双特异性结合分子包含 SEQ ID NO171 和 / 或 198。

[0214] 从以下实例中可以看出,一个包括 SEQ ID NO:171 和 SEQ ID NO:172 的抗 CD-3 抗体已经经由一个具有 SEQ ID NO:162 的接头融合到该 Fynomer[®] ER7L2D6 (SEQ ID NO:169)。更详细地,该融合是至所述抗体的轻链的 N-末端,由此产生该化合物 COVA494 (SEQ ID NO:171 和 198)。在实例中提供的靶向 EGFR 的化合物中,COVA494 具有有利的生物物理特性并且显示出最优的肿瘤细胞选择性,因此显示出最优的肿瘤细胞杀伤特性。

[0215] 根据本发明的又一个优选实施例,该双特异性结合分子包含 SEQ ID NO2 和 / 或 175。

[0216] 从以下实例中可以看出,一个包括 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的抗体已经经由一个具有 SEQ ID NO:162 的接头融合到该 EE1L1B3 (SEQ ID NO:174)。更详细地,该融合是至所述抗体的轻链的 C-末端,由此产生该化合物 COVA467 (SEQ ID NO:2 和 175)。所述化合物显示出有利的生物物理特性以及肿瘤细胞杀伤特性。

[0217] 在另一个实施例中,本发明涉及一种核酸分子,该核酸分子编码本发明的结合分子。

[0218] 由于本发明的结合分子可以是两个不同分子的一个 (或多个) 拷贝的络合物,本发明的结合分子的这些组分可以由一个或两个 (或多于两个) 核酸分子所编码。在一个优选实施例中,一个核酸分子编码该完整的单链分子。

[0219] 在另一个实施例中,本发明涉及一种载体,该载体包括本发明的核酸分子。

[0220] 本发明的核酸可以是 DNA、RNA、PNA 及其任何其他类似物。这些载体和分离细胞,特别是宿主细胞,可以是适合目的 (例如,本发明的多肽和 / 或融合蛋白的生产) 的任何常规类型,治疗有用的载体和分离细胞,例如用于基因疗法。技术人员将能够从大量现有技术中选择出那些核酸、载体以及分离细胞,并且证实通过常规方法它们针对所希望目的特定适合性,而没有过度负担。

[0221] 典型地,该核酸可操作地连接至启动子,优选地连接至选自包含 T5 启动子 / lac 操作元件、T7 启动子 / lac 操作元件的原核启动子组、或选自包含 hEF1-HTLV、CMV enh/hFerL

启动子的真核启动子组的启动子。

[0222] 还应当理解,本发明的载体是包含本发明的核酸并且优选地能够产生本发明的多肽或融合蛋白的载体。优选地,这样一种载体选自下组,该组由以下各项组成:pQE 载体、pET 载体、pFUSE 载体、pUC 载体、YAC 载体、噬菌粒载体、噬菌体载体、用于基因治疗的载体,如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒。

[0223] 在一个实施例中本发明还涉及携带本发明载体的宿主细胞或非人宿主。

[0224] 所述宿主或宿主细胞可以通过将本发明载体引入到一种宿主或宿主细胞中产生,一旦存在,其介导由该载体编码的结合分子的表达。

[0225] 根据本发明,该宿主可以是用本发明载体转染和/或表达本发明载体的转基因非人动物。在一个优选的实施例中,该转基因动物是非人哺乳动物,例如仓鼠、牛、猫、猪、狗或马。

[0226] 优选的是宿主细胞,例如可为细胞培养物的一部分的分离细胞。

[0227] 适合的原核宿主细胞包括例如埃希菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属和鼠伤寒沙门菌的细菌。适合的真核细胞例如为真菌细胞,尤其是诸如酿酒酵母或毕赤酵母的酵母,或诸如果蝇属 S2 和斜纹夜蛾属 Sf9 细胞的昆虫细胞,以及植物细胞和哺乳动物细胞。适当的针对以上描述的宿主细胞的培养基和条件是本领域已知的。

[0228] 哺乳动物宿主细胞包括而不限于,人 HeLa、HEK293、H9 和 Jurkat 细胞,小鼠 NIH3T3 和 C127 细胞、COS 1、COS 7 和 CV1,鹌鹑 QC1-3 细胞,小鼠 L 细胞,中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞以及 Bowes 黑色素瘤细胞。本发明的结合分子可以在含有整合到染色体中的、包含本发明核酸分子或载体的基因构建体的稳定细胞系中表达。

[0229] 在另一个优选的实施例中,所述细胞是原代细胞或原代细胞系。原代细胞是从生物体中直接获得的细胞。适合的原代细胞例如为小鼠胚胎成纤维细胞、小鼠原代肝细胞、心肌细胞和神经元细胞以及小鼠肌肉干细胞(卫星细胞)以及从其衍生的稳定的、永生化细胞系。

[0230] 本发明的一个另外的实施例涉及包含如权利要求 1 至 8 中任一项所述的结合分子、本发明核酸、本发明载体、和/或本发明宿主细胞或非人宿主的药物组合物。

[0231] 能以任何常规的方式制造本发明的药物组合物。在实施患有下文指明的疾病的受试者的治疗中,能以有效量的、使得该活性剂可生物利用的任何形式或模式(包括口服途径或肠胃外途径)给予至少一种本发明化合物。例如,可以皮下、肌肉、静脉内、腹膜内、通过吸入等给予本发明组合物。优选的是皮下注射,优选每周一次或每两周一次或每月一次。

[0232] 在制备配制品领域中的技术人员根据所选择的产品的具体特征、有待治疗的疾病或病症、该疾病或病症的阶段以及其他有关情况可容易地选择适当的给药形式和模式(参见,例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药物科学与实践),第 22 次编辑, Pharmaceutical Press (药物出版社), (2012) (1990))。

[0233] 适合的载体或赋形剂可以是可用作活性成分的媒介物或介质的液体材料。适合的载体或赋形剂在本领域中是熟知的,并且包括例如稳定剂、抗氧化剂、pH 调节物质、控释赋形剂等等。根据本发明的组合物可以被提供为冻干形式。对于即时给药,将其溶解于适合的水性载体中,例如无菌注射用水或无菌缓冲生理盐水。如果需要产生较大体积以便通过输注而非快速浓注给药,有利的是在最终配制时将人血清白蛋白或患者自身的肝素化血液

掺入溶剂中。可替代地,可皮下给予该配制品。过量的诸如人血清白蛋白的生理学惰性蛋白的存在可防止药学上有效的多肽因吸附于用于输注溶液的容器和管的壁上而损失。如果使用白蛋白,则适合浓度为按重量计盐水溶液的 0.5%至 4.5%。

[0234] 当然,用于治疗 and / 或预防疾病或医学病症的本发明化合物(即,融合蛋白、双特异性构建体、核酸、载体、和分离细胞)的给药量和方式将取决于本发明的具体化合物、个体患者群或患者、其他医学活性化合物的存在以及被治疗的病症的性质和严重性而变化。

[0235] 然而,当前优选的是应当给予约 0.0001mg 到约 20mg 每公斤体重、优选约 0.001mg 到约 5mg 每公斤体重的预防和 / 或治疗用量。

[0236] 优选地,用于预防和 / 或治疗用途的给药频率在约每周两次到约每 3 个月一次的范围内,优选约每周一次到约每 10 周一次,更优选每周一次到每月一次。

[0237] 在一个优选的实施例中,本发明的药物组合物用于在治疗或预防癌症的方法中使用。

[0238] 正如在上文中更详细地解释,CD3 是真正的针对不同癌症类型的治疗的重新定向 T 细胞杀伤的靶标。此外,所主张的双特异性结合分子的特异性和有效性是通过靶向癌细胞上的表面靶抗原尤其是 EGFR、HER2 或 CD33 来实现的。

[0239] 在本发明的药物组合物的一个更优选的实施例中,所述癌症选自下组,该组由以下各项组成:乳癌;血液恶性肿瘤,例如 NHL、B-ALL、CML;其他癌症,如前列腺癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌、卵巢癌、NHL、B-ALL、AML、头颈癌、结肠直肠癌、胰腺癌、甲状腺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、肾癌、肝癌、或恶性腹水。在这个清单内,乳癌是最优选的。

[0240] 在上文已经举例说明了许多在癌细胞上的表面靶抗原的非限制性实例。如从上文的说明书显然可知,在癌细胞上的这些表面靶抗原涉及在本发明以上实施例中列出的癌症类型。

[0241] 在本发明的药物组合物的一个更优选的实施例中,所述癌症以至少两倍高于非肿瘤细胞上表达的量的量表达表面靶抗原,该表面靶抗原被本发明的结合分子特异性结合、被本发明的核酸分子编码的结合分子特异性结合、被经由本发明载体表达的结合分子特异性结合、和 / 或被经由本发明的宿主细胞或非人宿主表达的结合分子特异性结合。

[0242] 优选地,与非肿瘤细胞比较,该抗原以高至少五倍的量,例如像高至少 10 倍的量、甚至更优选地高至少 100 倍的量,例如像高至少 1000 倍的量并且最优选地高至少 10,000 倍的量表达在癌细胞上。

[0243] 本发明还提供了产生该双特异性结合分子的方法,所述方法包括 (a) 培养以上定义的宿主细胞并且 (b) 分离所产生的双特异性结合分子。

[0244] 优选的分离细胞是包括 CHO 细胞在内的宿主细胞。可以根据所使用的特定宿主细胞来选择培养条件,这可以由技术人员不费力地完成。

[0245] 所希望的产物,即,本发明的双特异性结合分子的分离可通过纯化方法来实现,在此之前可以破碎所述分离细胞。适合的方法是本领域中熟知的并且任凭技术人员使用。

[0246] 关于实施例和在本说明书中尤其是在权利要求书中表征的优选特征,其意图在于,在从属权利要求中提及的每个实施例或优选特征与所述从属权利要求所从属的每条权利要求(独立或从属权利要求)的每个实施例相结合。例如,在叙述 3 个替代方案 A、B 和 C 的独立权利要求 1、叙述 3 个替代方案 D、E 和 F 的从属权利要求 2 以及从属于权利要求 1

和 2 并且叙述 3 个替代方案 G、H 和 I 的权利要求 3 的情况下,应当理解本说明书毫不含糊地披露了相应于组合 A、D、G ;A、D、H ;A、D、I ;A、E、G ;A、E、H ;A、E、I ;A、F、G ;A、F、H ;A、F、I ;B、D、G ;B、D、H ;B、D、I ;B、E、G ;B、E、H ;B、E、I ;B、F、G ;B、F、H ;B、F、I ;C、D、G ;C、D、H ;C、D、I ;C、E、G ;C、E、H ;C、E、I ;C、F、G ;C、F、H ;C、F、I 的实施例,除非特别提及。类似地,并且同样在独立和 / 或从属权利要求未叙述替代方案的那些情况下,应当理解,如果从属权利要求回引多条在先的权利要求,则由此涵盖的主题的任何组合均被视为被明确披露。例如,在独立权利要求 1、回引权利要求 1 的从属权利要求 2、以及回引权利要求 2 和 1 两者的从属权利要求 3 的情况下,可以得出权利要求 3 和 1 的主题的组合被清楚且毫不含糊地披露为权利要求 3、2 和 1 的主题的组合。在引用权利要求 1 至 3 中任一项的另一个从属权利要求 4 存在下,可以得出权利要求 4 和 1、权利要求 4、2 和 1、权利要求 4、3 和 1、以及权利要求 4、3、2 和 1 的主题的组合被清楚且毫不含糊地披露。同样,在从属权利要求未直接回引较高级别的权利要求(为独立和 / 或从属权利要求)的情况下,应当理解,由这些权利要求涵盖的主题的任何可能组合被视为被本申请明确地披露。例如,在独立权利要求 1、以及回引从属权利要求 2(进而回引独立权利要求 1)的从属权利要求 3 的情况下,权利要求 3 和 1 的主题的组合被清楚且毫不含糊地披露。以上考虑事项比照适用于所有附随的权利要求、实施例和在本说明书中表征的优选特征。

[0247] 最后,本发明涉及通过给予上文提及的一种或多种化合物或药物组合物来治疗患有本文提及的任何一种疾病的患者。

[0248] 这些图显示:

[0249] 图 1 显示了本发明的 **Fynomer**[®]- 抗体融合蛋白和对照蛋白的 SDS-PAGE 表征。A :在非还原条件下的跑胶 ;B :在还原条件下的跑胶。泳道 M :分子量标准 ;泳道 1 :抗 CD3 抗体 (SEQ ID NO 2 和 3) ;泳道 2 :COVA420 (SEQ ID NO 163 和 164) ;泳道 3 :COVA446 (SEQ ID NO:167)。

[0250] 图 2 显示了本发明的 **Fynomer**[®]- 抗体融合蛋白的 SDS-PAGE 表征。A :在非还原条件下的跑胶 ;B :在还原条件下的跑胶。泳道 M :分子量标准 ;泳道 1 :COVA422 (SEQ ID NO:165 和 166)

[0251] 图 3 显示了 **Fynomer**[®]- 抗体融合蛋白的尺寸排阻 (SEC) 谱。A :在 FPLC 系统上的 COVA420 (SEQ ID NO 163 和 164) 的 SEC 谱 ;B :在 HPLC 系统上的 COVA422 (SEQ ID NO 165 和 166) 的 SEC 谱

[0252] 图 4 显示了在 HER2 阳性细胞 (小图 A)、CD3 阳性细胞 (小图 B) 和在既不表达 HER2 也不表达 CD3 的细胞 (小图 C) 上的 **Fynomer**[®]- 抗体融合蛋白 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) ;COVA422 (SEQ ID NO 165 和 166)、以及双特异性 scFv-对照 COVA446 (SEQ ID NO:167) 的流式细胞术结合分析。将信号与仅用第二检测抗体获得的背景信号 (灰色阴影直方图) 比较。

[0253] 图 5 显示了 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 和处于单链 Fv 形式 (COVA446, SEQ ID NO:167) 的双特异性抗 CD3x 抗 HER2 对照对 HER2 阳性 SKBR-3 肿瘤细胞的重定向细胞杀伤活性。另外,显示了 COVA420 对 HER2 阴性 MDA-MB-468 细胞的任何杀伤活性的缺乏,证明

了针对 HER2 阳性细胞的特异性杀伤活性。PBMC 用作效应细胞。

[0254] 图 6 显示了 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 和 COVA422 (SEQ ID NO 165 和 166) 对 HER2 阳性 SKOV-3 肿瘤细胞的重定向细胞杀伤活性,使用 CD8⁺ 富集的 T 细胞作为效应细胞。

[0255] 图 7 描绘了在 CD8⁺ 富集的 T 细胞的存在和缺乏下孵育指示的抗体 Fynomer[®] 融合蛋白时颗粒酶 B 到细胞培养上清中的释放。

[0256] 图 8 显示了在小鼠中静脉注射之后 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 的血清浓度。

[0257] 图 9 显示了 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 在用活化并扩增的人 T 细胞重建的体内 SKOV-3 异种移植模型中的抗肿瘤活性。肿瘤体积呈现为 RTV (针对治疗开始天数的相对肿瘤体积)。每周两次给予 0.5mg/kg COVA420 和媒介物治疗 (第 6、9、13、15 天)、以及通过每日静脉内 (i. v.) 快速浓注来给予等摩尔剂量的 COVA446 (SEQ ID NO:167) (0.16mg/kg)。黑色箭头使剂量间隔直观化。

[0258] 图 10 显示了 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 和处于单链 Fv 形式 (COVA446, SEQ ID NO:167) 的双特异性抗 CD3x 抗 HER2 对照针对表达高水平的 HER2 的 SKOV-3 肿瘤细胞和表达低水平的 HER2 的 MCF-7 肿瘤细胞的重定向细胞杀伤活性。CD8⁺ 富集的 T 细胞用作效应细胞。显示了剩余靶细胞活力的百分比。

[0259] 图 11 显示了 Fynomer- 抗体融合蛋白的尺寸排阻 (SEC) 谱。A :COVA493 (SEQ ID NO 170 和 172) 的 SEC 谱 ;B :COVA494 (SEQ ID NO171 和 198) 的 SEC 谱 ;C :COVA497 (SEQ ID NO 199 和 172) 的 SEC 谱 ;D :COVA499 (SEQ ID NO 171 和 200) 的 SEC 谱 ;E :COVA489 (SEQ ID NO 171 和 172) 的 SEC 谱。

[0260] 图 12 显示了抗 CD3 抗体 (COVA489, SEQ ID NO:171 和 172)、Fynomer[®] - 抗体融合蛋白 COVA493 (SEQ ID NO 170 和 172)、COVA494 (SEQ ID NO:171 和 198)、COVA497 (SEQ ID NO:199 和 172)、COVA499 (SEQ ID NO:171 和 200) 以及处于单链 Fv 形式 (COVA445, SEQ ID NO:173) 的双特异性抗 CD3x 抗 EGFR 对照对 EGFR 阳性细胞 (MDA-MB-468, 上图) 和对 CD3 阳性细胞 (Jurkat E6-1. 下图) 的流式细胞术结合分析。将信号与仅用第二检测抗体获得的背景信号 (灰色阴影直方图) 比较。

[0261] 图 13 显示了 COVA493 (SEQ ID NO 170 和 172)、COVA494 (SEQ ID NO:171 和 198)、COVA497 (SEQ ID NO:199 和 172)、COVA499 (SEQ ID NO:171 和 200) 以及处于单链 Fv 形式 (COVA445, SEQ ID NO:173) 的双特异性抗 CD3x 抗 EGFR 对照针对表达高水平 EGFR 的 MDA-MB-468 肿瘤细胞和表达低水平 EGFR 的 HT-29 肿瘤细胞的重定向细胞杀伤活性。另外,显示了处于 5nM 的最高浓度的抗 CD3 抗体 (COVA489, SEQ ID NO:171 和 172) 的任何杀伤活性的缺乏。CD8⁺ 富集的 T 细胞用作效应细胞。显示了剩余靶细胞活力的百分比。

[0262] 图 14 显示了 COVA493 (SEQ ID NO 170 和 172)、COVA494 (SEQ ID NO:171 和 198)、COVA497 (SEQ ID NO:199 和 172)、COVA499 (SEQ ID NO:171 和 200) 以及处于单链 Fv 形式 (COVA445, SEQ ID NO:173) 的双特异性抗 CD3x 抗 EGFR 对照在效应 T 细胞的存在或缺乏下针对分别表达高和低水平 EGFR 的 MDA-MB-468 和 HT-29 肿瘤细胞的重定向细胞杀伤活性。(n. d). = 未测出。

[0263] 图 15 (A) 显示了 Fynomer- 抗体融合蛋白 COVA467 (SEQ ID NO:2 和 175) 的尺寸排

阻 (SEC) 谱, (B) 显示了 COVA467 (SEQ ID NO:2 和 175) 和处于单链 Fv 形式 (COVA463, SEQ ID NO:176) 的双特异性抗 CD3x 抗 CD33 对照对 CD33 阳性 U937 肿瘤细胞的重定向细胞杀伤活性。另外, 显示了处于未修饰的抗 CD3 抗体 (COVA419, SEQ ID NO:2 和 3) 的任何杀伤活性的缺乏。CD8⁺ 富集的 T 细胞用作效应细胞。显示了靶细胞裂解的百分比。

[0264] 这些实例说明本发明。

[0265] 实例

[0266] 实例 1- 针对 HER2 阳性肿瘤细胞的重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析

[0267] 实例 1.1. - 抗 CD3 抗体抗 HER2 **Fynomer**[®] 融合蛋白的表达和纯化

[0268] 已通过一个 15 个氨基酸的接头 (SEQ ID NO:162) 将 HER2 结合 **Fynomer**[®] C12 (Seq ID NO:4) 以遗传方式融合到抗 CD3 结合抗体 (SEQ ID NO:2 和 3), 产生本发明的双特异性抗体 **Fynomer**[®] 融合蛋白。在 COVA420 中, 使 **Fynomer**[®] C12 融合到抗 CD3 抗体 (SEQ ID NO:2 和 3) 的重链的 N- 末端。在 COVA422 中, 使 **Fynomer**[®] C12 融合到抗 CD3 抗体 (SEQ ID NO:2 和 3) 的重链的 C- 末端。

[0269] 将抗 CD3 抗体 (SEQ ID NO:2 和 3)、COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164)、COVA422 (SEQ ID NO:165 和 166) 和抗 CD3x 抗 HER2scFv 对照 (SEQ ID NO:167) (携带有一个六 his 标记) 瞬时转染到 FreeStyle CHO-S 细胞中并在无血清 / 无动物组分培养基中表达 6 天。通过蛋白 A 亲和色谱 (GE 医疗 (GE-Healthcare) 目录号 89928) 用 ÄKTA 纯化仪 (GE 医疗) 从上清液纯化抗 CD3 抗体和本发明的双特异性蛋白质。抗 CD3x 抗 HER2scFv 对照 (COVA446, SEQ ID NO:167) 的纯化是通过用一个 HiTrap Excel 柱 (GE 医疗) 固定金属离子亲和色谱来实现。浓度是通过在 280nm 下的吸光度测量来测定。产率列示于表 1 中。

[0270] 结果

[0271] 本发明的抗体 **Fynomer**[®] 融合蛋白和对照抗体可在单一步骤中表达并纯化。通过 SDS-PAGE 分析可证实 >95% 的纯度, 如在图 1 和 2 中所显示。表 1 归纳在瞬时转染到 CHO 细胞中并在 37°C 下进行蛋白质表达 6 天后的表达产率。

[0272] 表 1.

[0273]

蛋白质	SEQ ID NO:	产率 (mg/l)
抗 CD3 抗体	2、3	46

[0274]

(COVA419)		
COVA420	163、164	59
COVA422	165、166	21
抗 CD3 x HER2 scFv 对照 (COVA446)	167	17

[0275] 在纯化后,使用 ÄKTA FPLC 系统和 Superdex G200, 30/100GL 柱 (GE 医疗) 或安捷伦 HPLC 12/60 系统和 Bio SEC5, 5 μm ; 300 Å; 4.6x 300mm 柱执行尺寸排阻色谱。本发明的双特异性蛋白质洗脱为单一单体峰,证实本发明的抗体 **Fynomer**[®] 融合蛋白具有极为有利的生物物理性质 (图 3)。

[0276] 实例 1.2- 使用本发明的抗 HER2 **Fynomer**[®] 抗 CD3 抗体融合蛋白的 FACS 实验

[0277] 将蛋白质 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164)、COVA422 (SEQ ID NO:165 和 166) 和 COVA446 (SEQ ID NO:167) 以 100nM 的浓度在 100 μl 总体积中孵育,其在 PBS/1% BSA/0.2% 叠氮化钠中含有 (i) 1×10^5 Jurkat E6-1 细胞 (CD3 阳性细胞), (ii) 1×10^5 BT474HER2 阳性乳腺癌细胞, (iii) 1×10^5 HER2 或 CD3 阴性 MDA MB 468 细胞。作为阴性对照,用相同细胞仅与 PBS/1% BSA/0.2% 叠氮化钠 (代替蛋白质) 一起孵育 (PBS 对照)。

[0278] 在冰上孵育 60min 后,用 150 μL PBS-1% BSA 缓冲液将细胞洗涤两次并通过在暗中经 40min 添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 山羊抗人 -Alexa 488 偶联物 (Invitrogen (英杰公司)) 来检测结合的抗体。对于携带有六 his 标记的双特异性 scFv 对照 COVA446 (SEQ ID NO:167),通过以下方式来检测结合:添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠抗 HIS 标记抗体 (Fisher Scientific (飞世尔科技公司)) 并在 4°C 下孵育 40min,之后进行另一洗涤步骤,之后再次与 5 $\mu\text{g/mL}$ 山羊抗小鼠 Alexa 488 偶联物 (英杰公司) 在 4°C 下一起孵育 40min。

[0279] 最后,将细胞洗涤三次,再悬浮于 100 μl PBS-1% BSA 中,然后在 Guava easyCyte[™] 流式细胞仪 (密理博公司) 上分析已染色细胞。

[0280] 结果

[0281] 通过流式细胞术评估 **Fynomer**[®] - 抗体融合蛋白的结合性质。(特异性结合到表达 HER2 的 BT474 细胞 (小图 A) 和表达 CD3 的 Jurkat E6 细胞 (小图 B) 的 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164)、COVA422 (SEQ ID NO:165 和 166) 和双特异性 scFv 对照 (COVA446, SEQ ID NO:167),如图 4 中所示。对于不表达 CD3 或 HER2 的细胞系未观察到非特异性结合 (小图 C)。

[0282] 实例 1.3- 针对表达 HER2 的细胞的重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析

[0283] 在重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析中使用从 (Jäger 耶格尔) 等人 (2009) Cancer Research (癌症研究), 69(10):4270-6 调整的方案来测试多肽 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 和双特异性 scFv 对照 (SEQ ID NO:167)。

[0284] 简单来说,使用人 PBMC 作为效应细胞。在实验前一天,通过 Ficoll Plus (GE 医疗) 和使用标准程序的密度梯度离心从得自 Blutspende Zürich 的新鲜血沉棕

黄层制剂 (buffy coat preparation) 分离 PBMC。然后将分离的 PBMC 以 4×10^6 细胞 /ml 的细胞浓度在 10% FCS, RPMI 和 37°C、5% CO₂ 下孵育过夜。然后这些分离的 PBMC 可在重定向细胞毒性分析中用作效应细胞。

[0285] 同样在实验前夜,通过 Accutase 处理分离适当量的靶细胞,并将靶细胞以介于 3000–5000 细胞 / 孔范围内的细胞密度接种在 96 孔板中的 100uL 补充有 10% FCS 的完全细胞培养基中。将分析板在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育过夜。所用靶肿瘤细胞是 SKBR-3 (ATCC 目录号 HTB-30™) 和 MDA-MB-468 (ATCC 目录号 :HTB-132™)。

[0286] 在细胞杀伤实验前,将适当量的 PBMC 离心并再悬浮于 10% FCS, RPMI 中。根据所用靶细胞的数目,在 1.5 到 2.5×10^6 细胞 /mL 范围内调节细胞浓度并将细胞存储在室温下直到进一步使用为止。

[0287] 另外使用富集的 CD8+T- 细胞作为效应细胞且使用 SKOV-3 (ATCC 目录号 HTB-77™) 作为靶肿瘤细胞来监测重定向 T 细胞介导的细胞毒性。对于这些分析,进一步纯化分离的 PBMC 以获得富集的 CD8+T- 细胞。CD8+T 细胞是使用 Dynabead® Untouched™ 人 CD8T- 细胞试剂盒 (Life Technologies (生命科技公司) 目录号 :11348D) 根据制造商建议来分离。然后在纯化后,将细胞以介于 6×10^5 到 1×10^7 /ml 范围内的浓度再悬浮于 10% FCS, RPMI 中。

[0288] 在实验当天,将效应分子在 10% FCS, RPMI 中稀释到 150nM 的最大浓度并制备 1/10 稀释液的稀释系列。

[0289] 最后,从分析板移除消耗的培养基并每孔更换 50uL 新鲜培养基。然后添加适当量的效应分子和效应细胞。最终效应细胞对靶细胞的比率对于 PBMC 分析为 25/1 并且对于其中 CD8+T- 细胞用作效应细胞的分析为 10/1。效应分子的最终最大浓度为 50nM。最终分析体积为 150uL/ 孔。

[0290] 将这些分析板在 37°C、5% CO₂ 下孵育 24h 和 72h。然后,移除细胞培养上清液并存储于 -80°C 下用于后续分析 (颗粒酶释放分析,见下文实例 1.4)。在添加显影液之前,将每个孔用 PBS 洗涤两次。根据制造商建议使用 XTT 试剂 (西格玛 (Sigma) 目录号 :X4626) 来评估细胞活力。通过用 1% Triton-X100 (西格玛) 处理这些靶细胞来包括一个 100% 裂解对照,并且通过仅用效应细胞处理这些靶细胞 (“自发裂解 (spont lysis)”) 来获得自发裂解的值。在添加 XTT 底物后 2.5 到 4h 之间测量在 450nm 下的吸光度。所有测量都是一式三份进行。

[0291] 使用下式计算细胞活力百分比:

[0292] $\% \text{活力} = (\text{值} - 100\% \text{裂解}) / (\text{自发裂解} - 100\% \text{裂解}) * 100$

[0293] 然后绘制 % 细胞活力对效应分子浓度的曲线并使用 Prism 5 (GraphPad 软件) 通过拟合 S 形剂量反应来评估数据。

[0294] 结果

[0295] 可证实,可观察到 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 对表达 HER2 的 SKBR-3 细胞的剂量依赖性细胞毒性 (图 5)。在这个代表性分析中,COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 的 EC₅₀ 值为 87pM。重要的是,因为没有观察到对 HER2 阴性 MDA-MB-468 的细胞毒性,所以细胞毒性效应具有抗原依赖性,如图 5 中所示。

[0296] 在相同分析条件下,获得双特异性抗 HER2x 抗 CD3scFv-scFv 对照分子 (SEQ ID NO:167) 的 60pM 的 EC₅₀ 值。令人惊讶地发现,基于二价全长 IgG 的 Fynomer- 抗体融合蛋

白在重定向杀伤分析中显示与当前使用的 scFv-scFv 蛋白质在相同范围内的效力,但其不具有生物物理性质欠佳和体内半衰期短的缺点。

[0297] 表 2 归纳获得的所测试蛋白质的 EC_{50} 值:

[0298] 表 2:

[0299]

蛋白质	SEQ ID NO.	EC_{50} (pM) PBMC
COVA420	163、164	87
scFv-scFv 对照 (COVA446)	167	60

[0300] 为了证实本发明的 Fynomer- 抗体融合蛋白通过衔接 T- 细胞 (并且并非通过 ADCC 介导的活性) 来发挥杀伤活性,使用无法通过 ADCC 介导细胞杀伤的富含 CD8+ 的 T- 细胞执行重定向细胞杀伤实验。

[0301] 图 6 显示,可使用富含 CD8+ 的 T- 细胞作为效应细胞来确认细胞杀伤。此处,COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 显示 EC_{50} 值为 8pM 并且 COVA422 (SEQ ID NO:165 和 166) 的 EC_{50} 值为 175pM。这些结果确认 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 和 COVA22 (SEQ ID NO:165 和 166) 的有效 (亚 nM) 杀伤活性。

[0302] 实例 1.4- 在靶细胞存在和不存在下的颗粒酶 B 释放的分析

[0303] 在抗原阳性靶细胞和富含 CD8+ 的 T- 细胞存在和不存在下评估在孵育 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 和作为对照的抗 CD3 抗体 (SEQ ID NO:2 和 3) 后颗粒酶 B 在细胞培养基中的释放。颗粒酶 B 的释放是由 BiTE[®] 类试剂诱导的 T- 细胞介导的细胞毒性活性的主要指示物,如哈斯 A. (Haas A.) 等人,免疫生物学 (Immunobiology), 2009, 214(6):441-53 中所述。

[0304] 如上文所述孵育样品,用于评估 Fynomer[®]- 抗体融合蛋白的细胞毒性活性。在孵育期结束时,收集细胞培养上清液并根据制造商建议通过使用颗粒酶 B ELISA 试剂盒 (R&D Systems (R&D 系统)) 评估颗粒酶 B 的浓度。

[0305] 结果:

[0306] 图 7 绘示在将 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 在 CD8⁺ T- 细胞存在下以及在抗原阳性靶细胞存在和不存在下以指示浓度孵育 3 天后,颗粒酶 B 的表达水平。如果 T- 细胞仅与 50nM COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 在靶细胞不存在下孵育,那么未能检测到颗粒酶 B 的非特异性释放。在靶细胞 COVA420 (SEQ ID No:163 和 164) 和 T- 细胞存在时观察到颗粒酶 B 表达显著增加。在以其中无法检测到细胞毒性效应的浓度使用 COVA420 (SEQ ID No:163 和 164) 时未能检测到实质性颗粒酶 B 表达,这表明了细胞毒性活性与颗粒酶 B 释放 (0.5pM) 之间的关联。如所预期,在肿瘤靶细胞和效应细胞存在下,对照抗 CD3 抗体 (SEQ ID NO:2 和 3) (50nM) 未触发颗粒酶 B 释放。

[0307] 实例 1.5- 药物代谢动力学分析

[0308] 在 C57BL/6 小鼠 (Charles River (查尔斯河)) 中研究 COVA420 (SEQ ID NO:163

和 164) 的药物代谢动力学概况。向 5 只 C57BL/6 小鼠静脉内注射 200 μ g COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164)。在 10min、6、24、48、96、120、144 和 168 小时后,将血液收集到 EDTA 涂布的微量采血器 (Sarstedt (萨尔斯塔特)) 中,以 9300g 离心 10min 并通过 ELISA 测定 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 的血清水平。用 50nM HER2ECD (Bender MedSystems (宾德医疗系统)) 涂布 Black maxisorp 微量滴定板 (Nunc (农克))。在用 PBS 中的 2% BSA (西格玛) 封闭后,施加适当稀释度的 40 μ l PBS 和 10 μ l 血清。在孵育 1hr 后,用 PBS 洗涤各孔,并用抗 hIgG-HRP (Jackson ImmunoResearch (杰克逊免疫研究)) 检测结合的 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164)。用 QuantaRed 荧光底物 (Pierce (皮尔斯)) 使分析物显影并在 5min 后在 544nm (激发) 和 590nm (发射) 下测量荧光强度。使用 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) (稀释到 333-0.5ng/ml) 的标准曲线测定 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 的血清水平。根据在不同时间点血清中测定的浓度和消除期的所得斜率 k (以半对数标度绘制),使用公式 $t_{1/2} = \ln 2 / -k$ 计算半衰期。

[0309] 结果:

[0310] 图 8 显示在小鼠中静脉内快速浓注后 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 的血清浓度。如从消除期 (β 期,时间点 24h-168h) 所确定,COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 的半衰期值为 140 小时。这个发现证实,COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 具有 IgG 样体内 PK 性质,因为该半衰期与其他人抗体在小鼠中获得的半衰期相当 (例如,阿达木单抗 (adalimumab):102-193 小时, Humira[®] 药物批准套装 (Drug Approval Package) (药物批准套装, Humira[®], FDA 申请号:125057s0110, Pharmacology Review (药理学评论), 01/18/2008)。

[0311] 实例 1.6-COVA420 在用人 T-细胞重构的具有过表达 HER2 的 SKOV-3 肿瘤的小鼠中的体内效能。

[0312] 在经辐照的 NOD. CB17Prkdc 小鼠中研究 COVA420 的抗肿瘤活性,这些小鼠具有表达 HER2 的人 SKOV-3 肿瘤异种移植植物。

[0313] 方法:

[0314] 将 3×10^6 SKOV-3 (ATCC 目录号 HTB-77TM) 细胞皮下 (s. c.) 注射到 2Gy 辐照的 NOD. CB17Prkdc 小鼠 (查尔斯河) 中。在肿瘤达到约 50mm³ 的平均大小时,用单一静脉内 (i. v.) 快速浓注的抗唾液酸基 GM1 兔抗体 (WAKO, 德国) 处理动物,一天后注射人 T-细胞。将从单一健康供体的血沉棕黄层分离的体外活化并扩增 (22 天) 的人 T-细胞 (Miltenyi Biotech (美天旎生物科技), 德国) 注射 (1.6×10^7 / 小鼠) 到腹腔中。在注射 T-细胞后 3 天,将小鼠随机化并在总计 15 天中通过静脉内快速浓注到侧尾静脉中接受 0.5mg/kg COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164; $n = 8$)、每周两次 (第 6、9、13、15 天) 的媒介物 (PBS; $n = 7$) 治疗或每日等摩尔剂量 ($= 0.16$ mg/kg) 的 COVA446 (SEQ ID NO:167; $n = 8$)。通过肿瘤生长抑制来评价治疗效能。通过外卡尺测量来测量肿瘤大小,并使用标准半椭圆公式来计算体积:体积 = (宽度)² x 长度 x 0.5。到 (开始治疗) 第 6 天的相对肿瘤体积 (RTV) 是以平均值 $\pm$ SEM 的形式呈现。

[0315] 使用 GraphPad Prism 6 软件 6a 版执行统计学分析。通过使用不成对非参数 t -测试 (曼-惠特尼 (Mann-Whitney)) 来计算抗肿瘤效能的统计学显著性。以相对于媒介物对

照的肿瘤体积抑制形式来进一步评估在第 16 天 COVA420 相对媒介物治疗的抗肿瘤效能,表示为治疗 - 与 - 对照比率 (T/C) : $T/C(\%) = RTV(\text{第 16 天}) / RTV(\text{第 6 天})$ (Wu (吴) (2010), Journal of Biopharmaceutical Statistics (生物药剂统计学杂志), 20:5, 954-964)。

[0316] 结果:

[0317] COVA420 通过将 T- 细胞主动募集到肿瘤显著降低 SKOV-3 肿瘤生长 (图 9)。在 4 个剂量的 0.5mg/kg COVA420 后,在第 16 天,与媒介物对照相比,COVA420 治疗导致显著生长抑制 ($P = 0.0059$)。COVA420 治疗还比每日注射 0.16mg/kg COVA446 对照显著更有效 ($P = 0.04$)。与媒介物治疗相比,在同一天 COVA420 的 T/C 比率等于 55% 生长抑制并且 COVA446 的 T/C 比率等于 79%。这些结果证实,COVA420 具有药理学活性并且通过将人 T- 细胞有效募集到肿瘤来发挥其抗肿瘤活性,导致与媒介物治疗对照相比抑制肿瘤生长。

[0318] 实例 1.7- 选择性针对表达高水平 HER2 的肿瘤细胞的重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析

[0319] 在重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析中使用从耶格尔等人 (2009) 癌症研究, 69(10):4270-6 调整的方案来测试多肽 COVA420 (SEQ ID NO:163 和 164) 和双特异性 scFv 对照 COVA446 (SEQ ID NO:167)。

[0320] 简单来说,如实例 1.3 中所述,在前一天从新鲜血沉棕黄层分离人 PBMC 并在实验当天分离 CD8+T- 细胞。

[0321] 在实验前夜,通过 Accutase 处理分离适当数目的靶细胞,并将靶细胞以 5000 细胞 / 孔的细胞密度接种在 96 孔板中的 150 μ l 补充有 10% FCS 的适当生长培养基中。将分析板在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育过夜。所用靶肿瘤细胞是表达高水平 HER2 (约 1.7×10^6 个 HER2 分子 / 细胞) 的 SKOV-3 (ATCC® HTB-77™) 和表达低水平 HER2 (约 1×10^4 个 HER2 分子 / 细胞) 的 MCF-7 (ATCC® HTB-22™)。使用 Qifikit (Dako K0078) 根据制造商建议对 HER2 表面表达进行定量。简单来说,用饱和浓度的抗 HER2 抗体 (R&D MAB1129) 或同种型匹配的对照 IgG 对细胞进行染色,之后用抗小鼠 -FITC 二次抗体进行染色,并进行流式细胞术分析。同时,用该二次抗体对经不同明确确定量的小鼠单克隆抗体分子涂布的珠粒进行染色,分析并绘制标准曲线作为分子 / 细胞的参照。

[0322] 在实验当天,将效应分子在 10% FCS, RPMI 中稀释到 150nM 的最大浓度并制备 1/10 稀释液的稀释系列。

[0323] 将适当量的 T- 细胞离心并再悬浮于 10% FCS, RPMI 中。将细胞浓度调节到 1×10^6 细胞 / mL。

[0324] 最后,从分析板移除消耗的培养基并每孔更换 50 μ l 新鲜 10% FCS, RPMI。然后添加 50 μ l 效应分子和 50 μ l 效应 T- 细胞。最终效应细胞与靶细胞比率为 10:1。效应分子的最终最大浓度为 50nM。最终分析体积为 150 μ l / 孔。

[0325] 将分析板在 37°C、5% CO₂ 下孵育 60h。然后,移除细胞培养上清液并用 PBS 将每个孔洗涤一次。使用 XTT- 试剂 (西格玛 X4626) 根据制造商建议评估细胞活力。通过用 1% Triton-X100 (西格玛) 处理这些靶细胞来包括一个 100% 裂解对照,并且通过将这些靶细胞仅与效应细胞一起孵育 (“自发裂解”) 来获得自发裂解的值。在添加 XTT 底物后 2h 在 450nm 下测量吸光度。所有测量都是一式三份进行。

[0326] 使用下式计算细胞活力百分比:

[0327] $\% \text{活力} = (\text{值} - 100\% \text{裂解}) / (\text{自发裂解} - 100\% \text{裂解}) * 100$

[0328] 然后绘制%细胞活力对效应分子浓度的曲线并使用 Prism 5(GraphPad 软件)通过拟合 S 形剂量反应来评估数据。

[0329] 结果

[0330] 可观察到 COVA420 针对表达高水平 HER2 的 SKOV-3 靶细胞的剂量依赖性重定向 T- 细胞毒性(图 10)。表 3 归纳获得的所测试蛋白质的 EC₅₀ 值。

[0331] 此外,可观察到双特异性抗 CD3x 抗 HER2scFv 对照分子 COVA446 针对表达低水平 HER2 的 MCF-7 靶细胞的剂量依赖性重定向 T- 细胞毒性。在这个代表性分析中,COVA446 的 EC₅₀ 值为 53pM。令人惊讶地,COVA420 未展现针对表达低水平 HER2 的 MCF-7 靶细胞的显著重定向 T- 细胞毒性(表 3)。

[0332] 表 3:

[0333]

蛋白质	SEQ ID NO.	SKOV-3 EC ₅₀ (pM)	MCF-7 EC ₅₀ (pM)	倍数差异
COVA420	163、164	11.6	未检测到	> 4310
抗 CD3 x EGFR scFv 对 照 (COVA446)	167	2.3	53	23

[0334] 实例 2- 针对 EGFR 阳性肿瘤细胞的重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析

[0335] 实例 2.1. - 抗 CD3 抗体抗 EGFR Fynomer 融合蛋白的表达和纯化

[0336] 将编码 SEQ ID NO:169 和 187 到 197 中所示多肽的 DNA 克隆到细菌表达载体 pQE12 中,使得所得构建体携带有 C- 末端 myc- 六组氨酸标记,如格拉博夫斯基等人(格拉博夫斯基等人(2007)JBC,282,第 3196-3204 页)所述。这些多肽是在 200 μ l 规模培养物中在大肠杆菌(E. coli)细菌的胞质溶胶中表达。将含有这些多肽的澄清裂解物以 5:1 稀释于含有 10 μ g/ml 抗 myc 小鼠抗体 9E10(Roche(罗氏))的 PBS/1% FCS/0.2%叠氮化钠缓冲液中,并添加到 1x 10⁵MDA-MB-468 细胞(ATCC® HTB-132™)中。在冰上孵育 60min 后,洗涤细胞,并通过抗小鼠 IgG-Alexa488 偶联物(英杰公司)检测结合的序列。然后在 FACS 分析仪中分析已染色细胞。通过 DNA 测序来验证特定结合剂的 DNA 序列。Fyn SH3 源 EGFR 结合剂的氨基酸序列呈现于 SEQ ID NO:169 和 187 到 197 中,如序列表中所附加。

[0337] 已将 EGFR 结合 Fynomer ER7L2D6(SEQ ID NO:169)通过 15 个氨基酸的接头(SEQ ID NO:162)以遗传方式融合到 CD3 结合抗体(COVA489, SEQ ID NO:171 和 172)的重链(SEQ ID NO:171)的 N- 末端,产生双特异性抗体 Fynomer 融合蛋白 COVA493(SEQ ID NO:170 和 172)。另外,将 ER7L2D6(SEQ ID NO:1)融合到抗体轻链的 N- 末端,产生双特异性抗体 Fynomer 融合蛋白 COVA494(SEQ ID NO:171 和 198)。

[0338] 已将 EGFR 结合 Fynomer ER9L3D7(SEQ ID NO:187)通过 15 个氨基酸的接头(SEQ ID NO:162)以遗传方式融合到抗 CD3 结合抗体(COVA489, SEQ ID NO:171 和 172)的抗体重链(SEQ ID NO:171)的 N- 末端,产生双特异性抗体 Fynomer 融合蛋白 COVA497(SEQ ID

NO:199 和 172)。另外,将 ER9L3D7 (SEQ ID NO:2) 融合到抗体轻链 (SEQ ID NO:172) 的 C-末端,产生双特异性抗体 Fynomer 融合蛋白 COVA499 (SEQ ID NO:171 和 200)。

[0339] 将抗 CD3 抗体 COVA489、双特异性蛋白质 COVA493、COVA494、COVA497、COVA499 和抗 CD3x 抗 EGFR scFv 对照 COVA445 (SEQ ID NO:173) (携带有六 his 标记) 瞬时转染到 FreeStyle CHO-S 细胞中并在无血清/无动物组分培养基中表达 6 天。通过蛋白 A 亲和色谱 (GE 医疗 (GE-Healthcare) 目录号 89928) 用 ÄKTA 纯化仪 (GE 医疗) 从上清液纯化抗 CD3 抗体和本发明的双特异性蛋白质。抗 CD3x 抗 EGFR scFv 对照 (COVA445, SEQ ID NO:173) 的纯化是通过用一个 HiTrap Excel 柱 (GE 医疗) 固定金属离子亲和色谱来实现。浓度是通过在 280nm 下的吸光度测量来测定。产率列示于表 4 中。

[0340] 在纯化后,使用基于二氧化硅的 SEC-5 柱 (Agilent (安捷伦公司); 5 μ m; 300 Å) 在安捷伦 HPLC 12/60 系统上执行分析型尺寸排阻色谱。

[0341] 结果

[0342] 本发明的抗体 Fynomer 融合蛋白和对照抗体可在单一步骤中表达并纯化。表 1 归纳在瞬时转染到 CHO 细胞中和在 37°C 下蛋白质表达 6 天后的纯化产率。

[0343] 表 4. 表达产率。

[0344]

蛋白质	SEQ ID NO:	产率 (mg/l)
抗 CD3 抗体 (COVA489)	171、172	66
COVA493	170、172	40
COVA494	171、198	39
COVA497	199、172	35
COVA499	171、200	74
抗 CD3 x EGFR	173	34

[0345]

scFv 对照 (COVA445)		
----------------------	--	--

[0346] 本发明的双特异性蛋白质从该尺寸排阻柱洗脱为单一单体峰,证实本发明的抗体 Fynomer 融合蛋白具有极为有利的生物物理性质 (图 11)。本发明的双特异性构建体至少与未经修饰的抗 CD3 抗体同样良好地表达并且在纯化后不聚集,如通过 SEC 分析所示。

[0347] 实例 2.2- 使用本发明的抗 EGFR **Fynomer**[®] 抗 CD3 抗体融合蛋白的 FACS 分析实验

[0348] 将 COVA489、COVA493、COVA494、COVA497、COVA499 和 COVA445 在 PBS/1 % BSA/0.2 % 叠氮化钠中在以下条件下孵育:(i) 在 30nM 浓度下,在 100 μ l 总体积中,其含有 1×10^5 Jurkat E6-1 细胞 (CD3 阳性细胞; ATCC[®] TIB-152[™]), 或 (ii) 在 100nM 浓度

下,在 100 μ l 总体积中,其含有 1×10^5 过表达 EGFR 的 MDA-MB-468 乳癌细胞 (ATCC® HTB-132™)。作为阴性对照,用相同细胞仅与 PBS/1% BSA/0.2% 叠氮化钠 (代替蛋白质) 一起孵育 (PBS 对照)。

[0349] 在冰上孵育 45min 后,用 150 μ L PBS-1% BSA 缓冲液将细胞洗涤两次并通过在 4℃ 下经 40min 添加 4 μ g/mL 山羊抗人 -Alexa 488 偶联物 (英杰公司) 来检测结合的抗体。对于携带有六 his 标记的双特异性 scFv 对照 COVA445,通过以下方式来检测结合:以 1:4 (抗 HIS 标记抗体:COVA445) 的摩尔比同时孵育 COVA445 与小鼠抗 HIS 标记抗体 (飞世尔科技公司),之后进行额外洗涤步骤,之后与 4 μ g/mL 山羊抗小鼠 -Alexa 488 偶联物 (英杰公司) 在 4℃ 下一起孵育 40min。

[0350] 最后,将细胞洗涤三次,再悬浮于 100 μ l PBS-1% BSA 中,然后在 Guava easyCyte™ 流式细胞仪 (密理博公司) 上分析已染色细胞。

[0351] 结果

[0352] 所有构建体都结合到表达人 CD3 的 Jurkat E6-1 细胞,并且所有 Fynomer- 抗体融合物以及抗 CD3x 抗 EGFR scFv 对照 COVA445 都结合到 MDA-MB-468 (图 12)。如所预期,未观察到抗 CD3 抗体 COVA489 在 MDA-MB-468 上的非特异性结合。

[0353] 实例 2.3- 选择性针对表达高水平 EGFR 的肿瘤细胞的重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析

[0354] 在重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析中使用从耶格尔等人 (2009) 癌症研究, 69(10):4270-6 调整的方案来测试多肽 COVA493、COVA494、COVA497、COVA499、双特异性 scFv 对照 COVA445 和抗 CD3 抗体 (COVA489, SEQ ID NO:171 和 172)。

[0355] 简单来说,在实验前夜,通过 Accutase 处理分离适当数目的靶细胞,并将靶细胞以 3000-5000 细胞/孔的细胞密度接种在 96 孔板中的 150 μ l 补充有 10% FCS 的适当生长培养基中。将分析板在 37℃ 和 5% CO₂ 下孵育过夜。所用靶肿瘤细胞为表达高水平 EGFR (约 1.5×10^6 个 EGFR 分子/细胞) 的 MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) 和表达低水平 EGFR (约 5×10^4 个 EGFR 分子/细胞) 的 HT-29 (ATCC® HTB-38™)。如实例 1.7 中所述但使用饱和浓度的抗 EGFR 抗体 (密理博 MABF120) 对 EGFR 表面表达进行定量。

[0356] 在实验当天,将效应分子在 10% FCS, RPMI 中稀释到 15nM 的最大浓度并制备 1/20 稀释液的稀释系列。

[0357] 使用富含 CD8+ 的人 T- 细胞作为效应细胞。如制造商所推荐,使用 MACSxpress 人 CD8+ 分离试剂盒 (Miltenyi 130-098-194) 以及 MACSxpress 分离器 (Miltenyi 130-098-309) 和红血细胞裂解溶液 (Miltenyi 130-094-183) 从得自伯恩献血 (Blutspende Bern) 的新鲜血沉棕黄层制剂分离富含 CD8+ 的 T- 细胞。

[0358] 将适当量的 T- 细胞离心并再悬浮于 10% FCS, RPMI 中。将细胞浓度调节到 1×10^6 细胞/mL。

[0359] 最后,从分析板移除消耗的培养基并每孔更换 50 μ l 新鲜 10% FCS, RPMI。然后添加 50 μ l 效应分子和 50 μ l 效应 T- 细胞。最终效应细胞与靶细胞比率为 10:1。效应分子的最最终最大浓度为 5nM。最终分析体积为 150 μ l/孔。

[0360] 为了证实本发明的 Fynomer- 抗体融合蛋白通过衔接 T- 细胞来发挥杀伤活性,将

靶细胞与 COVA493、COVA494、COVA497、COVA499 和 COVA445 在 5nM 浓度下还在 T- 细胞不存在下一起孵育。

[0361] 将分析板在 37℃、5% CO₂ 下孵育 64h。然后, 移除细胞培养上清液并用 PBS 将每个孔洗涤一次。使用 XTT- 试剂 (西格玛 X4626) 根据制造商建议评估细胞活力。通过用 1% Triton-X100 (西格玛) 处理这些靶细胞来包括一个 100% 裂解对照, 并且通过这些靶细胞仅与效应细胞一起孵育 (“自发裂解”) 来获得自发裂解的值。在添加 XTT 底物后 5h 在 450nm 下测量吸光度。所有测量都是一式三份进行。

[0362] 使用下式计算细胞活力百分比:

[0363] $\% \text{活力} = (\text{值} - 100\% \text{裂解}) / (\text{自发裂解} - 100\% \text{裂解}) * 100$

[0364] 然后绘制 % 细胞活力对效应分子浓度的曲线并使用 Prism 5 (GraphPad 软件) 通过拟合 S 形剂量反应来评估数据。

[0365] 结果

[0366] 可观察到 COVA493、COVA494、COVA497 和 COVA499 针对表达高水平 EGFR 的 MDA-MB-468 靶细胞的剂量依赖性重定向 T- 细胞毒性 (图 13)。表 5 归纳获得的所测试蛋白质的 EC₅₀ 值。

[0367] 此外, 可观察到 COVA493 和双特异性抗 CD3x 抗 EGFR scFv 对照分子针对表达低水平 EGFR 的 HT-29 靶细胞的剂量依赖性重定向 T- 细胞毒性。在这个代表性分析中, COVA493 的 EC₅₀ 值为 117.3pM, 并且 COVA445 的 EC₅₀ 值为 2.5pM。令人惊讶地, COVA494、COVA497 和 COVA499 即使在 5nM 的最高浓度下也没有展现针对表达低水平 EGFR 的 HT-29 靶细胞的显著重定向 T- 细胞毒性 (表 5)。

[0368] 这些细胞毒性效应依赖于抗 EGFR Fynomer 的存在, 因为使用抗 CD3 抗体 (COVA489, SEQ ID NO: 13 和 14, 在 5nM 的最高浓度下测量) 时未观察到细胞毒性。

[0369] 表 5. T 细胞介导的细胞毒性的 EC₅₀ 值。(n. a. : 不适用)

[0370]

蛋白质	SEQ ID NO.	MDA-MB-468 EC ₅₀ (pM)	HT-29 EC ₅₀ (pM)	倍数差异
COVA493	170、172	0.2	117.3	580
COVA494	171、198	1.4	不适用	> 3500
COVA497	199、172	2.8	不适用	> 1750
COVA499	171、200	6	不适用	> 830
抗 CD3 x EGFR scFv 对 照 (COVA445)	173	0.2	2.5	12.5

[0371] 这些细胞毒性效应依赖于效应 T- 细胞的存在 (图 14), 因为在将靶细胞与 COVA493、COVA494、COVA497、COVA499 和双特异性抗 CD3x 抗 EGFR scFv 对照分子 (COVA445)

一起孵育时未观察到细胞毒性。

[0372] 实例 3- 针对 CD33 阳性肿瘤细胞的重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析

[0373] 实例 3.1- 抗 CD3 抗体抗 CD33Fynomer 融合蛋白的表达和纯化

[0374] 将编码 SEQ ID NO:174 和 177 到 186 中所示氨基酸的 DNA 克隆到细菌表达载体 pQE12 中,使得所得构建体携带有 C-末端 myc- 六组氨酸标记,如格拉博夫斯基等人(格拉博夫斯基等人(2007)JBC,282,第 3196-3204 页)所述。这些多肽是在 200 μ l 规模培养物中在大肠杆菌细菌的胞质溶胶中表达。使用单克隆澄清裂解物进行 ELISA:将人重组 CD33(作为与人 Fc γ 1 的融合物购自 R&D) 固定在 MaxiSorp 孔(农克)上,并且在用 PBS 中的 4%乳液(Rapilait(拉佩莱特),Migros(米诺斯),瑞士)封闭后,施加 12.5 μ l 含有 50 μ g/ml 小鼠抗 myc 小鼠抗体 9E10(罗氏)和 50 μ l 澄清裂解物的 PBS 中的 10%乳液。在孵育 1hr 后,洗除未结合的 Fynomer,并用抗小鼠 IgG-HRP 抗体偶联物(西格玛)检测结合的 Fynomer。过氧化物酶活性的检测是通过添加 BM 蓝色 POD 底物(罗氏)来进行,并且通过添加 1M H_2SO_4 来停止反应。通过相同 ELISA 测试 ELISA 阳性克隆中与人 IgG(西格玛)和与未经涂布的 MaxiSorp 孔的交叉反应性的不存在。此外,使用固定金属亲和色谱柱从细菌裂解物纯化编码 SEQ ID NO:174 和 177 到 186 中所示多肽的 DNA,如格拉博夫斯基等人(格拉博夫斯基等人(2007)JBC,282,第 3196-3204 页)中所述。将 93nM 纯化 Fynomer 与 1×10^5 U937 细胞(ATCC CRL-1593.2TM)一起在 100 μ l 含有 23nM 小鼠抗 myc 抗体 9E10 的 PBS/1% FCS/0.2%叠氮化钠中孵育。在冰上孵育 60min 后,洗涤细胞,并通过抗小鼠 IgG-Alexa488 偶联物(英杰公司)检测结合的序列。然后在 FACS 分析仪中分析已染色细胞。通过 DNA 测序来验证特定结合剂的 DNA 序列。Fyn SH3 源 CD33 结合剂的氨基酸序列呈现于 SEQ ID NO:174 和 177 到 186 中,如序列表中所附加。

[0375] 已将 CD33 结合 Fynomer EE1L1B3(Seq ID NO:174)通过 15 个氨基酸的接头(Seq ID NO:162)以遗传方式融合到抗 CD3 结合抗体(Seq ID NO:2 和 3)的轻链(Seq ID NO:3)的 C-末端,产生本发明的双特异性抗体 Fynomer 抗体融合蛋白 COVA467(Seq ID NO:2 和 175)。COVA467 和专利申请案 WO 2010/037835 中所述的抗 CD3x 抗 CD33scFv 对照 COVA463(Seq ID NO:176)是如实例 1 中所述来表达并纯化。COVA467 表达地与未经修饰的抗 CD3 抗体同样良好(产率:COVA467 为 56mg/l,与其相比,亲代抗 CD3 抗体 COVA419 为 46mg/l)并且在纯化后没有聚集,如图 15A 中通过 SEC 分析所示。

[0376] 实例 3.2- 针对表达 CD33 的肿瘤细胞的重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析

[0377] 在重定向 T 细胞介导的细胞毒性分析中使用从耶格尔等人(2009)癌症研究,69(10):4270-6 调整的方案来测试多肽 COVA467(Seq ID NO:2 和 175)和双特异性 scFv 对照 COVA463(Seq ID NO:176)。

[0378] 简单来说,将 U937(ATCC 目录号:CRL-1593.2TM)靶细胞以 10000 细胞/孔的细胞密度接种于圆底 96 孔板中的 50 μ l 补充有 10% FCS 的 RPMI 培养基中。将效应分子在 10% FCS, RPMI 中稀释到 15nM 的最大浓度并制备 1/10 稀释液的稀释系列。使用富含 CD8⁺ 的人 T- 细胞作为效应细胞。如实例 3 中所述分离富含 CD8⁺ 的 T- 细胞并调节到最高 2×10^6 细胞/mL 的浓度。然后添加 50 μ l 具有指示浓度的效应分子和 50 μ l 效应 T- 细胞。最终效应细胞与靶细胞比率为 10:1。最终分析体积为 150 μ l/ 孔。

[0379] 将分析板在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 下孵育 24h。使用 CytoTox-FluorTM 细胞毒性分析

(Promega(普洛麦格)G9260)根据制造商建议评估细胞裂解。在0h 孵育时通过用2%皂苷(西格玛)处理靶细胞来包括100%裂解对照。通过将靶细胞仅与效应T-细胞一起孵育(“自发裂解”)来测量自发裂解。

[0380] 在孵育24h后,将分析板以400x g 旋转10min 并将100 μl 上清液转移到黑色96孔板中。使CytoTox-Fluor™试剂和分析缓冲液在室温下解冻并将60 μl 试剂稀释于30ml 分析缓冲液中。随后,将50 μl 这种混合物添加到每个孔的分析板上清液中。将板在37℃下孵育2h 并在485nm 激发/520nm 发射下记录荧光。所有测量都是一式三份进行。

[0381] 使用下式计算细胞活力百分比:

[0382] $\% \text{细胞裂解} = (\text{值} - \text{自发裂解}) / (100\% \text{裂解} - \text{自发裂解}) * 100$

[0383] 然后绘制%细胞裂解对效应分子浓度的曲线并使用Prism 5(GraphPad 软件)通过拟合S 形剂量反应来评估数据。

[0384] 结果

[0385] 可证实,可观察到COVA467(SEQ ID NO:2 和175)对表达CD33的U937细胞的剂量依赖性细胞毒性(图15B)。在这个代表性分析中,COVA467(SEQ ID NO:2 和175)的EC₅₀值为2.1pM。重要的是,这些细胞毒性效应依赖于抗CD33Fynomer的存在,因为使用抗CD3抗体(COVA419, SEQ ID NO:2 和3)时未观察到细胞毒性。

[0386] 在相同分析条件下,获得双特异性抗CD33x 抗CD3scFv-scFv 对照分子(SEQ ID NO:176)的1.6pM 的EC₅₀值。令人惊讶地发现,基于二价全长IgG 的Fynomer-抗体融合蛋白在重定向杀伤分析中显示与当前使用的scFv-scFv 蛋白质在相同范围内的效力,但其不具有生物物理性质欠佳和体内半衰期短的缺点。

[0387] 表6 归纳获得的所测试蛋白质的EC₅₀值:

[0388] 表6:

[0389]

Fynomer	SEQ ID NO.	EC ₅₀ (pM)
COVA467	2、175	2.1
scFv-scFv 对照 (COVA463)	176	1.6

[0001]

序列表

<110> 科瓦根股份公司 (Covagen AG)

<120> 具有抗肿瘤活性的新颖的双特异性结合分子

<130> W1579 PCT

<150> EP 13 16 4555.8

<151> 2013-04-19

<160> 209

<170> BiSSAP 1, 2

<210> 1

<211> 63

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3抗体

<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20          25          30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
50          55          60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe
65          70          75          80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85          90          95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100          105          110
Thr Pro 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210          215          220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 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

```

[0002]

```

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 Lys 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> 3
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD3抗体

```

<400> 3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20          25          30
Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
          35          40          45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65          70          75          80
Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
          85          90          95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr 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> 4
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer C12

```

<400> 4
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1          5          10          15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
          20          25          30
Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
          35          40          45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

[0003]

<210> 5
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <220>
 <221> 变体
 <222> 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 34, 35, 36, 41, 44, 53, 55, 59
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn, Cys

 <220>
 <221> 变体
 <222> 19, 20, 21, 37, 38, 39
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn, Cys

 <400> 5
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Trp Trp Xaa Ala Arg Ser Leu
 35 40 45
 Thr Thr Gly Glu Xaa Gly Xaa Ile Pro Ser Xaa Tyr Val Ala Pro Val
 50 55 60
 Asp Ser Ile Gln
 65

 <210> 6
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <220>
 <221> 变体
 <222> 12
 <223> Thr, Glu, Asp, Gln, Tyr, Val, Trp, Asn, Ser, Phe, Lys

 <220>
 <221> 变体
 <222> 13
 <223> Ser, Ala, Arg, Thr

 <220>
 <221> 变体
 <222> 14
 <223> Tyr, Arg, His, Thr, Asn, Val, Trp, Ser

 <220>
 <221> 变体
 <222> 15
 <223> Asn, Asp, Met, Tyr, Arg, Pro, Glu, Leu, His, Thr, Gly, Phe

 <220>
 <221> 变体
 <222> 16
 <223> Thr, Ser, Pro, Gln, Arg, Lys, Gly, Ala, Asp, Met, Asn, Leu, Phe,
 Tyr, Glu

 <220>
 <221> 变体
 <222> 17
 <223> Arg, Met, Lys, Asp, Phe, Thr, Gly, His, Ser, Pro, Asn, Gln, Tyr,
 Leu, Ala, Pro

 <220>
 <221> 变体
 <222> 19
 <223> Asp, Gly, Val, Leu, His, Asn, Arg, Phe, Ser, Ala

[0004]

<220>
<221> 变体
<222> 19
<223> Gly, Ser, Glu, Asp, Pro, Tyr 或不存在

<220>
<221> 变体
<222> 20
<223> Gln, Asp, Ser, His 或不存在

<220>
<221> 变体
<222> 21
<223> Asp, Val 或不存在

<220>
<221> 变体
<222> 34
<223> Arg, Lys, Gln, Asn, Ser, Gly, Trp, Met, His, Leu, Phe, Glu, Thr, Pro, Ala, Asp, Val

<220>
<221> 变体
<222> 35
<223> Met, Arg, Glu, Gly, Asn, Asp, Ser, Ala, Gln, Phe, Pro, Lys, Tyr, Thr, His, Val, Leu, Trp

<220>
<221> 变体
<222> 36
<223> Glu, Trp, Pro, Arg, Lys, Ser, Val, Asn, Asp, His, Gly, Thr, Gln, Ala, Tyr, Leu, Met

<220>
<221> 变体
<222> 37
<223> Asp, Arg, Gln, Ser, Ala, Asn, Pro, Ile, His, Thr, Tyr, Glu, Leu, Lys, Met, Val, Ile, Trp 或不存在

<220>
<221> 变体
<222> 38
<223> Gly, Ser, Ile, Leu, Ala, Val, Thr, Glu, Asp, Gln, Arg, Pro, Lys, Met, His, Tyr 或不存在

<220>
<221> 变体
<222> 39
<223> Lys, Gly, Arg, Ala, Thr, Val, Ser, Ile, Glu, Gln, Pro, Asp, Asn, His 或不存在

<220>
<221> 变体
<222> 41
<223> Val, Asp, Thr, Ile, Tyr

<220>
<221> 变体
<222> 44
<223> Glu, Ala, Arg, Thr, Gln

<220>
<221> 变体
<222> 53
<223> Thr, Ile, Val

<220>
<221> 变体
<222> 55
<223> Tyr, Leu, Phe

<220>
<221> 变体
<222> 59
<223> Asn, Ser

[0005]

<400> 6
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Trp Trp Xaa Ala Arg Ser Leu
 35 40 45
 Thr Thr Gly Glu Xaa Gly Xaa Ile Pro Ser Xaa Tyr Val Ala Pro Val
 50 55 60
 Asp Ser Ile Gln
 65

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变RT环

<400> 7
 Thr Ser Tyr Asn Thr Arg Asp
 1 5

<210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变SRC环

<400> 8
 Arg Met Glu Asp
 1

<210> 9
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 9
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Lys Arg Trp Arg Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 10
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 10
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Thr Arg Trp Ala Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 11

[0006]

<211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 11
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Ala Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Tyr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Gly Tyr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 12
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 12
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Glu Phe
 1 5 10 15
 Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Thr Met Trp Lys Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 13
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 13
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Tyr
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu His Ala Ser Met Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 14
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 14
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15
 His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asp
 20 25 30
 Asn Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

[0007]

<210> 15
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 15
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser His Pro His Val Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asn Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 16
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 16
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Tyr
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asn His Pro Pro Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 17
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 17
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Tyr Asp Leu
 1 5 10 15
 Ser Arg Pro Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
 20 25 30
 Asn Ser Ser Glu Gly Thr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Phe Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 18
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 18
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Met Pro
 1 5 10 15
 Lys Val Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
 20 25 30
 Gln Glu Pro Gln Ser Lys Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60

[0008]

Ser Ile Gln
65

<210> 19
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 19
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Gly
1 5 10 15
Arg His Ser Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30
Leu His Gln Ser Asn Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
35 40 45
Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
50 55 60
Ser Ile Gln
65

<210> 20
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 20
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Thr Thr Arg Pro
1 5 10 15
His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Arg
20 25 30
Thr Gln Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 21
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 21
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Thr Asn Asn Ser
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asn
20 25 30
Thr Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 22
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 22
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15
His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Arg
20 25 30
Ala Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln

[0009]

50	55	60
<210> 23		
<211> 63		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗HER2 Fynomer		
<400> 23		
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Asn		
1 5 10 15		
His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Glu		
20 25 30		
Leu Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr		
35 40 45		
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln		
50 55 60		
<210> 24		
<211> 63		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗HER2 Fynomer		
<400> 24		
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Arg Ser Tyr Asn Thr		
1 5 10 15		
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Lys		
20 25 30		
Ser Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr		
35 40 45		
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln		
50 55 60		
<210> 25		
<211> 65		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗HER2 Fynomer		
<400> 25		
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr		
1 5 10 15		
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys Ala		
20 25 30		
His Ser Leu Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly		
35 40 45		
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile		
50 55 60		
Gln		
65		
<210> 26		
<211> 65		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗HER2 Fynomer		
<400> 26		
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr		
1 5 10 15		
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Glu		
20 25 30		
Gln Asp Leu Arg Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly		
35 40 45		
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile		
50 55 60		
Gln		
65		

[0010]

<210> 27
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 27
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Lys
 1 5 10 15
 Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Thr
 20 25 30
 Asp Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 28
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 28
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Pro
 20 25 30
 Lys Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 29
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 29
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
 1 5 10 15
 His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Gln
 20 25 30
 His Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 30
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 30
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Leu
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
 20 25 30
 Ser Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 31
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0011]

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 31
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Ala
 20 25 30
 Thr Asp Ala Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

 <210> 32
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 32
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Glu
 20 25 30
 Leu Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 33
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 33
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Glu
 20 25 30
 Ala Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 34
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 34
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Arg Asp
 1 5 10 15
 His Ser Pro His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asn Leu Tyr Gln Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

 <210> 35
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0012]

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 35
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gln Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 36
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 36
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Val His Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Gln Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 37
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 37
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Gln
 20 25 30
 His Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 38
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 38
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Met
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Arg
 20 25 30
 Gly Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 39
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

[0013]

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 39

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

<210> 40

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 40

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

<210> 41

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 41

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

<210> 42

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 42

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

<210> 43

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

[0014]

<400> 43
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Trp Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Pro
 20 25 30
 Glu Glu Thr Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 44
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 44
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Pro
 20 25 30
 Arg Gln Arg Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 45
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 45
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
 20 25 30
 Pro Met Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 46
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 46
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15
 His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Pro Thr
 20 25 30
 Thr Asp Thr Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 47
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

[0015]

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 47

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

<210> 48

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 48

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

<210> 49

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 49

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

<210> 50

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 50

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

<210> 51

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 51

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

[0016]

```

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asp
      20      25      30
Ala Thr Leu Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
      35      40      45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
      50      55      60
Gln
65

```

```

<210> 52
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

```

```

<400> 52
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Lys
1      5      10      15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Glu
      20      25      30
Thr Ser Pro Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
      35      40      45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
      50      55      60
Gln
65

```

```

<210> 53
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

```

```

<400> 53
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Asn Thr
1      5      10      15
Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser His
      20      25      30
Thr Thr Ser Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
      35      40      45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
      50      55      60
Gln
65

```

```

<210> 54
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

```

```

<400> 54
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1      5      10      15
Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Met
      20      25      30
Ala Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
      35      40      45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
      50      55      60

```

```

<210> 55
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

```

```

<400> 55
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr

```

[0017]

```

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

<210> 56
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 56
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1           5           10           15
Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asn
                20           25           30
Pro Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
                35           40           45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
                50           55           60

<210> 57
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 57
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Asn Ser Tyr Asn Lys
1           5           10           15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
                20           25           30
Ala Ala Glu Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
                35           40           45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
                50           55           60
Gln
65

<210> 58
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 58
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1           5           10           15
Lys Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
                20           25           30
Ser Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
                35           40           45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
                50           55           60

<210> 59
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 59
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1           5           10           15

```

[0018]

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Tyr
20 25 30
Pro Arg Thr Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50 55 60
Gln
65

<210>	60
<211>	65
<212>	PRT
<213>	人工序列

抗HER2 Fynomer

<100> 60
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Glu
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Lys
 20 25 30
 Thr Pro Arg Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210>	61
<211>	65
<212>	PRT
<213>	人工序列

〈223〉 抗HER2 Fynomer

<400> 61
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15
Asn Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asp Ser
20 25 30
Gln Glu Pro Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50 55 60
Gln
65

<210>	62
<211>	65
<212>	PRT
<213>	人工序列

抗HER2 Fynomer

<400> 62
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
1 5 10 15
His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Gln
20 25 30
Tyr Pro Lys Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50 55 60
Gln
65

<210>	63
<211>	65
<212>	PRT
<213>	人工序列

〈223〉 抗HER2 Fynomer

[0019]

<400> 63
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys Gln
 20 25 30
 Gln Ala Gly Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 64
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 64
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ala
 20 25 30
 His Gln Ser Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 65
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 65
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Pro
 20 25 30
 Gln Ser Arg Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 66
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 66
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Pro Gly
 20 25 30
 Gln Ser Met Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 67
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0020]

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 67
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
 1 5 10 15
 His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Pro Arg
 20 25 30
 Gln Asp Thr Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 68
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 68
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Ala
 20 25 30
 Leu Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 69
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 69
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Glu
 1 5 10 15
 Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Gly
 20 25 30
 Thr Gln Leu Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 70
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 70
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln His
 20 25 30
 Lys Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 71
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

[0021]

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 71

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

<210> 72

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 72

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

<210> 73

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 73

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

<210> 74

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 74

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

<210> 75

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 75

[0022]

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

<210> 76
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 76
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Leu
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Gln
 20 25 30
 Asn Leu Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 77
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 77
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Leu
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Ser
 20 25 30
 His Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 78
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 78
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Ser
 20 25 30
 Arg Ala Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 79
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 79
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala

[0023]

```

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

```

<210> 80
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 80
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1           5           10           15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Thr
                20           25           30
Thr Ala Met Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
                35           40           45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
                50           55           60

```

<210> 81
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 81
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Arg
1           5           10           15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Val
                20           25           30
Asn Pro Met Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
                35           40           45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
                50           55           60
Gln
65

```

<210> 82
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 82
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1           5           10           15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Gln
                20           25           30
Gln Arg Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
                35           40           45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
                50           55           60

```

<210> 83
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

[0024]

<400> 83
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Val
 20 25 30
 Pro Gln Asp Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 84
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 84
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 1 5 10 15
 Asn Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
 20 25 30
 Gln Asp Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 85
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 85
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Arg
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Ser
 20 25 30
 Asn Arg Ala Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 86
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 86
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Pro
 20 25 30
 Asp Ser Arg Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 87
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0025]

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 87
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Pro
 20 25 30
 Pro Gln His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 88
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 88
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
 20 25 30
 Asp Pro Leu His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

 <210> 89
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 89
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
 20 25 30
 Lys Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 90
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer
 <400> 90
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Ser Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
 20 25 30
 Pro Pro Leu Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

 <210> 91
 <211> 65
 <212> PRT

[0026]

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 91

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

<210> 92

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 92

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

<210> 93

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 93

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

<210> 94

<211> 64

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 94

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

<210> 95

<211> 62

[0027]

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 95
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Val Ser Trp Asn Thr
 1 5 10 15
 Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30
 Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 96
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 96
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Leu Tyr
 1 5 10 15
 Ser Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
 20 25 30
 Arg Arg Trp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 97
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 97
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Pro
 20 25 30
 Pro Asn Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 98
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 98
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Arg
 20 25 30
 Met Pro Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 99

[0028]

```

<211> 66
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 99
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Phe Arg
1          5          10          15
Arg Asn Tyr Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20          25          30
Leu Ser Ala Gln Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
35          40          45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
50          55          60
Ile Gln
65

<210> 100
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 100
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Asp Arg Arg Tyr Gly
1          5          10          15
Ala Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Asp
20          25          30
Glu Ala Val Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35          40          45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50          55          60
Gln
65

<210> 101
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 101
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1          5          10          15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu His Asp
20          25          30
Pro Pro Ser Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35          40          45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50          55          60
Gln
65

<210> 102
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 102
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Tyr Ala
1          5          10          15
Pro Ala Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20          25          30
His Asp Arg Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35          40          45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50          55          60

```

[0029]

<210> 103
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 103
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Ser Tyr Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asn
 20 25 30
 Asp Pro Val His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 104
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 104
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Thr Trp Thr Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
 20 25 30
 Asp Glu Gln Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 105
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 105
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Phe Thr Asn Thr Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Leu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 106
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 106
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Lys Thr His Asn Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Gly
 20 25 30
 Arg Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

[0030]

Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 107
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 107
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Thr Tyr Thr Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Lys
 20 25 30
 Pro Pro Gln Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 108
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 108
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Tyr Gln
 1 5 10 15
 Asp Leu Glu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
 20 25 30
 Asn Gly Arg Arg Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 109
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 109
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Asp Arg His Tyr Thr
 1 5 10 15
 Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Asn
 20 25 30
 Lys Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 110
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 110
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asp
 20 25 30
 Ser Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln

[0031]

```

50          55          60
<210> 111
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 111
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Arg
1          5          10          15
Pro Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly
20          25          30
Asp Glu Gln Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35          40          45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50          55          60
Gln
65

<210> 112
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 112
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Thr Tyr Arg Lys
1          5          10          15
Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
20          25          30
Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35          40          45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50          55          60

<210> 113
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 113
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1          5          10          15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
20          25          30
Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35          40          45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50          55          60

<210> 114
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 114
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1          5          10          15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asp
20          25          30
Asn Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35          40          45

```

[0032]

Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 115
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 115
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
20 25 30
Ser Asp Gly Thr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 116
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 116
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Trp Ser
20 25 30
Asp Ala Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 117
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 117
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Met Ala
20 25 30
Trp Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 118
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 118
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Glu Gly
1 5 10 15
Gly Asn Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20 25 30
Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50 55 60
Gln

[0033]

65

<210> 119
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 119
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala His Asp Gln
 1 5 10 15
 His Arg Pro Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
 20 25 30
 Asn Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 120
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 120
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser His Pro His Val Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asn Ser Ser Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 121
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 121
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Leu Met
 20 25 30
 His Pro Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 122
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 122
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg His Ala
 1 5 10 15
 Pro Val Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly
 20 25 30
 Asp Asn Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

[0034]

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 123
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 123
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Thr Lys
1 5 10 15
His Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser
20 25 30
Gln Pro His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 124
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 124
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg His Glu
1 5 10 15
Asn Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20 25 30
Arg Gly Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45
Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 125
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 125
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Asp
1 5 10 15
Ser His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20 25 30
Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50 55 60
Gln
65

<210> 126
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 126
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Arg Thr
1 5 10 15
His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln

[0035]

```

          30          25          30
Pro His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
          35          40          45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

<210> 127
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 127
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Met
1          5          10          15
Ser Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
          20          25          30
Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
          35          40          45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
          50          55          60
Gln
65

```

<210> 128
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 128
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1          5          10          15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Phe
          20          25          30
Asn Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
          35          40          45
Gly Tyr Ile Pro Ser Ser Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

<210> 129
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 129
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1          5          10          15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Phe Pro
          20          25          30
Asp Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
          35          40          45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

<210> 130
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 130
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1          5          10          15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
          20          25          30
Pro His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
          35          40          45

```

[0036]

Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 131
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 131
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Lys
20 25 30
Gly Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 132
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 132
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asp
20 25 30
Gln His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 133
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 133
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Ala
20 25 30
Pro Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 134
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2 Fynomer

<400> 134
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Glu Tyr
20 25 30
Thr Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 135
<211> 65

[0037]

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 135
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Thr
 20 25 30
 Glu Ala Thr Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

 <210> 136
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 136
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Asn
 20 25 30
 Ser Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 137
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 137
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asn
 20 25 30
 Thr Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 138
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 138
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
 1 5 10 15
 Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Ala
 20 25 30
 Arg Tyr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 139
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0038]

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 139
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly His
 20 25 30
 His Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 140
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 140
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Met
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Asn
 20 25 30
 Ser Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 141
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 141
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Lys
 20 25 30
 Asp Ser Ala Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

 <210> 142
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

 <400> 142
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
 20 25 30
 Gly Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 <210> 143
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

[0039]

<400> 143
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys Met
 20 25 30
 Gln Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 144
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 144
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Arg
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Glu Thr
 20 25 30
 Gln Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 145
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 145
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Ser
 20 25 30
 Thr Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 146
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 146
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Arg Ser Trp Pro Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 147
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 147
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15

[0040]

Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Lys Thr Trp Glu Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 148
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 148
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Gln Ala Trp Gln Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

<210> 149
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 149
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30
 Glu Asp Gly Val Trp Trp Ala Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 150
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 150
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30
 Glu Asp Gly Val Trp Trp Arg Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 151
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

<400> 151
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met

[0041]

```

          30          25          30
Glu Asp Gly Val Trp Trp Thr Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Val
          35          40          45
Gly Phe Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

<210> 152
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

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

```

<210> 153
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

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

```

<210> 154
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

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

```

<210> 155
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

          5          10          15
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Ala Tyr Gly Met
1
Tyr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Ala
          20          25          30

```

[0042]

```

Leu Pro Asp Arg Gly Tyr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
      35      40      45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
      50      55      60
Gln
65

```

<210> 156
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 156
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1      5      10      15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Asp
      20      25      30
Asp Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
      35      40      45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
      50      55      60

```

<210> 157
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 157
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1      5      10      15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Phe
      20      25      30
Gln Ser Ala Gly Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
      35      40      45
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
      50      55      60
Gln
65

```

<210> 158
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 158
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1      5      10      15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Arg
      20      25      30
Asp Asn Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
      35      40      45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
      50      55      60

```

<210> 159
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2 Fynomer

```

<400> 159
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
1      5      10      15
Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
      20      25      30
Leu Trp Asn Thr Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr

```

[0043]

```

      35      40      45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
      50      55      60
Ile Gln
65

<210> 160
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GS接头

<400> 160
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 161
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GS接头

<400> 161
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 162
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GS接头

<400> 162
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 163
<211> 527
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> COVA420重链

<400> 163
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
20 25 30
Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln Gly
50 55 60
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
65 70 75 80
Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
85 90 95
Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met
100 105 110
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
115 120 125
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp
130 135 140
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln
145 150 155 160
Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg
165 170 175
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro
180 185 190
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
195 200 205

```

[0044]

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 210 215 220
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 245 250 255
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 260 265 270
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 275 280 285
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 290 295 300
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 305 310 315 320
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 325 330 335
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 340 345 350
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 355 360 365
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 370 375 380
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 385 390 395 400
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 405 410 415
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 420 425 430
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 435 440 445
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 450 455 460
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 465 470 475 480
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 485 490 495
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 500 505 510
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 515 520 525

<210> 164

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COVA420轻链

<400> 164

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr 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

[0045]

210

<210> 165
 <211> 527
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA422重链

<400> 165
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Lys 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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 465 470 475 480
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 485 490 495
 Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 500 505 510
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 515 520 525

[0046]

<210> 166
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA422轻链

<400> 166
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr 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> 167
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA446; 抗HER2 x 抗CD3单链Fv

<400> 167
 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 Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 130 135 140
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
 145 150 155 160
 Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

[0047]

```

225          230          235          240
Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
          245          250          255
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
          260          265          270
Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
          275          280          285
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
          290          295          300
Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
          305          310          315          320
Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr
          325          330          335
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
          340          345          350
Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
          355          360          365
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          370          375          380
Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro
          385          390          395          400
Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr
          405          410          415
Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
          420          425          430
Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala
          435          440          445
Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser
          450          455          460
Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr
          465          470          475          480
Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          485          490          495

```

<210> 168

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗HER2 Fynomer

<220>

<221> 变体

<222> 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 34, 35, 36, 41, 44, 53, 55, 59

<223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln, Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn

<220>

<221> 变体

<222> 19, 20, 21, 37, 38, 39

<223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln, Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn

<400> 168

```

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

```

<210> 169

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗EGFR Fynomer ERTL2D6

<400> 169

```

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
1          5          10          15

```

[0048]

```

Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
      20      25      30
Leu Ser Phe Glu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
      35      40      45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
      50      55      60
Ile Gln
65

<210> 170
<211> 532
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> COVA193 HC

<400> 170
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
1      5      10      15
Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
      20      25      30
Leu Ser Phe Glu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
      35      40      45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
      50      55      60
Ile Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65      70      75      80
Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
      85      90      95
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
      100      105      110
Ser Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
      115      120      125
Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys
      130      135      140
Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
145      150      155      160
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
      165      170      175
Cys Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp
      180      185      190
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
      195      200      205
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
      210      215      220
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
225      230      235      240
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
      245      250      255
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
      260      265      270
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
      275      280      285
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
      290      295      300
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
305      310      315      320
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
      325      330      335
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser
      340      345      350
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
      355      360      365
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
      370      375      380
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
385      390      395      400
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro
      405      410      415
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
      420      425      430
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
      435      440      445
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
      450      455      460
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

```

[0049]

465 470 475 480
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 485 490 495
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 500 505 510
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 515 520 525
 Ser Pro Gly Lys
 530

<210> 171
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA489 HC, 抗CD3抗体

<400> 171
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Ser
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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 Lys 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 Ala 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 Ala 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 Phe 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

[0050]

<210> 172
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA489 LC, 抗CD3抗体

<400> 172
 Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr 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> 173
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA445, 抗EGFR/CD3 scFv对照

<400> 173
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln
 115 120 125
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys
 130 135 140
 Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly
 165 170 175
 Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn
 180 185 190
 Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln
 195 200 205
 Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr
 210 215 220
 Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

[0051]

```

225          230          235          240
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
          245          250          255
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
          260          265          270
Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
          275          280          285
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
          290          295          300
Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
305          310          315
Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr
          325          330          335
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
          340          345          350
Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
          355          360          365
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          370          375          380
Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro
385          390          395
Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr
          405          410          415
Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
          420          425          430
Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala
          435          440          445
Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser
          450          455          460
Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr
465          470          475
Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His
          485          490          495
His His His His His
          500

```

<210> 174
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE1L1B3

```

<400> 174
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
1          5          10          15
His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
          20          25          30
Ser Glu Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
          35          40          45
Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

<210> 175
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA467 LC

```

<400> 175
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20          25          30
Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
          35          40          45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65          70          75          80
Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
          85          90          95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro
          100          105          110

```

[0052]

```

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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
      210      215      220
Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu
      225      230      235      240
Ala Leu Gly Ala His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln
      245      250      255
Ile Leu Asn Ser Ser Glu Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr
      260      265      270
Thr Gly Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
      275      280      285
Ser Ile Gln
      290

```

<210> 176
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA463, 抗CD3/CD33 scFv对照

```

<400> 176
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 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
      20      25      30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
      35      40      45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Leu Glu Leu His Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Trp Ser Trp Ser Asp Gly Tyr Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
      100      105      110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
      115      120      125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
      130      135      140
Pro Asp Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly Glu Arg Thr Thr Ile Asn Cys
      145      150      155      160
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asp Ser Ser Lys Asn Lys Asn Ser Leu
      165      170      175
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Leu Ser
      180      185      190
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      195      200      205
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Pro Glu
      210      215      220
Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ala His Phe Pro Ile Thr
      225      230      235      240
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      245      250      255
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
      260      265      270
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
      275      280      285
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      290      295      300
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      305      310      315      320
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
      325      330      335
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

```

[0053]

```

          340          345          350
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
          355          360          365
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
          370          375          380
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val
385          390          395          400
Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu
          405          410          415
Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn
          420          425          430
Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly
          435          440          445
Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu
          450          455          460
Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp
465          470          475          480
Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe
          485          490          495
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His
          500          505          510

```

<210> 177
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE3L11B4

```

<400> 177
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
1          5          10          15
His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Gly
          20          25          30
Ser Lys Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
          35          40          45
Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

<210> 178
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE4L12D5

```

<400> 178
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
1          5          10          15
His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Ser
          20          25          30
Leu Ala Val Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Glu
          35          40          45
Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

<210> 179
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE4L12D3

```

<400> 179
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
1          5          10          15
His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Met Met
          20          25          30
Ser Asp Glu Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Glu
          35          40          45
Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
          50          55          60

```

[0054]

<210> 180
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE4L12G1

<400> 180
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Pro
 20 25 30
 Arg Ser Glu Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 181
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE6L12C6

<400> 181
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Ser
 20 25 30
 Leu Leu Gln Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 182
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE23L59C1

<400> 182
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asp Val
 20 25 30
 Thr Leu Ala Gly Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 183
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE23L59A6A

<400> 183
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Val
 20 25 30
 Ala Leu Glu Gly Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly

[0055]

35 40 45
 Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 184
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE23L62E1

<400> 184
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Leu Arg
 20 25 30
 Val Gln Leu Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 185
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE23L62D6

<400> 185
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asp Val
 20 25 30
 Gly Leu Arg Gly Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 186
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer EE23L62H7

<400> 186
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Leu Arg
 20 25 30
 Leu Val Leu Leu Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 187
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER9L3D7

<400> 187
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15

[0056]

```

Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
      20      25      30
Leu Ser Thr Glu Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
      35      40      45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
      50      55      60
Ile Gln
65

```

<210> 188
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER5LIE2

```

<400> 188
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Val Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
1      5      10      15
Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
      20      25      30
Leu Asn Arg Glu Ser Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
      35      40      45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
      50      55      60
Ile Gln
65

```

<210> 189
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER5LIE5

```

<400> 189
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
1      5      10      15
Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
      20      25      30
Leu Gln Phe Glu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
      35      40      45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
      50      55      60
Ile Gln
65

```

<210> 190
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER5LIH3

```

<400> 190
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
1      5      10      15
Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
      20      25      30
Leu Ala Phe Glu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
      35      40      45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
      50      55      60
Ile Gln
65

```

<210> 191
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER6L1A9

[0057]

<400> 191
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Asn Arg Leu Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asp Arg Thr Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 192
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER6L1C10

<400> 192
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 His Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asn Arg Glu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 193
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER6L1F9

<400> 193
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Asn Arg Leu Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asp Arg Thr Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 194
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER7I.2E8

<400> 194
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Thr Arg Glu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65

<210> 195
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0058]

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer ER8L3G1
 <400> 195
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asp Thr Ser Glu Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65
 <210> 196
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗EGFR Fynomer 3D5
 <400> 196
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Leu Pro Gln Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65
 <210> 197
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗EGFR Fynomer 1C6
 <400> 197
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 His Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Asp Arg Thr Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65
 <210> 198
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COVA494 LC
 <400> 198
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Ser Phe Glu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Ser Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro
 85 90 95
 Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr

[0059]

```

      100      105      110
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
      115      120      125
Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      130      135      140
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr
      145      150      155      160
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro
      165      170      175
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
      180      185      190
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      195      200      205
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      210      215      220
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      225      230      235      240
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      245      250      255
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      260      265      270
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      275      280      285
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      290

```

<210> 199
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA497 HC

```

<400> 199
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
1      5      10      15
Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20     25     30
Leu Ser Thr Glu Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
35     40     45
Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
50     55     60
Ile Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65     70     75     80
Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
85     90     95
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
100    105    110
Ser Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
115    120    125
Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys
130    135    140
Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
145    150    155      160
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
165    170    175
Cys Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp
180    185    190
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
195    200    205
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
210    215    220
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
225    230    235      240
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
245    250    255
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
260    265    270
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
275    280    285
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
290    295    300
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
305    310    315      320
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
325    330    335

```

[0060]

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser
 340 345 350
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 355 360 365
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 370 375 380
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 385 390 395 400
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro
 405 410 415
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 420 425 430
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 435 440 445
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 450 455 460
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 465 470 475 480
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 485 490 495
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 500 505 510
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 515 520 525
 Ser Pro Gly Lys
 530

<210> 200
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> COVA499 LC

<400> 200
 Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Met Glu Thr Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr 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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu
 225 230 235 240
 Ala Arg Gly Leu Asn Arg Met Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu
 245 250 255
 Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr Glu Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg
 260 265 270
 Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala
 275 280 285
 Pro Val Asp Ser Ile Gln
 290

<210> 201
 <211> 67

[0061]

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗EGFR Fynomer

 <220>
 <221> 变体
 <222> 8, 17, 19, 34, 35, 36, 37
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn, Cys

 <220>
 <221> 变体
 <222> 38
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn, Cys 或不存在

 <400> 201
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Xaa Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Xaa Arg Xaa Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

 <210> 202
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗EGFR Fynomer

 <220>
 <221> 变体
 <222> 8, 17, 19, 34, 35, 36, 37
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn

 <220>
 <221> 变体
 <222> 38
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn 或不存在

 <400> 202
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Xaa Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Xaa Arg Xaa Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

 <210> 203
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗EGFR Fynomer

 <220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Leu, Val

 <220>
 <221> 变体

[0062]

<222> 17
 <223> Asn, His

 <220>
 <221> 变体
 <222> 19
 <223> Met, Leu

 <220>
 <221> 变体
 <222> 34
 <223> Ser, Asn, Gln, Ala, Asp, Thr, Leu

 <220>
 <221> 变体
 <222> 35
 <223> Phe, Thr, Arg, Pro

 <220>
 <221> 变体
 <222> 36
 <223> Ser, Glu, Thr, Gln

 <220>
 <221> 变体
 <222> 37
 <223> Glu, Thr, Ser, Asn

 <220>
 <221> 变体
 <222> 38
 <223> Ser 或不存在

 <400> 203
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Xaa Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Xaa Arg Xaa Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln
 65

 <210> 204
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗EGFR Fynomer RT环

 <220>
 <221> 变体
 <222> 6
 <223> Asn, His

 <220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Met, Leu

 <400> 204
 Glu Ala Arg Gly Leu Xaa Arg Xaa Phe
 1 5

 <210> 205
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗CD33 Fynomer

 <220>
 <221> 变体

[0063]

<222> 31, 32, 33, 34
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn, Cys

<220>
 <221> 变体
 <222> 35, 36
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn, Cys 或不存在

<400> 205
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 206
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer

<220>
 <221> 变体
 <222> 31, 32, 33, 34
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn

<220>
 <221> 变体
 <222> 35, 36
 <223> Gly, Val, Thr, Leu, Phe, Ala, Tyr, Asp, Ser, His, Lys, Glu, Gln,
 Ile, Trp, Arg, Met, Pro, Asn 或不存在

<400> 206
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 207
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer

<220>
 <221> 变体
 <222> 31
 <223> Asn, Arg, Ser, Leu, Met, Asp, Tyr

<220>
 <221> 变体
 <222> 32
 <223> Ser, Gly, Pro, Arg, Met, Val

<220>
 <221> 变体
 <222> 33
 <223> Leu, Thr, Gly, Ser, Val, Arg, Ala

[0064]

<220>
 <221> 变体
 <222> 34
 <223> Ser, Ala, Leu, Gln, Asp, Val, Lys, Glu

<220>
 <221> 变体
 <222> 35
 <223> Glu, Val, Gln, Leu, Ala, Arg 或不存在

<220>
 <221> 变体
 <222> 36
 <223> Leu, Gly 或不存在

<400> 207
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 His Glu Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro Phe Trp Glu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 208
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗CD33 Fynomer RT环

<400> 208
 Glu Ala Leu Gly Ala His Glu
 1 5

<210> 209
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗EGFR Fynomer RT环

<220>
 <221> 变体
 <222> 6
 <223> Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro,
 Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr

<220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro,
 Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr

<400> 209
 Glu Ala Arg Gly Leu Xaa Arg Xaa Phe
 1 5

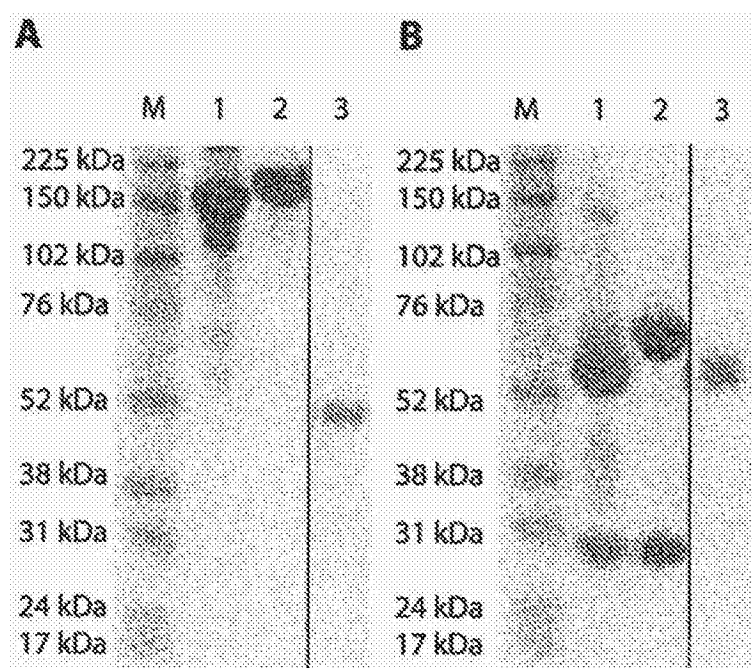


图 1

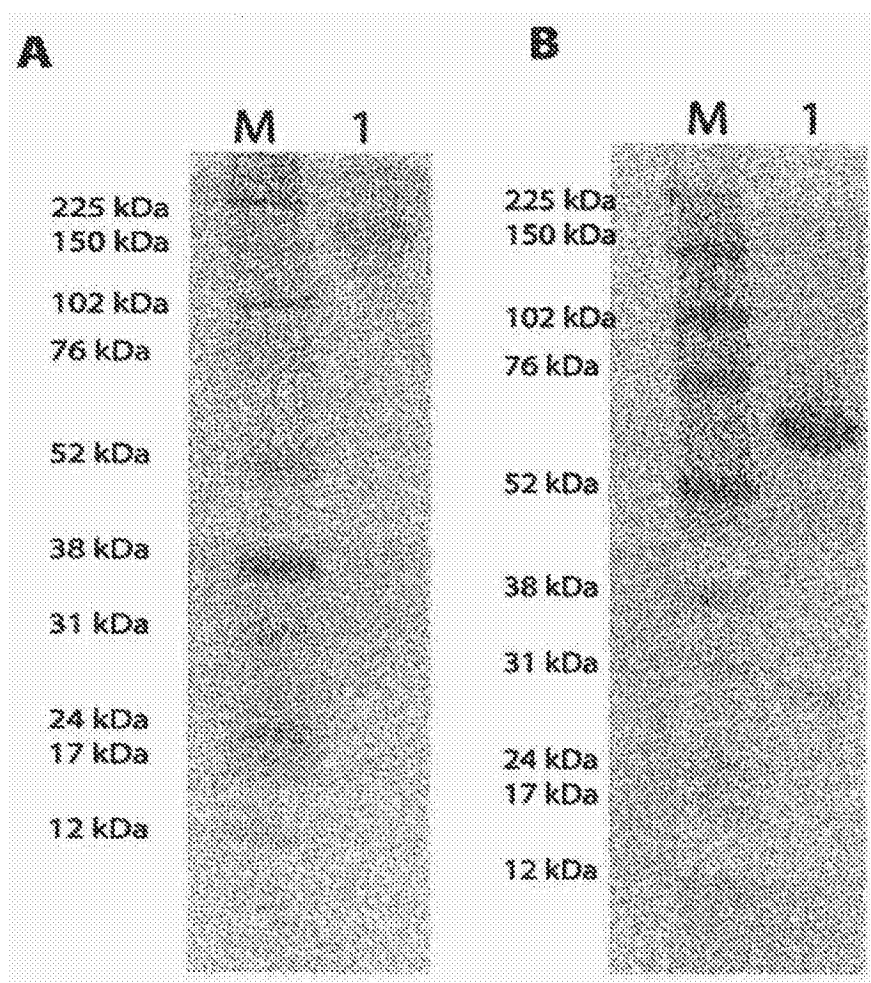


图 2

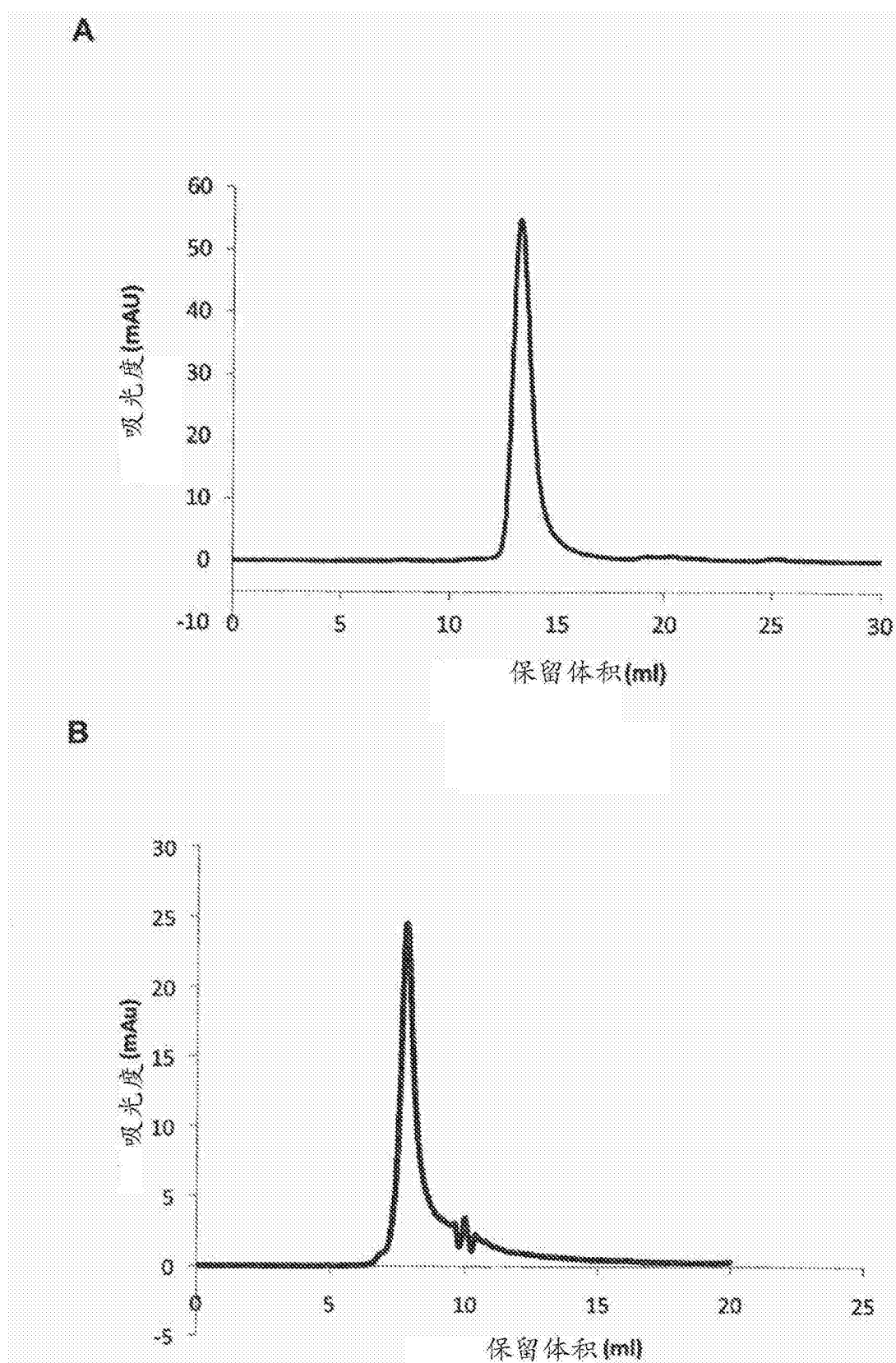


图 3

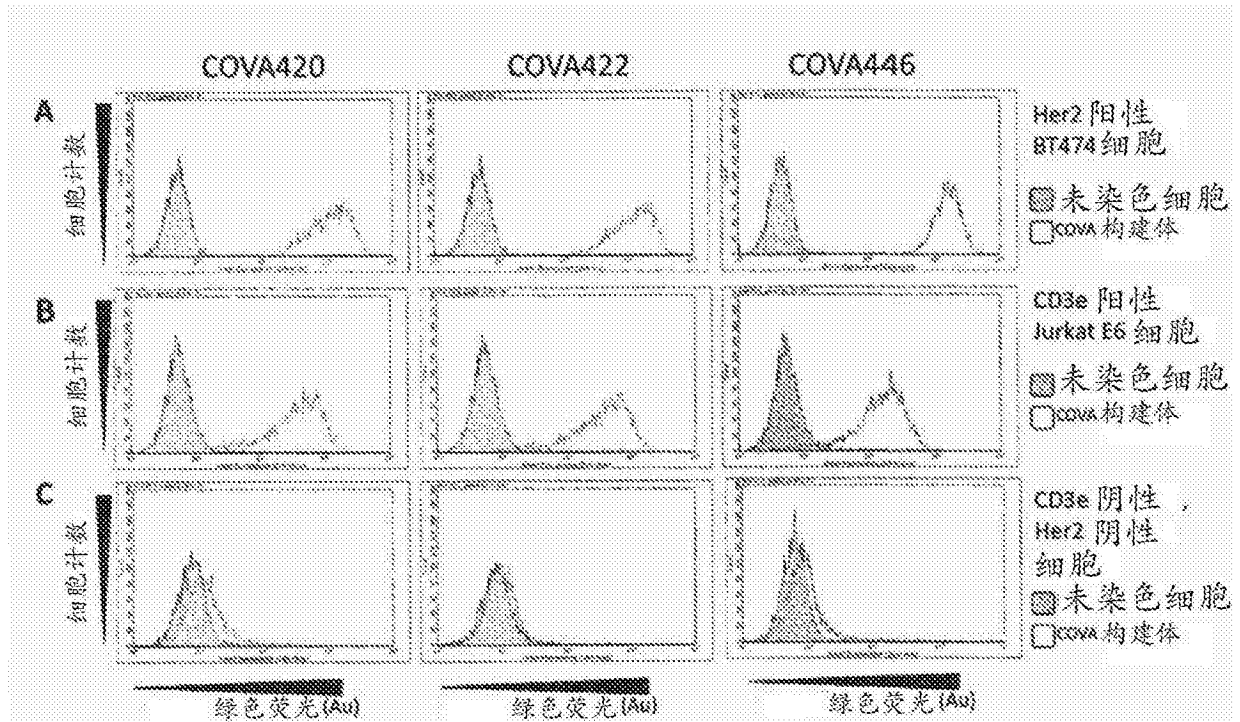


图 4

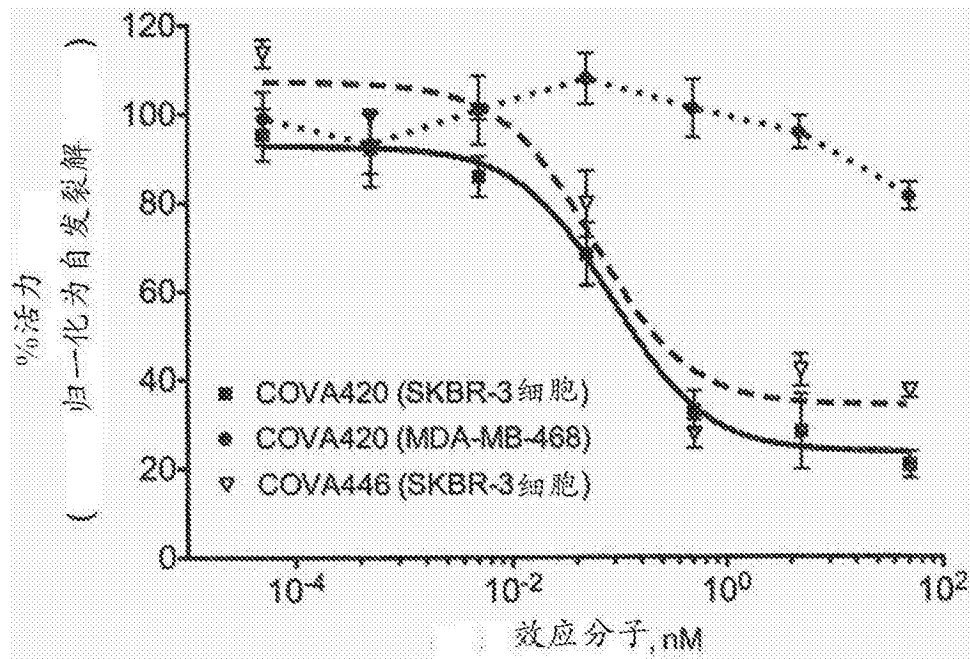


图 5

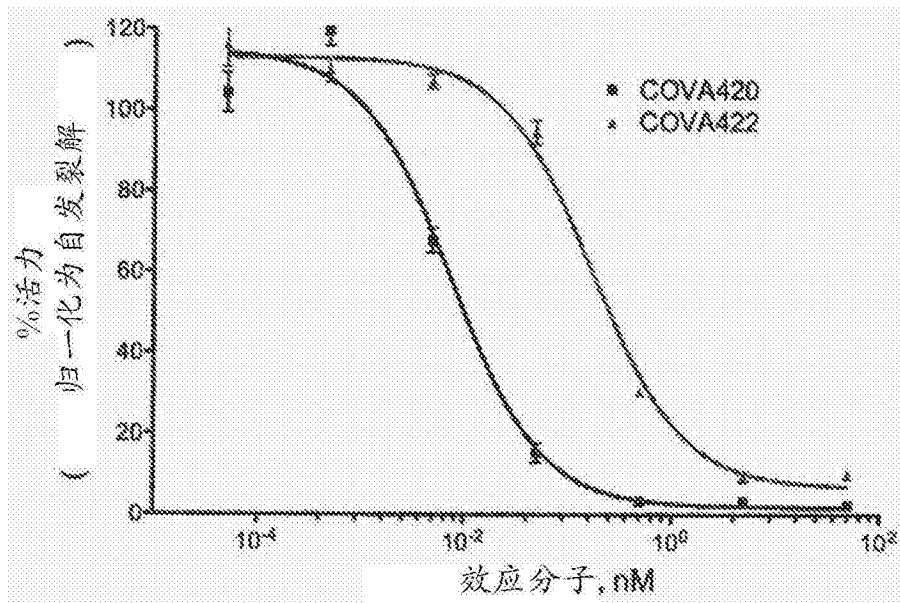


图 6

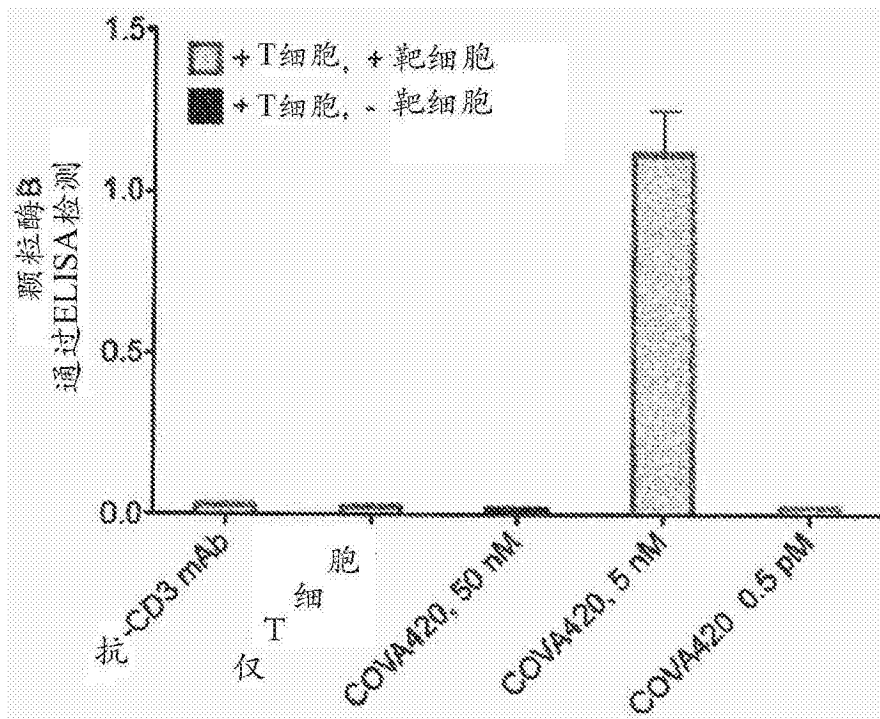


图 7

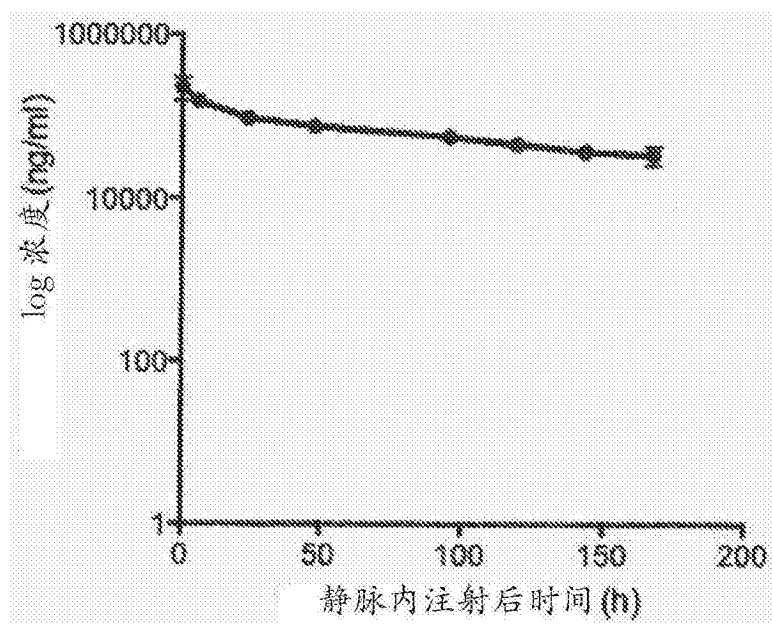


图 8

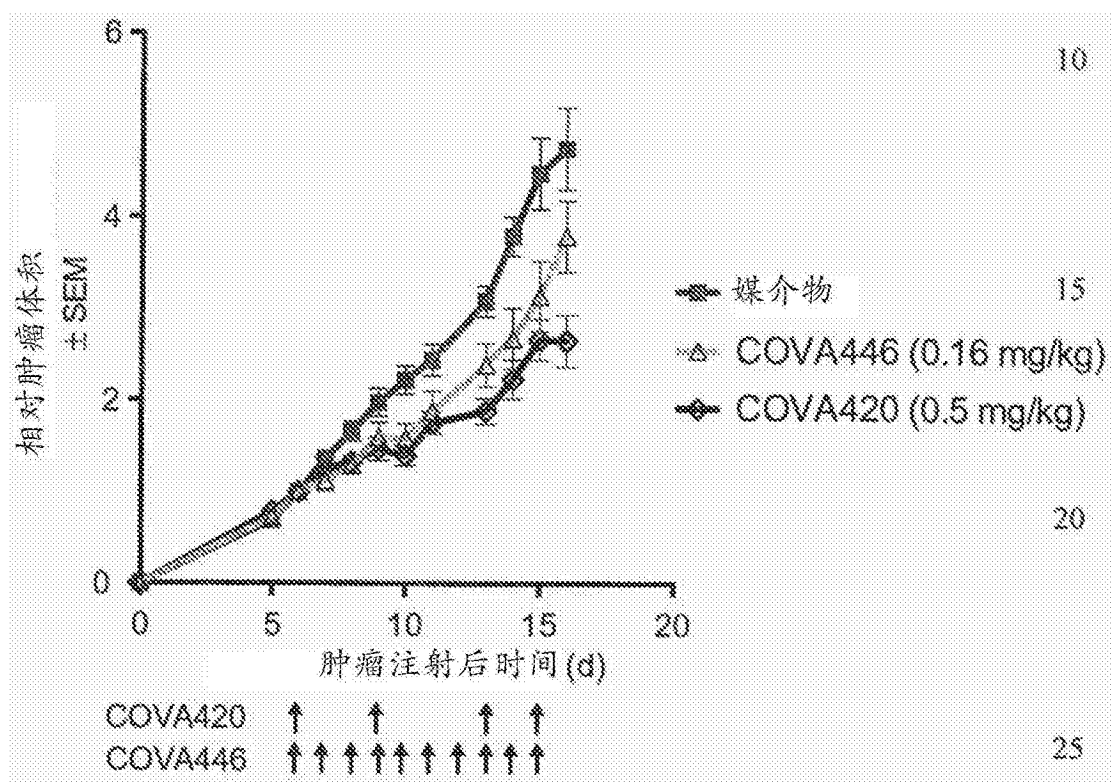


图 9

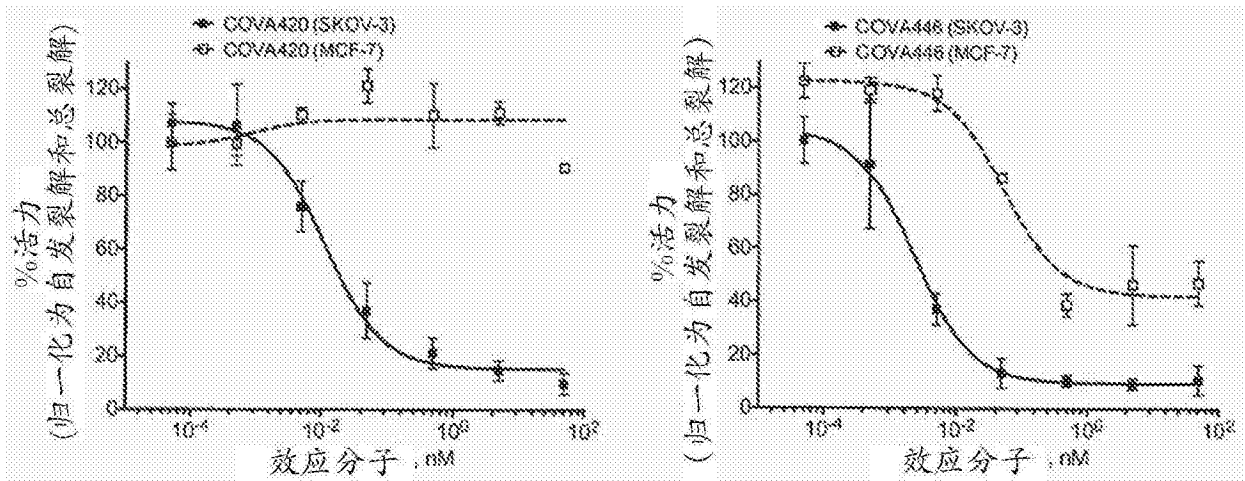


图 10

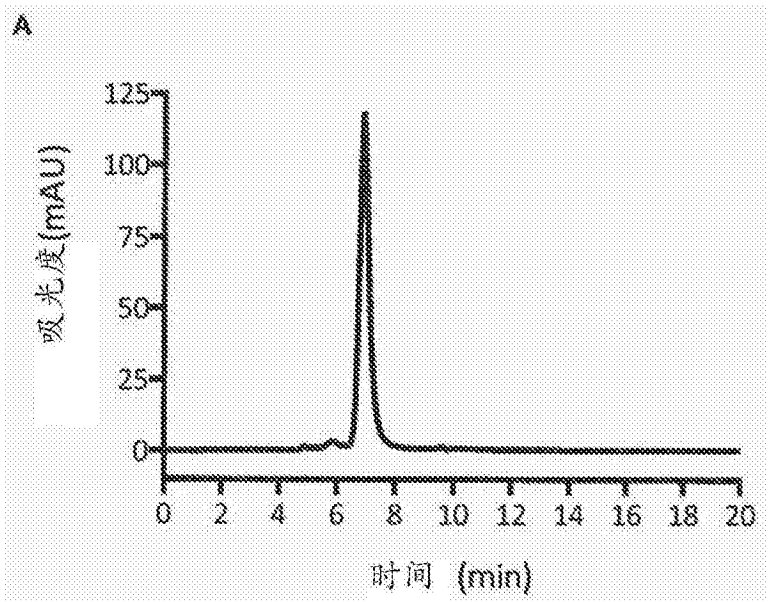


图 11

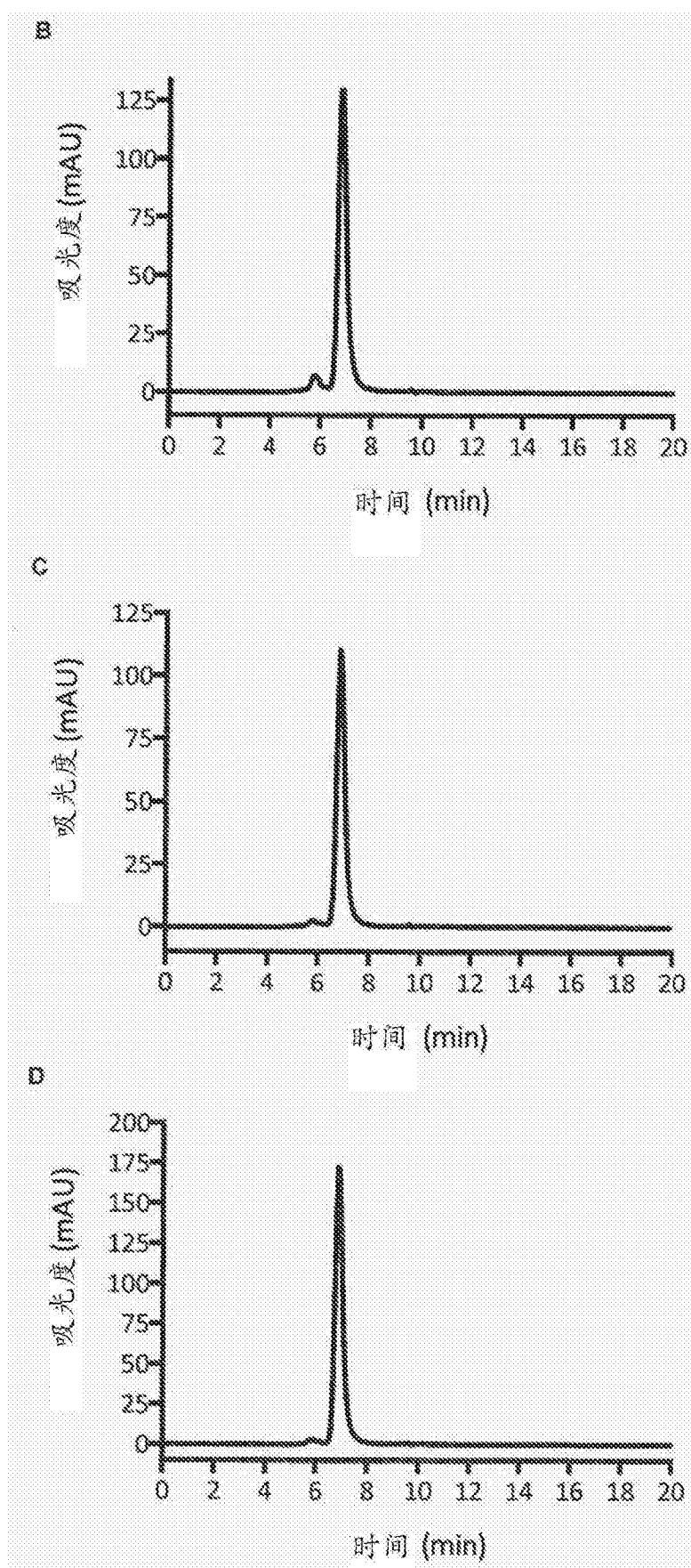


图 11 续

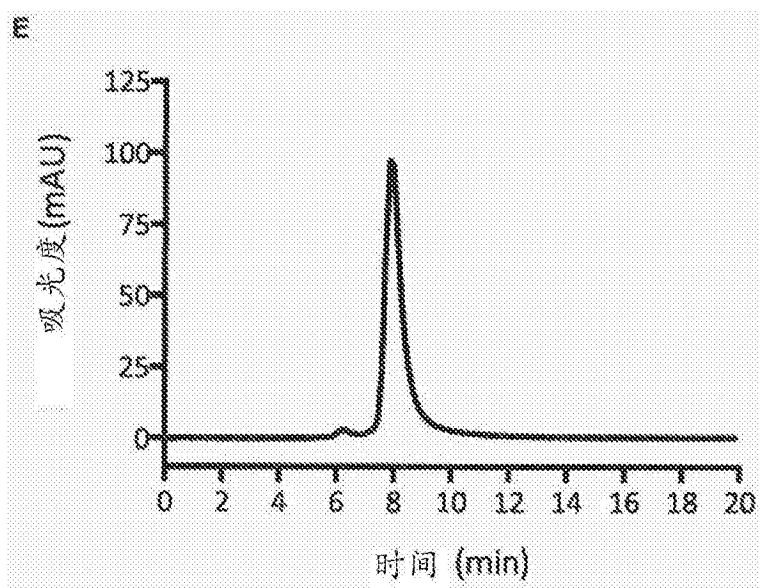


图 11 续

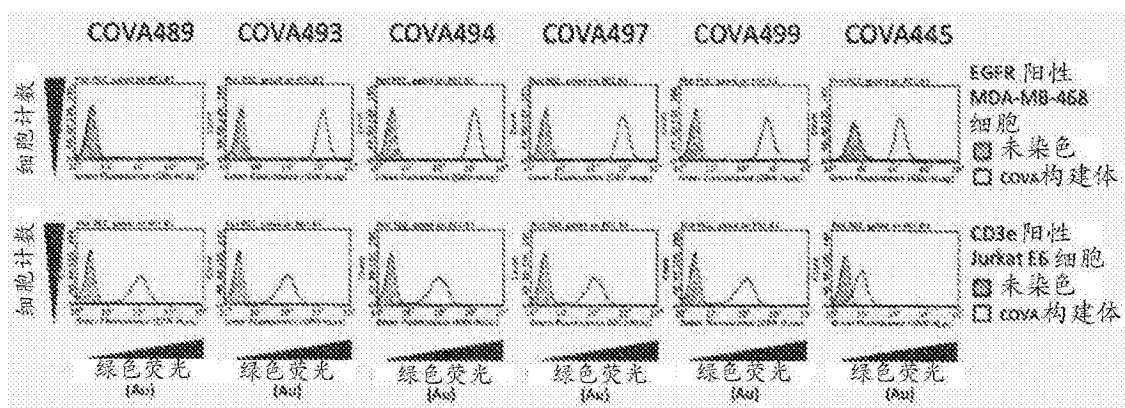


图 12

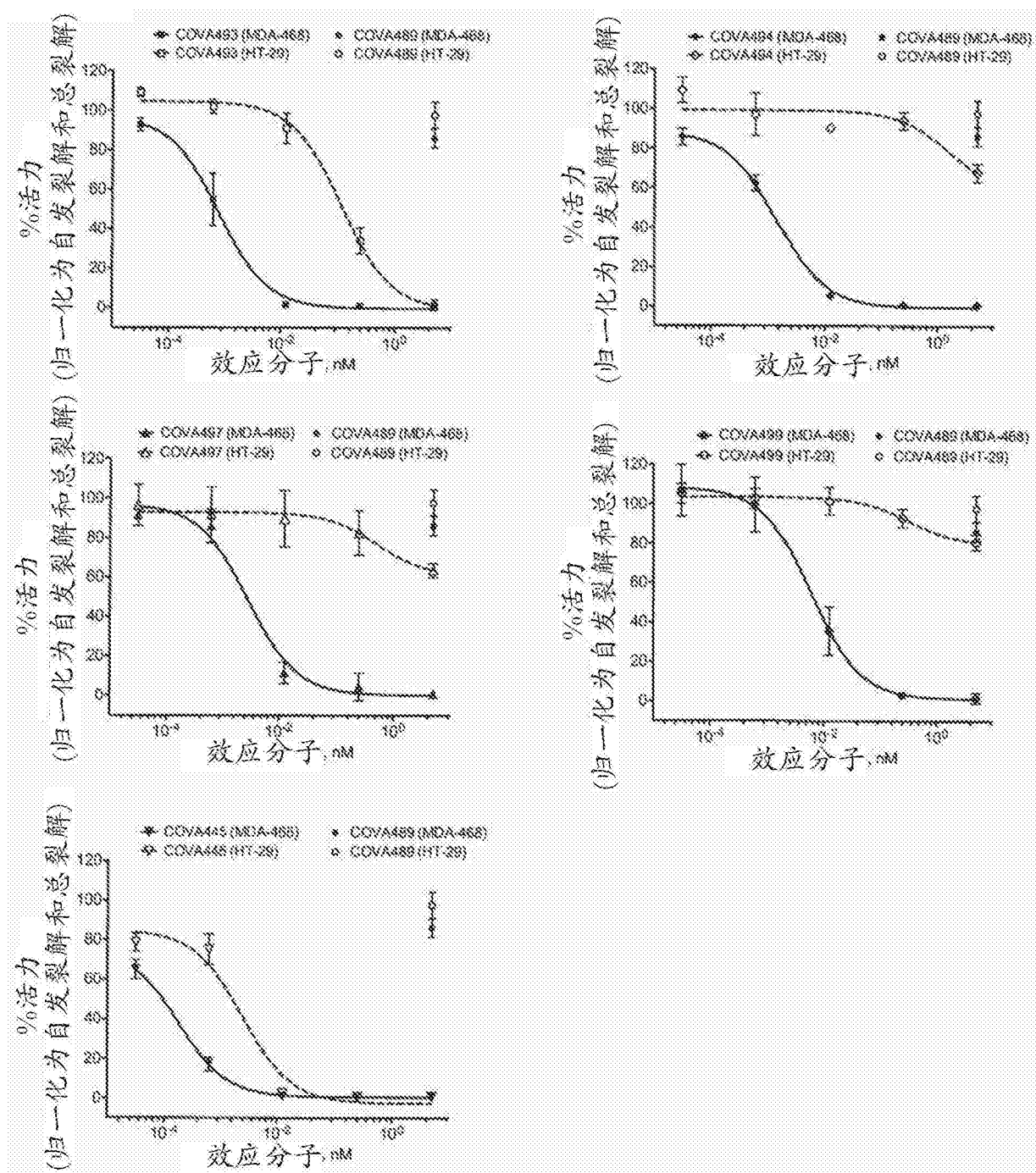


图 13

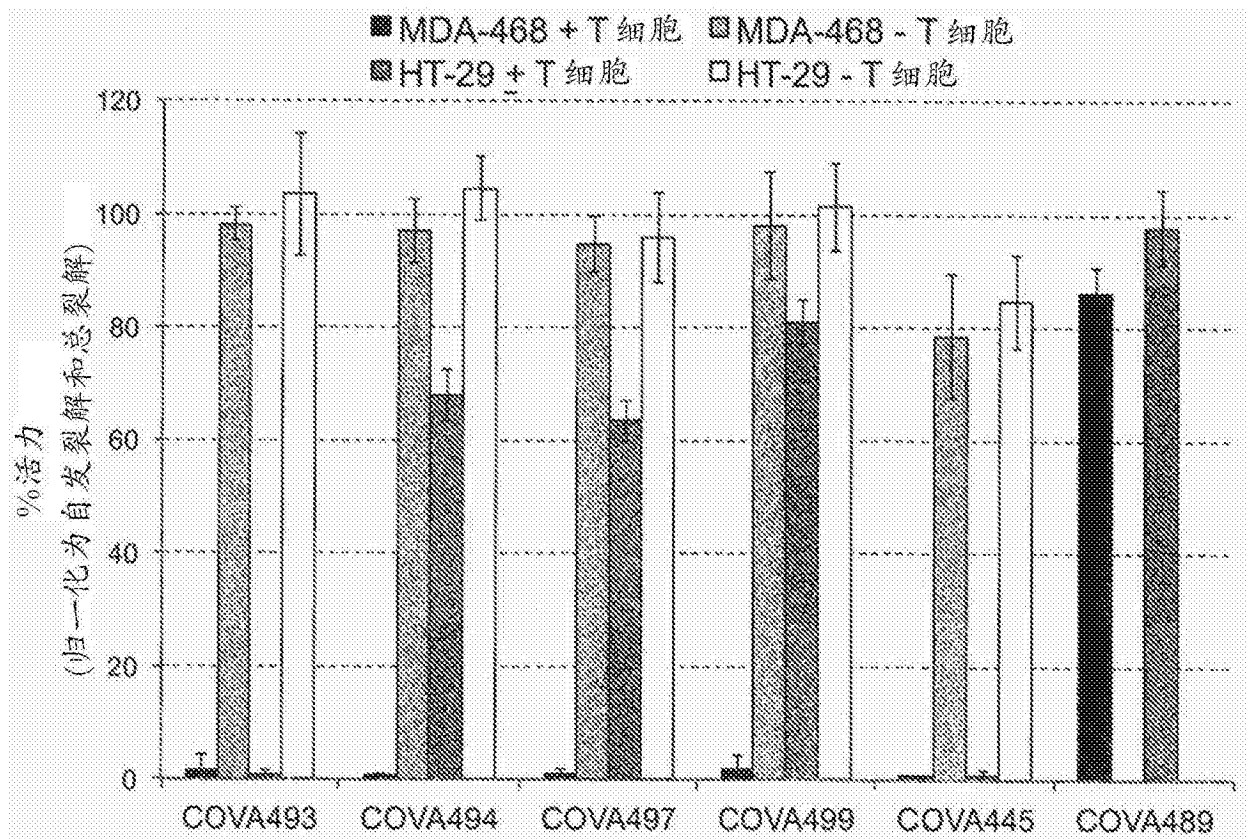


图 14

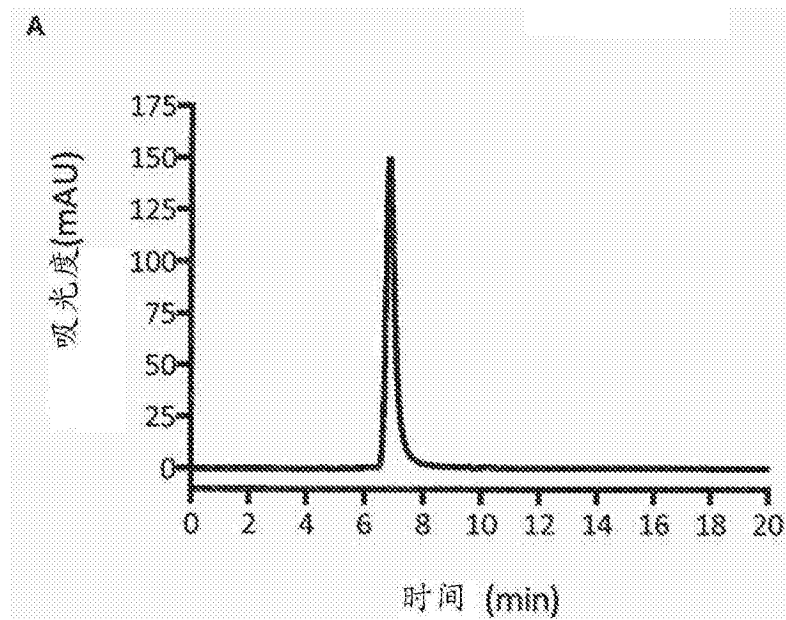


图 15

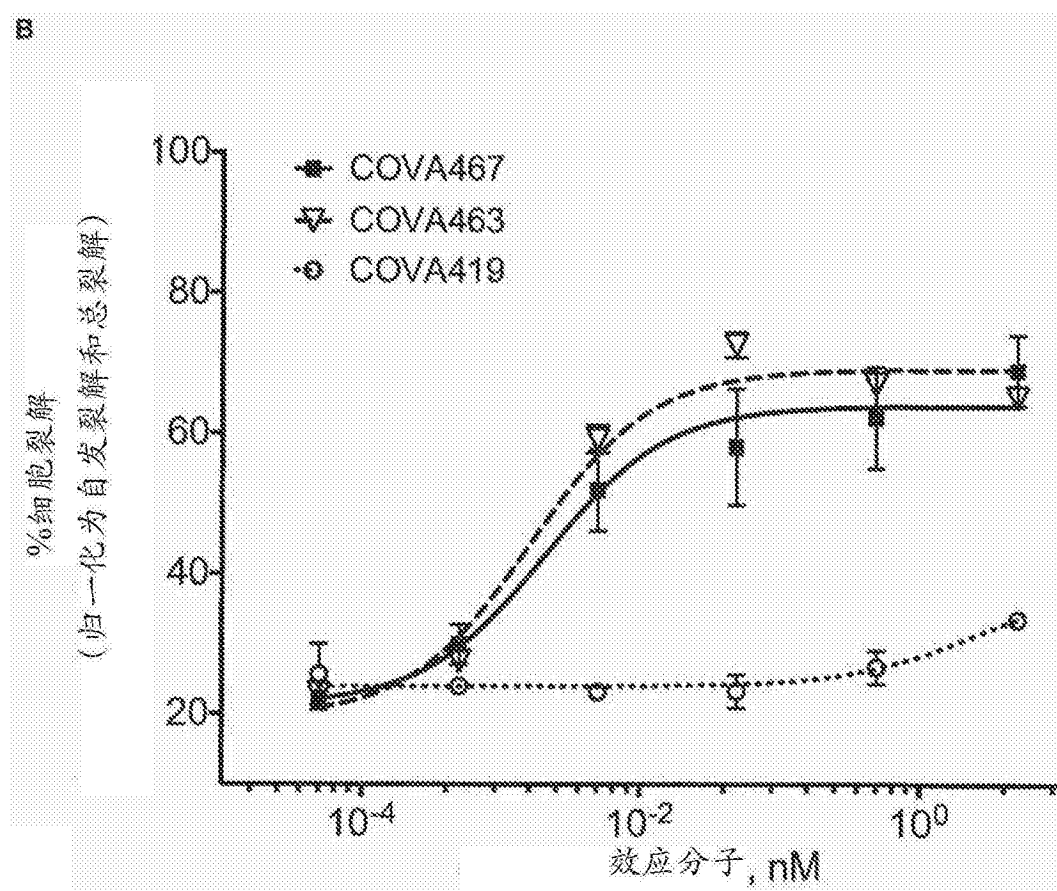


图 15 续