

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201690773 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2016.08.31

(51) Int. Cl. *A61K 38/22* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2014.10.13

(54) СВЯЗУЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА ТИПА III С  
ВНЕДРЕННЫМИ ОСТАТКАМИ ЦИСТЕИНА

(31) 61/890,539

(32) 2013.10.14

(33) US

(86) PCT/US2014/060227

(87) WO 2015/057545 2015.04.23

(88) 2015.06.11

(71) Заявитель:

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

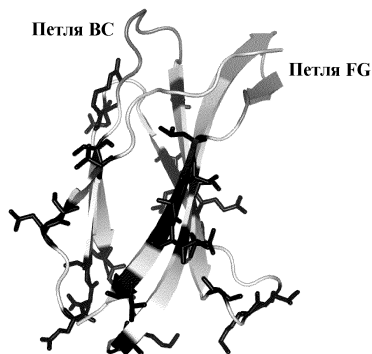
(72) Изобретатель:

Голдберг Шалом, Джекобс Стивен,  
Лин Триция, О'Нил Кэрин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Моноспецифические и биспецифические к EGFR и/или c-Met молекулы с внедренными остатками цистеина, содержащие домен FN3, которые содержат одну или более свободных аминокислот цистеина, получают путем мутагенеза нуклеотидной последовательности исходной молекулы и замены одного или более аминокислотных остатков на цистеин для кодирования моноспецифических или биспецифических молекул с внедренными остатками цистеина, содержащих домен FN3; экспрессии молекул с внедренными остатками цистеина, содержащих домен FN3; и извлечения молекулы с внедренными остатками цистеина, содержащей домен FN3. Выделенная моноспецифическая или биспецифическая молекула введенным цистеином, содержащая домен FN3, может быть ковалентно связана с детекторной меткой или фрагментом лекарственного средства и использована в терапевтических целях.



A1

201690773

201690773

A1

**СВЯЗУЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА ТИПА III С  
ВНЕДРЕННЫМИ ОСТАТКАМИ ЦИСТЕИНА**

**ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к связующим молекулам с введенными цистеиновыми остатками, а также к способам их получения и использования. Более конкретно, изобретение относится к молекулам с доменами фибронектина типа III (FN3), которые могут связываться с EGFR и/или с-Met, и в которые введен цистеин.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, или ErbB1, или HER1) представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 170 кДа, кодируемый протоонкогеном *c-erbB1*. EGFR является членом семейства человеческих рецепторов эпидермальных факторов роста (HER), которые представляют собой рецепторные тирозинкиназы (RTK), включающие в себя HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). Эти RTK имеют гомологичную структуру, которая состоит из лиганд-связывающего внеклеточного домена (ECD), одиночного трансмембранного домена и внутриклеточного домена, содержащего каталитический киназный домен и С-концевой хвост. EGFR-сигнализация запускается связыванием лиганда, за которым следует индукция конформационного изменения, димеризация и трансавтофосфорилирование рецептора (Ferguson et al., *Annu Rev Biophys*, 37: 353-73, 2008), в результате чего запускается каскад передачи сигналов, который в конечном счете влияет на широкий спектр клеточных функций, включая пролиферацию и выживаемость клеток. Повышение экспрессии или киназной активности EGFR связано с рядом типов рака у человека, что делает EGFR привлекательной мишенью для терапевтического вмешательства (Mendelsohn et al., *Oncogene* 19: 6550-6565, 2000; Grünwald et al., *J Natl Cancer Inst* 95: 851-67, 2003; Mendelsohn et al., *Semin Oncol* 33: 369-85, 2006). Более того, как увеличение числа копий гена EGFR, так и повышение экспрессии белка связывают с благоприятными ответами на ингибитор тирозинкиназ EGFR IRESSA™

(гефитиниб) при немелкоклеточном раке легких (Hirsch et al., *Ann Oncol* 18:752–60, 2007).

К связанным с EGFR терапевтическим средствам относятся как низкомолекулярные соединения, так и антитела к EGFR, одобренные для лечения колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи и немелкоклеточного рака легких (NSCLC) (Baselga and Arteaga, *J Clin Oncol* 23:2445–2459 (2005); Gill et al., *J Biol Chem*, 259:7755–7760, 1984; Goldstein et al., *Clin Cancer Res*, 1:1311–1318; 1995; Prewett et al., *Clin Cancer Res*, 4:2957–2966, 1998).

Эффективность терапевтических средств против EGFR может зависеть от типа опухоли и статуса мутации/амплификации EGFR в опухоли, и они могут вызывать кожную токсичность (De Roock et al., *Lancet Oncol* 11:753–762, 2010; Linardou et al., *Nat Rev Clin Oncol*, 6: 352–366, 2009; Li and Perez-Soler, *Targ Oncol* 4: 107–119, 2009). Ингибиторы тирозинкиназы EGFR (TKI) обычно применяют в качестве терапевтических средств 2-ой линии при немелкоклеточном раке легких (NSCLC), но часто они прекращают работать в течение двенадцати месяцев из-за обуславливающих резистентность путей (Riely et al., *Clin Cancer Res* 12: 839–44, 2006).

c-Met кодирует тирозинкиназный рецептор. Впервые его обнаружили как протоонкоген в 1984 г., после того как было выявлено, что воздействие канцерогена приводило к появлению конститутивно активного слитного белка TPR-MET (Cooper et al., *Nature* 311:29–33, 1984). Активация c-Met через его лиганд HGF вызывает стимуляцию большого числа клеточных процессов, включая рост, подвижность, вовлечение в злокачественный процесс, метастазирование, эпителиально-мезенхимальное превращение, ангиогенез/заживление ран и регенерацию тканей (Christensen et al., *Cancer Lett* 225:1–26, 2005; Peters and Adjei, *Nat Rev Clin Oncol* 9:314–26, 2012). c-Met синтезируется в виде одноцепочечного белка, который протеолитически расщепляется на альфа-субъединицу массой 50 кДа и бета-субъединицу массой 140 кДа, соединенные

дисульфидной связью (Ma et al., Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309–325, 2003). c-Met структурно аналогичен другим мембранным рецепторам, таким как Ron и Sea, и состоит из внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного домена и цитоплазматического домена (который содержит тирозинкиназный домен и С-концевую хвостовую область). Точная стехиометрия связывания HGF:c-Met неизвестна, но по существу считается, что две молекулы HGF связываются с двумя молекулами c-Met, что приводит к димеризации рецептора и аутофосфорилированию по тирозиновым остаткам в положениях 1230, 1234 и 1235 (Stamos et al., The EMBO Journal 23: 2325–2335, 2004). Также возможно независимое от лиганда аутофосфорилирование c-Met вследствие амплификации гена, мутации или сверхэкспрессии рецептора.

c-Met часто является амплифицированным, мутированным или сверхэкспрессированным при многих типах рака, включая рак желудка, легких, толстой кишки, молочной железы, мочевого пузыря, головы и шеи, яичников, простаты, щитовидной железы, поджелудочной железы и ЦНС. Миссенс-мутации, как правило, локализованные в киназном домене, часто обнаруживают при наследственных папиллярных почечных карциномах (PRCC) и в 13% случаев спорадических PRCC (Schmidt et al., Oncogene 18: 2343–2350, 1999). Напротив, мутации c-Met, локализованные в семафориновом или околосмембранном доменах c-Met, часто обнаруживают при раке желудка, головы и шеи, печени, яичников, NSCLC и раке поджелудочной железы (Ma et al., Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309–325, 2003; Sakakura et al., Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299–305). При раке мозга, колоректальном раке, раке желудка и раке легких определяется амплификация c-Met, что часто коррелирует с прогрессированием заболевания (Ma et al., Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309–325, 2003). До 4% и 20% случаев немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака желудка соответственно характеризовались амплификацией c-Met (Sakakura et al., Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299–305; Sierra and Tsao, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 3:S21–35, 2011). При раке легких, даже в

отсутствие амплификации гена, часто наблюдают сверхэкспрессию с-Met (Ichimura et al., *Jpn J Cancer Res*, 87:1063–9, 1996). Более того, почти половина клинических образцов легочных аденокарцином характеризовалась высокими уровнями с-Met и HGF, оба из которых коррелируют с повышенной скоростью роста опухоли, метастазированием и плохим прогнозом (Sierra and Tsao, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3:S21–35, 2011; Siegfried et al., *Ann Thorac Surg* 66: 1915–8, 1998).

Приблизительно в 60% всех опухолей, приобретших резистентность к ингибиторам тирозинкиназы EGFR, повышается экспрессия с-Met, амплификация с-Met или увеличивается уровень его единственно известного лиганда HGF (Turke et al., *Cancer Cell*, 17:77–88, 2010), что предполагает существование компенсаторного пути для EGFR через с-Met. Амплификация с-Met впервые была выявлена в культивируемых клетках, приобретших резистентность к gefитинибу, ингибитору киназы EGFR, и демонстрирующих повышенную выживаемость посредством пути Her3 (Engelman et al., *Science*, 316:1039–43, 2007). Это было дополнительно подтверждено с помощью клинических образцов, в которых у девяти из 43 пациентов с приобретенной резистентностью к эрлотинибу или gefитинибу проявилась амплификация с-Met по сравнению лишь с двумя из 62 пациентов без лечения. Интересно, что четверо из девяти получавших лечение пациентов также приобрели активирующую EGFR мутацию T790M, что демонстрирует параллельные обуславливающие резистентность пути (Beat et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:20932–7, 2007).

В настоящее время отдельные роли как EGFR, так и с-Met при раке хорошо известны, что делает данные мишени привлекательными для комбинированной терапии. Оба рецептора осуществляют сигнализацию через одни и те же пути, связанные с выживанием и антиапоптозным эффектом (ERK и АКТ). Таким образом, одновременное ингибирование этой пары может ограничивать потенциал активации компенсаторного пути и, таким образом, повышать общую эффективность. Комбинированные виды терапии, мишенями при которых являются EGFR и с-Met, тестировали в

клинических испытаниях Tarceva<sup>®</sup> (эрлотиниб) в комбинации с одновалентным антителом к с-Met при NSCL (Spigel et al., 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011, Journal of Clinical Oncology: Chicago, IL. p. 7505) и Tarceva (эрлотиниб) в комбинации с ARQ-197, низкомолекулярным ингибитором с-Met (Adjei et al., Oncologist, 16:788-99, 2011). Комбинированные виды терапии или биспецифические молекулы анти-EGFR/с-Met описаны, например, в международной патентной публикации № WO2008/127710, патентной публикации США № US2009/0042906, международной патентной публикации № WO2009/111691, международной патентной публикации № WO2009/126834, международной патентной публикации № WO2010/039248, международной патентной публикации № WO2010/115551.

Современные подходы с использованием низкомолекулярных и высокомолекулярных (например, антитела) терапевтических средств, являющихся антагонистами к сигнальным путям EGFR и/или с-Met, могут быть недостаточно оптимальными вследствие возможного отсутствия низкомолекулярной специфичности и, следовательно, потенциальной побочной активности и ограничивающей дозу токсичности, проявляющейся при использовании низкомолекулярных ингибиторов. Типичные двухвалентные антитела могут приводить к кластеризации связанных с мембраной рецепторов и нежелательной активации нижележащих сигнальных путей, а одновалентные антитела (полуплечи) являются очень сложными и затратными при производстве.

Соответственно, существует потребность в дополнительных моноспецифических и биспецифических ингибиторах EGFR и/или с-Met, которые также имеют дополнительную способность к конъюгации с цитотоксическими лекарственными средствами, таким образом нацеливая эти высокоэффективные соединения на экспрессирующие EGFR/с-met опухолевые клетки и усиливая противоопухолевую активность этих ингибиторов EGFR/с-Met. Хотя конъюгаты антител с лекарственными средствами известны в данной области, традиционный способ присоединения фрагмента лекарственного средства, как правило, приводит к образованию гетерогенной смеси

молекул, в которой фрагменты лекарственного средства присоединены к нескольким сайтам на антителе. Например, цитотоксические лекарственные средства, как правило, конъюгированы с антителами посредством зачастую многочисленных лизиновых остатков на антителе, в результате чего получается гетерогенная смесь конъюгатов антитела с лекарственным средством. В зависимости от условий реакции гетерогенная смесь обычно имеет распределение антител, содержащих от 0 до около 8 присоединенных фрагментов лекарственного средства. Кроме того, в пределах каждой подгруппы конъюгатов с определенным целочисленным соотношением фрагментов лекарственного средства к антителам имеется потенциально гетерогенная смесь, в которой определенный фрагмент лекарственного средства присоединен к различным сайтам на антителе. Аналитические и препаративные способы не позволяют разделить и охарактеризовать типы молекул-конъюгатов антитело-лекарственное средство в гетерогенной смеси, полученной в результате реакции конъюгации. Антитела представляют собой крупные, сложные и структурно разнородные биомолекулы, зачастую содержащие множество реакционных функциональных групп. Их способность к реакции с линкерными реагентами и промежуточными продуктами лекарственное средство-линкер зависит от таких факторов, как pH, концентрация, концентрация солей и соразтворители. Кроме того, многоэтапный процесс конъюгации может быть невозможным вследствие сложностей, связанных с контролем условий реакции и характеризации реагентов и промежуточных продуктов.

Также продемонстрирована химическая конъюгация при помощи остатков цистеина, присутствующих в антителах. Однако введение цистеиновых тиольных групп посредством мутации различных аминокислотных остатков белка в цистеиновые аминокислотные остатки является потенциально проблематичным, в особенности в случае непарных остатков (свободные Cys) или тех, которые являются относительно доступными для реакции или окисления. Непарные остатки Cys на поверхности белка могут образовывать пары и окисляться с образованием межмолекулярных дисульфидных связей и, следовательно, димеров или мультимеров белка.

Образование дисульфидного димера делает новый остаток Cys неспособным к реакции конъюгации с лекарственным средством, лигандом или иной меткой. Более того, если белок в реакции окисления образует внутримолекулярную дисульфидную связь между встроенным Cys и существующим остатком Cys, обе группы Cys становятся недоступными для участия в активном сайте и взаимодействиях. Кроме того, белок может стать неактивным или неспецифичным вследствие неправильного сворачивания или потери третичной структуры (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311: 1–9).

Следовательно, существует потребность в молекуле, способной подвергаться гомогенной химической конъюгации и избегать проблем, характерных для конъюгатов антител.

#### ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, который содержит, по меньшей мере, одну цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 и 93 домена FN3, основанного на SEQ ID NO: 27, и в эквивалентных положениях в родственных доменах FN3. Цистеиновая замена в некотором положении в домене или белке представляет собой замену существующего аминокислотного остатка на остаток цистеина.

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 с, по меньшей мере, одной цистеиновой заменой из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR.

В настоящем изобретении дополнительно предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 с, по меньшей мере, одной цистеиновой заменой из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, который



специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met.

В настоящем изобретении предложены новые положения, в которых можно выполнить цистеиновые замены с получением доменов FN3 с внедренными остатками цистеина. К упомянутым положениям относятся один или более остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 или 93 из SEQ ID NO: 11-114 и/или 122-137.

Один аспект изобретения представляет собой способ получения выделенных доменов FN3 с внедренными остатками цистеина путем мутагенеза нуклеотидной последовательности исходного домена FN3 с заменой одного или более аминокислотных остатков на цистеиновый остаток для кодирования домена FN3 с внедренными остатками цистеина; экспрессии домена FN3 с внедренными остатками цистеина; и выделения домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

Другой аспект изобретения представляет собой химически конъюгированный выделенный домен FN3 с внедренными остатками цистеина, причем домен FN3 ковалентно связан с химическим реагентом, содержащим малеимидный фрагмент.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой химически конъюгированный выделенный домен FN3 с внедренными остатками цистеина, который ингибирует рост линий опухолевых клеток со сверхэкспрессией EGFR и/или с экспрессией с-Met.

В настоящей заявке предложена выделенная биспецифическая молекула FN3 с внедренными остатками цистеина, содержащая первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый и второй домены FN3 содержат цистеиновые замены в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 и 93, которая специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с

рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met.

Другой аспект изобретения представляет собой химически конъюгированную выделенную биспецифическую молекулу с внедренными остатками цистеина, причем биспецифическая молекула ковалентно присоединена к химическому реагенту, содержащему малеимидный фрагмент.

Дополнительный аспект изобретения представляет собой способ получения выделенных биспецифических FN3 с внедренными остатками цистеина путем мутагенеза нуклеотидной последовательности исходной биспецифической молекулы FN3 с заменой одного или более аминокислотных остатков на цистеиновые остатки для кодирования биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина; экспрессии молекулы с внедренными остатками цистеина; и выделения биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1А и 1В. Выравнивание аминокислотной последовательности EGFR-связывающих доменов FN3. В прямоугольники заключены петли BC и FG в остатках 22–28 и 75–86 в SEQ ID NO: 18. Некоторые варианты включают в себя повышающие термическую стабильность замены L17A, N46K и E86I (нумерация остатков соответствует Tencon SEQ ID NO: 1).

Фиг. 2. Структуры цитотоксин/линкер.

Фиг. 3. Ленточное представление кристаллической структуры белка P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27). Конечные положения, определенные как толерантные к цистеиновым заменам, показаны штифтами и окрашены сплошным черным цветом. Связующие петли BC/FG показаны затененным серым цветом.

Фиг. 4. Выравнивание последовательностей каркаса Tencon27 (SEQ ID NO: 99) и библиотеки TCL14 (SEQ ID NO: 100), имеющей рандомизированную альтернативную поверхность C-CD-F-FG. Остатки петли заключены в прямоугольники. Над последовательностями указаны петли и тяжи.

Фиг. 5А и 5В. Выравнивание последовательности с-Met-

связывающих доменов FN3. Петля С и тяж CD, а также петля F и тяж FG заключены в прямоугольники и охватывают остатки 29–43 и 65–81.

Фиг. 6. Показано ингибирование фосфорилирования с-Met в клетках H292, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3, и стимулированных HGF. Наблюдали существенное увеличение эффективности биспецифической к EGFR/с-Met молекулы (ЕСВ1) по сравнению с моноспецифическим с-Met-связывающим доменом FN3 (P114AR5P74-A5, показан на фигуре как элемент А5), используемым отдельно или в комбинации с EGFR-связывающим доменом FN3 (P54AR4-83v2, показан на фигуре как элемент 83v2).

Фиг. 7. Ингибирование фосфорилирования EGFR и с-Met в клетках, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3. В клеточных линиях с высокими уровнями экспрессии EGFR, H292 (А) и H596 (В) анти-EGFR моноспецифические и биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, в равной степени эффективно могут уменьшать фосфорилирование EGFR. В клеточных линиях с низкими уровнями экспрессии EGFR относительно с-Met, H441 (С), биспецифические к EGFR/с-Met молекулы повышают эффективность ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению только с моноспецифическим EGFR-связывающим доменом FN3. В клеточных линиях с низкими уровнями экспрессии с-Met относительно EGFR, H292 (D) и H596 (E), ингибирование фосфорилирования с-Met существенно усиливалось при использовании биспецифической к EGFR/с-Met молекулы по сравнению только с моноспецифическим с-Met-связывающим доменом FN3. В исследовании использовали следующие молекулы: биспецифическая ЕСВ5 (показана на фигуре как элемент 17-A3), моноспецифический EGFR-связывающий домен FN3 P53A1R5-17 (показан на фигуре как элемент 17), биспецифическая к EGFR/с-Met молекула ЕСВ3 (показана на фигуре как элемент 83-H9) и моноспецифический с-Met-связывающий домен FN3 P114AR7P93-H9 (показан на фигуре как элемент H9).

Фиг. 8. Показана фармакодинамическая сигнализация в опухолях, выделенных у мышей, получавших дозы биспецифических к

EGFR/c-Met молекул в течение 6 ч или 72 ч. Все молекулы в значительной степени снижали фосфорилирование c-Met, EGFR и ERK как через 6 ч, так и через 72 ч, причем степень ингибирования зависела от аффинности доменов FN3 к EGFR и/или c-Met. Биспецифические молекулы создавали путем соединения EGFR-связывающего домена FN3 с высокой (показано как элемент 83, p54AR4-83v2) или средней (показано на фигуре как элемент 17v2, P53A1R5-17v2) аффинностью с c-Met-связывающим доменом FN3 с высокой (показано на фигуре как элемент A3, P114AR7P94-A3) или средней (показано на фигуре как элемент A5, P114AR5P74-A5) аффинностью.

Фиг. 9. Накопление в плазме (сверху) и опухоли (снизу) биспецифических к EGFR/c-Met молекул с различными значениями аффинности, связанных с альбумин-связывающим доменом (ABD), показано через 6 ч (слева) и 72 ч (справа) после интраперитонеального (и/п) введения. Через шесть часов после введения накопление в опухоли было максимальным у мышей, получавших биспецифическую молекулу, в которой удерживается EGFR-связывающий домен FN3 (17v2) со средней аффинностью или c-Met-связывающий домен (83v2) с высокой аффинностью. Биспецифические молекулы включали следующие EGFR- или c-Met-связывающие домены FN3 со средней или высокой аффинностью: 83v2-A5-ABD (ЕСВ18; высокая/средняя к EGFR/cMet); 83v2-A3-ABD (ЕСВ38; высокая/высокая); 17v2-A5 (ЕСВ28; средняя/средняя); 17v2-A3-ABD (ЕСВ39; средняя/высокая). 83v2 обозначает p54AR4-83v2; 17v2 обозначает p53A1R5-17v2; A3 обозначает p114AR7P94-A3; A5 обозначает p114AR5P74-A5.

Фиг. 10. Ксенотрансплантаты опухоли H292-HGF имплантировали мышам линии SCID Beige. Когда опухоли достигали среднего объема приблизительно 80 мм<sup>3</sup>, мышам три раза в неделю вводили биспецифические к EGFR/c-Met молекулы (25 мг/кг) или носитель PBS. Все биспецифические молекулы уменьшали рост опухоли, причем ингибирование роста опухоли (TGI) зависело от аффинности молекул к c-Met и EGFR (высокая EGFR - высокая cMet обозначает p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ЕСВ38); высокая EGFR - средняя cMet обозначает p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ЕСВ18); средняя EGFR -

высокая cMet обозначает p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3 (ECB39); средняя EGFR - средняя -cMet обозначает p53A1R5-17-p114AR5P74-A5 (ECB28)).

Фиг. 11. Ксенотрансплантаты опухоли H292-HGF имплантировали мышам линии SCID Beige и проводили обработку разными терапевтическими средствами. Показана противоопухолевая активность терапевтических средств (биспецифическая к EGFR/c-Met молекула обозначает p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3-ABD (ECB38); другие лекарственные препараты представляют собой кризотиниб, эрлотиниб, цетуксимаб и комбинацию кризотиниба и эрлотиниба).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Применяемый в настоящем документе термин «домен фибронектина типа III (FN3)» («домен FN3») относится к домену, часто встречающемуся в белках, включая фибронектины, тенасцин, белки внутриклеточного цитоскелета, цитокиновые рецепторы и прокариотические ферменты (Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci USA 89:8990-8994, 1992; Meinke et al., J Bacteriol 175:1910-1918, 1993; Watanabe et al., J Biol Chem 265:15659-15665, 1990). Примеры доменов FN3 представляют собой 15 разных доменов FN3, присутствующих в тенасцине С человека, 15 разных доменов FN3, присутствующих в фибронектине (FN) человека, и синтетические домены FN3 неприродного происхождения, описанные, например, в патентной публикации США № 2010/0216708. Отдельные домены FN3 называют по номеру домена и названию белка, например, 3-й домен FN3 тенасцина (TN3) или 10-й домен FN3 фибронектина (FN10).

Применяемый в настоящем документе термин «замена», или «замещенный», или «мутация», или «мутированный» относится к изменению, делеции или вставке одной или более аминокислот или нуклеотидов в последовательности полипептида или полинуклеотида для создания варианта этой последовательности.

Применяемый в настоящем документе термин «рандомизация», или «рандомизированный», или «диверсифицированный», или «диверсификация» относится к выполнению, по меньшей мере, одной замены, вставки или делеции в последовательности полинуклеотида или полипептида.

Применяемый в настоящем документе термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например, заменами, вставками или делециями.

Применяемый в настоящем документе термин «специфически связывается» или «специфическое связывание» относится к способности домена FN3 изобретения связываться с заданным антигеном с константой диссоциации ( $K_D$ )  $1 \times 10^{-6}$  М или менее, например,  $1 \times 10^{-7}$  М или менее,  $1 \times 10^{-8}$  М или менее,  $1 \times 10^{-9}$  М или менее,  $1 \times 10^{-10}$  М или менее,  $1 \times 10^{-11}$  М или менее,  $1 \times 10^{-12}$  М или менее или  $1 \times 10^{-13}$  М или менее. Как правило, домен FN3 изобретения связывается с заданным антигеном (т. е. EGFR или c-Met) с  $K_D$ , которая, по меньшей мере, в десять раз меньше его  $K_D$  для неспецифического антигена (например, BSA или казеин), что измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, прибора Proteon (BioRad). Таким образом, биспецифическая к EGFR/c-Met молекула изобретения, содержащая домен FN3, специфически связывается как с EGFR, так и с c-Met с аффинностью связывания ( $K_D$ ), по меньшей мере,  $1 \times 10^{-6}$  М или менее как для EGFR, так и для c-Met. Однако выделенный домен FN3 изобретения, который специфически связывается с заданным антигеном, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, с таким же заданным антигеном другого вида (гомологи).

Термин «библиотека» относится к группе вариантов. Библиотека может быть образована из вариантов полипептида или полинуклеотида.

Применяемый в настоящем документе термин «стабильность» относится к способности молекулы сохранять свернутое состояние в физиологических условиях, так чтобы сохранять, по меньшей мере, одну из своих обычных функциональных возможностей, например, способность связываться с заданным антигеном, таким как EGFR или c-Met.

Применяемый в настоящем документе термин «рецептор эпидермального фактора роста» или «EGFR» относится к EGFR

человека (также известному как HER-1 или Erb-B1 (Ullrich et al., Nature 309:418–425, 1984) с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 73, и по номеру доступа NP\_005219 в GenBank, а также ее вариантам природного происхождения. К таким вариантам относятся хорошо известный вариант EGFRvIII и другие варианты альтернативного сплайсинга (например, обозначенные в SwissProt номерами доступа P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4), варианты GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962 и PRO-988 (Livingston et al., NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478).

Применяемый в настоящем документе термин «лиганд EGFR» включает в себя все (например, физиологические) лиганды для EGFR, включая EGF, TGF- $\alpha$ , гепарин-связывающий EGF (HB-EGF), амфирегулин (AR) и эпирегулин (EPI).

Применяемый в настоящем документе термин «эпидермальный фактор роста» (EGF) относится к хорошо известному EGF человека из 53 аминокислот с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 74.

Применяемый в настоящем документе термин «рецептор фактора роста гепатоцитов» или «с-Met» относится к с-Met человека с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101, или по номеру доступа в GenBank NP\_001120972, и ее природным вариантам.

Применяемый в настоящем документе термин «фактор роста гепатоцитов» (HGF) относится к хорошо известному HGF человека с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 102, которая расщепляется с образованием димера альфа- и бета-цепи, связанной дисульфидной связью.

Применяемые в настоящем документе на взаимозаменяемой основе термины «блокирует связывание» или «ингибирует связывание» относятся к способности доменов FN3 изобретения биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домены FN3, блокировать или ингибировать связывание лиганда EGFR, например, EGF с EGFR и/или HGF с с-Met, и включает в себя как частичное, так и полное блокирование/ингибирование.

Блокирование/ингибирование лиганда EGFR, например, EGF с EGFR и/или HGF с c-Met, посредством домена FN3 или биспецифической к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащей домен FN3, частично или полностью снижает нормальный уровень сигнализации EGFR и/или сигнализации c-Met по сравнению со связыванием лиганда EGFR с EGFR и/или связыванием HGF с c-Met без блокирования или ингибирования. Домен FN3 или биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3, «блокирует связывание» лиганда EGFR, например, EGF с EGFR и/или HGF с c-Met, когда ингибирование составляет, по меньшей мере, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Ингибирование связывания можно измерить при помощи хорошо известных способов, например, путем измерения ингибирования связывания биотинилированного EGF на экспрессирующих EGFR клетках A431, которые подвергали воздействию домена FN3 или биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, с помощью FACS и с применением способов, описанных в настоящем документе, или путем измерения связывания биотинилированного HGF с внеклеточным доменом c-Met с применением хорошо известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Термин «сигнализация EGFR» относится к трансдукции сигнала, индуцированной связыванием лиганда EGFR с EGFR, что приводит к аутофосфорилированию, по меньшей мере, одного тирозинового остатка в EGFR. Пример лиганда EGFR представляет собой EGF.

Применяемый в настоящем документе термин «нейтрализует сигнализацию EGFR» относится к способности домена FN3 изобретения ингибировать EGFR-сигнализацию, индуцируемую лигандом EGFR, таким как EGF, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Термин «сигнализация c-Met» относится к трансдукции сигнала, индуцированной связыванием HGF с c-Met, что приводит к аутофосфорилированию, по меньшей мере, одного тирозинового остатка в c-Met. Как правило, по меньшей мере, один тирозиновый остаток в положениях 1230, 1234 или 1235 после связывания HGF



подвергается аутофосфорилированию.

Применяемый в настоящем документе термин «нейтрализует сигнализацию c-Met» относится к способности домена FN3 изобретения ингибировать сигнализацию c-Met, индуцируемую HGF, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Применяемые в настоящем документе на взаимозаменяемой основе термины «сверхэкспрессия», «сверхэкспрессируемый» и «сверхэкспрессирующий» относятся к раковой или злокачественной клетке, которая имеет на поверхности повышенные до определенной степени уровни EGFR и/или c-Met по сравнению с нормальной клеткой из ткани того же типа. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию EGFR и/или c-Met можно измерить, применяя хорошо известные анализы, например, ИФА, иммунофлуоресценцию, проточную цитометрию или радиоиммунный анализ на живых или лизированных клетках. Альтернативно или дополнительно уровни молекул нуклеиновых кислот, кодирующих EGFR и/или c-Met, можно измерить в клетке, например, применяя флуоресцентную гибридизацию *in situ*, саузэрн-блоттинг или ПЦР. Сверхэкспрессия EGFR и/или c-Met означает, что уровень EGFR и/или c-Met на поверхности клетки, по меньшей мере, в 1,5 раза выше по сравнению с уровнем нормальной клетки.

Применяемый в настоящем документе термин «Tencon» относится к синтетическому домену фибронектина типа III (FN3) с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 и описанной в патентной публикации США № US2010/0216708.

Применяемый в настоящем документе термин «раковая клетка» или «опухолевая клетка» относится к раковой, предраковой или преобразованной клетке либо *in vivo*, либо *ex vivo* и в культуре клеток, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения, которые не обязательно затрагивают получение нового генетического материала. Хотя преобразование может быть вызвано инфицированием преобразующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощением

экзогенной нуклеиновой кислоты, оно также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Преобразование/рак проявляется, например, в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркеров, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли или ее подавлении у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

Термин «вектор» обозначает полинуклеотид, способный к воспроизведению внутри биологической системы, или который можно переместить между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, способствующие воспроизведению или сохранению этих полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать в себя клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, в которых используются биологические компоненты, способные к воспроизведению вектора. Полинуклеотид, который является вектором, может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин «вектор экспрессии» обозначает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для прямой трансляции полипептида, закодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в векторе экспрессии.

Термин «полинуклеотид» обозначает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечные и одноцепочечные молекулы ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

Термин «полипептид», или «белок», обозначает молекулу, которая содержит, по меньшей мере, два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее чем приблизительно 50 аминокислот,

могут называться «пептидами».

Применяемый в настоящем документе термин «биспецифическая к EGFR/с-Met молекула» или «биспецифическая к EGFR/с-Met молекула, содержащая домен FN3» относится к молекуле, содержащей EGFR-связывающий домен FN3 и отдельный с-Met-связывающий домен FN3, которые ковалентно связаны либо напрямую, либо посредством линкера. Пример биспецифической к EGFR/с-Met молекулы содержит первый домен FN3, специфически связывающий EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающий с-Met.

Применяемый в настоящем документе термин «валентный» относится к наличию в молекуле установленного числа сайтов связывания, специфичных для антигена. Таким образом, термины «одновалентный», «двухвалентный», «четырёхвалентный» и «шестивалентный» относятся к наличию в молекуле соответственно одного, двух, четырех и шести сайтов связывания, специфичных для антигена.

Применяемый в настоящем документе термин «смесь» относится к образцу или препарату из двух или более доменов FN3, не связанных вместе ковалентной связью. Смесь может состоять из двух или более идентичных доменов FN3 или разных доменов FN3.

#### **Композиции настоящего изобретения**

В настоящем изобретении предложены моноспецифические и биспецифические EGFR- и/или с-Met-связывающие молекулы, содержащие домены FN3, с внедренными остатками цистеина, а также способы их получения и применения.

#### **Моноспецифические EGFR-связывающие молекулы**

В настоящем изобретении предложены домены фибронектина типа III (FN3), которые специфически связываются с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокируют связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR и, следовательно, могут широко применяться в терапии и диагностике. В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие домены FN3 изобретения, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Домены FN3 изобретения связываются с EGFR с высокой аффинностью, ингибируют сигнализацию EGFR и могут обеспечивать

благоприятный эффект в плане специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами EGFR и иметь улучшенное проникание в ткани по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR.

Домены FN3 изобретения могут блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М в конкурентном анализе с использованием клеток A431 и обнаружения величины флуоресценции от связанного биотинилированного EGF с использованием конъюгата стрептавидин-фикоэритрин при 600 нм в клетках A431, инкубированных с доменами FN3 изобретения или без них. Примеры доменов FN3 могут блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от около  $1 \times 10^{-9}$  М до около  $1 \times 10^{-7}$  М, например, EGFR-связывающие домены FN3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18–29, 107–110 или 122–137. Домены FN3 изобретения могут блокировать связывание EGF с EGFR, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению со связыванием EGF с EGFR в отсутствие доменов FN3 изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Домен FN3 изобретения может ингибировать сигнализацию EGFR, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем сигнализации в отсутствие доменов FN3 изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Связывание лиганда, например, EGF с EGFR, стимулирует

димеризацию рецепторов, аутофосфорилирование, активацию внутреннего рецептора, цитоплазматического тирозинкиназного домена и инициирование множества сигнальных путей трансдукции и трансактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла или деления. Ингибирование сигнализации EGFR может приводить к ингибированию одного или более расположенных ниже сигнальных путей EGFR, и, следовательно, нейтрализация EGFR может оказывать различные эффекты, включая ингибирование пролиферации и дифференцировки клеток, ангиогенез, подвижность клеток и метастазирование.

Сигнализацию EGFR можно измерять различными известными способами, например, путем измерения аутофосфорилирования рецептора по любому из тирозиновых остатков Y1068, Y1148 и Y1173 (Downward *et al.*, Nature 311:483–5, 1984) и/или фосфорилирования природных или синтетических субстратов. Фосфорилирование можно обнаруживать хорошо известными способами, такими как анализ ИФА или вестерн-блоттинг, с применением антитела, специфического к фосфотирозину. Примеры анализа можно найти в Panek *et al.*, J Pharmacol Exp Thera 283:1433–44, 1997 и Batley *et al.*, Life Sci 62:143–50, 1998.

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М, например, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF.

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC<sub>50</sub> от около  $1,8 \times 10^{-8}$  М до около  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF. Такие примеры доменов FN3 представляют собой домены с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137.

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения связывает человеческий EGFR с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, например, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-13}$  М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса или методом кинетического исключения (Kinexa), известным специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 изобретения связывается с человеческим EGFR с  $K_D$  в диапазоне от около  $2 \times 10^{-10}$  М до около  $1 \times 10^{-8}$  М. Аффинность домена FN3 к EGFR можно определить экспериментально с применением любого подходящего способа (см., например, Berzofsky, et al., *Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); а также способы, описанные в настоящем документе). Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре домен FN3 - антиген может изменяться при измерении в разных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) предпочтительно выполняют с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

Примеры доменов FN3 изобретения, которые связываются с EGFR, включают в себя домены FN3 с SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137.

В одном варианте осуществления домен FN3, который специфически связывается с EGFR, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 87% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

В одном варианте осуществления домен FN3, который специфически связывается с EGFR, содержит:

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX9RGL (SEQ

ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDVML (SEQ ID NO: 180), где X<sub>9</sub> представляет собой M или I; и

петлю BC, содержащую последовательность X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 181); где:

- X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;
- X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;
- X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;
- X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;
- X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;
- X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;
- X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D; и
- X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L.

Домены FN3 изобретения, которые специфически связываются с EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, могут содержать в качестве структурного элемента петлю FG, которая содержит последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDVML (SEQ ID NO: 180), где X<sub>9</sub> представляет собой M или I. Такие домены FN3 могут дополнительно содержать петлю BC длиной 8 или 9 аминокислот, которая описана последовательностью X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 181), и могут ингибировать аутофосфорилирование EGFR со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  M и со значением IC<sub>50</sub> в диапазоне от около  $1,8 \times 10^{-8}$  M до около  $2,5 \times 10^{-6}$  M при измерении в клетках A431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

Домены FN3 изобретения, которые специфически связываются с EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, дополнительно содержат последовательность:

L PAPK N L V V S E V T E D S L R L S W X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P  
G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V H N V Y K D T N X<sub>9</sub> R G L P L S A E F T T (SEQ ID NO: 182)  
или последовательность:

L PAPK N L V V S E V T E D S L R L S W X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P  
G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V L G S Y V F E H D V M L P L S A E F T T (SEQ ID NO: 183),

где:

- X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;
- X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;
- X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;

X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;

X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;

X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D;

X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L; и

X<sub>9</sub> представляет собой M или I.

EGFR-связывающие домены FN3 можно создать и протестировать на способность ингибировать аутофосфорилирование EGFR с использованием известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с EGFR, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18–29, 107–110 или 122–137.

В некоторых вариантах осуществления EGFR-связывающие домены FN3 содержат инициатор-метионин (Met), связанный с N-концом, или цистеин (Cys), связанный с C-концом конкретного домена FN3, например, для облегчения экспрессии и/или конъюгации с молекулами, увеличивающими период полужизни.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с EGFR и блокирует связывание EGF с EGFR, причем домен FN3 выделен из библиотеки, разработанной на основе последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

#### **Моноспецифические с-Met-связывающие молекулы**

В настоящем изобретении предложены домены фибронектина типа III (FN3), которые специфически связываются с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокируют связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met и, следовательно, могут широко применяться в терапии и диагностике. В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие домены FN3 изобретения, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Домены FN3 изобретения связываются с с-Met с высокой аффинностью, ингибируя сигнализацию с-Met, могут обеспечивать



благоприятный эффект в отношении специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами с-Met и иметь улучшенное проникновение в ткани по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител. Домены FN3 изобретения являются одновалентными, и, следовательно, предотвращается нежелательная кластеризация и активация рецептора, которая возможна при использовании других двухвалентных молекул.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met.

Домены FN3 изобретения могут блокировать связывание HGF с с-Met со значением  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М в анализе на обнаружение ингибирования связывания биотинилированного HGF со слитным белком с-Met-Fc в присутствии доменов FN3 изобретения. Примеры доменов FN3 могут блокировать связывание HGF с с-Met со значением  $IC_{50}$  от около  $2 \times 10^{-10}$  М до около  $6 \times 10^{-8}$ . Домены FN3 изобретения могут блокировать связывание HGF с с-Met, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению со связыванием HGF с с-Met в отсутствие доменов FN3 изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Домен FN3 изобретения может ингибировать сигнализацию с-Met, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем сигнализации в отсутствие доменов FN3 изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Связывание лиганда, например, HGF с с-Met, стимулирует димеризацию рецептора, аутофосфорилирование, активацию внутреннего рецептора, цитоплазматического тирозинкиназного

домена и инициирование множества сигнальных путей трансдукции и трансактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла или деления. Ингибирование сигнализации с-Met может приводить к ингибированию в одном или более расположенных ниже сигнальных путях передачи с-Met, и, следовательно, нейтрализация с-Met может оказывать различные эффекты, включая ингибирование пролиферации и дифференцировки клеток, ангиогенез, подвижность клеток и метастазирование.

Сигнализацию с-Met можно измерять различными известными способами, например, путем измерения аутофосфорилирования рецептора, по меньшей мере, одного из тирозиновых остатков Y1230, Y1234 или I1235 и/или фосфорилирования природных или синтетических субстратов. Фосфорилирование можно обнаруживать, например, при помощи антитела, специфического к фосфотирозину, в анализе методом ИФА или вестерн-блоттинга. Некоторые анализы активности тирозинкиназ (Panek *et al.*, *J Pharmacol Exp Thera* 283:1433-44, 1997; Batley *et al.*, *Life Sci* 62:143-50, 1998).

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по остатку с-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М при измерении в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF.

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении Y1349 со значением IC<sub>50</sub> в диапазоне от около  $4 \times 10^{-9}$  М до около  $1 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF.

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения связывает человеческий с-Met с константой диссоциации (K<sub>D</sub>), которая равна или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М,  $1 \times 10^{-8}$  М,

$1 \times 10^{-9}$  М,  $1 \times 10^{-10}$  М,  $1 \times 10^{-11}$  М,  $1 \times 10^{-12}$  М,  $1 \times 10^{-13}$  М,  $1 \times 10^{-14}$  М или  $1 \times 10^{-15}$  М в соответствии с данными поверхностного плазмонного резонанса или метода Kineха, известного специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 изобретения связывается с человеческим с-Met с  $K_D$  от около  $3 \times 10^{-10}$  М до около  $5 \times 10^{-8}$  М. Аффинность домена FN3 к с-Met можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа (см., например, Berzofsky, et al., *Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); а также способы, описанные в настоящем документе). Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре домен FN3 - антиген может изменяться при измерении в разных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) предпочтительно выполняют с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

Примеры доменов FN3 изобретения, которые связываются с с-Met, включают в себя домены FN3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32-49 или 111-114.

В одном варианте осуществления домен FN3, который специфически связывается с с-Met, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 83% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

В одном варианте осуществления домен FN3, который специфически связывается с с-Met, содержит:

тяж С и петлю CD, содержащую последовательность DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>EX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub> (SEQ ID NO: 184), где:

X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V;

X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;

X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;

X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;

X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;

X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K; и

X<sub>16</sub> представляет собой E или D; и

тяж F и петлю FG, содержащую последовательность TEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>V KGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub> (SEQ ID NO: 185), где:

X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;

X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;

X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;

X<sub>20</sub> представляет собой G или S;

X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;

X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L; и

X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

Домены FN3 изобретения, которые специфически связываются с с-Met и ингибируют аутофосфорилирование с-Met, дополнительно содержат последовательность:

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>  
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>VKGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub>PLSAEFTT (SEQ ID  
NO: 186),

где:

X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V; и

X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;

X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;

X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;

X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;

X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K;

X<sub>16</sub> представляет собой E или D;

X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;

X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;

X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;

X<sub>20</sub> представляет собой G или S;

X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;

X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L; и

X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с с-Met, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 32-49 или 111-114.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с с-Met и блокирует связывание HGF с с-Met, причем домен FN3 выделен из библиотеки, разработанной на основе последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

**Выделение EGFR- или с-Met-связывающих доменов FN3 из библиотеки, основанной на последовательности Tenson**

Tenson (SEQ ID NO: 1) представляет собой домен фибронектина типа III (FN3) неприродного происхождения, разработанный на основе консенсусной последовательности пятнадцати доменов FN3 тенасцина-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; патентная публикация США № 2010/0216708). Кристаллическая структура Tenson демонстрирует шесть открытых на поверхности петель, соединяющих семь бета-тяжей, характерных для доменов FN3, причем бета-тяжи обозначены как А, В, С, D, Е, F и G, а петли обозначены как АВ, ВС, CD, DE, EF и FG (Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992; патент США № 6,673,901). Эти петли или выбранные остатки в пределах каждой петли можно рандомизировать для конструирования библиотек доменов фибронектина типа III (FN3), которые можно применять для выбора новых молекул, связывающихся с EGFR. В таблице 1 представлены положения и последовательности каждой петли и бета-тяжа в Tenson (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, библиотека, разработанная на основе последовательности Tenson, может иметь рандомизированную петлю FG или рандомизированные петли ВС и FG, например, библиотеки TCL1 или TCL2, как описано ниже. Петля ВС Tenson имеет длину 7 аминокислот. Таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tenson с диверсификацией по петле ВС можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Петля FG Tenson имеет длину 7 аминокислот, таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tenson с диверсификацией по петле FG можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Дополнительного разнообразия в петлях библиотек Tenson можно

достичь путем вставки и/или делеций остатков в петлях. Например, петли FG и/или BC можно расширить на 1–22 аминокислоты или уменьшить на 1–3 аминокислоты. Петля FG в Tencon имеет длину 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител имеет длину в диапазоне от 4 до 28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия петлю FG можно диверсифицировать в последовательности, а также по длине для соответствия диапазону длины CDR3 антитела из 4–28 остатков. Например, петлю FG можно дополнительно диверсифицировать по длине, удлинив ее на дополнительные 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

Библиотека, разработанная на основе последовательности Tencon, также может иметь альтернативные рандомизированные поверхности, образованные сбоку от домена FN3 и содержащие два или более бета-тяжей и, по меньшей мере, одну петлю. Одна такая альтернативная поверхность образована аминокислотами в бета-тяжах C и F и в петлях CD и FG (поверхность C-CD-F-FG). Разработка библиотеки, основанной на альтернативной поверхности C-CD-F-FG в Tencon, показана на Фиг. 4, и подробное создание таких библиотек описано в заявке на патент США № 13/852,930.

Библиотеки, разработанные на основе последовательности Tencon, также включают в себя библиотеки, разработанные на основе вариантов Tencon, таких как варианты Tencon, имеющие замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1), и такие варианты демонстрируют повышенную термическую стабильность. Примеры вариантов Tencon описаны в патентной публикации США № 2011/0274623 и включают в себя Tencon27 (SEQ ID NO: 99), имеющую замены E11R, L17A, N46V, E86I по сравнению с Tencon с SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Домен FN3	Tencon (SEQ ID NO: 1)
A тяж	1–12

AB петля	13–16
B тяж	17–21
BC петля	22–28
C тяж	29–37
CD петля	38–43
D тяж	44–50
DE петля	51–54
E тяж	55–59
EF петля	60–64
F тяж	65–74
FG петля	75–81
G тяж	82–89

Библиотеки на основе Tenson и другой последовательности FN3 можно рандомизировать по выбранным положениям остатков с использованием случайного или определенного набора аминокислот. Например, варианты библиотеки, имеющие случайные замены, можно создать с использованием кодонов NNK, которые кодируют все 20 аминокислот природного происхождения. В других схемах диверсификации можно применять кодоны DVK для кодирования аминокислот Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys. Альтернативно для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов можно применять кодоны NNS. Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в диверсифицируемых положениях можно синтезировать, например, с использованием технологии Slonomics® (<http://www.sloming.com>). В данной технологии применяют библиотеку предварительно приготовленных двухцепочечных триплетов, которые выступают в качестве универсальных строительных блоков, достаточных для тысяч процессов синтеза генов. В библиотеке триплетов представлены все возможные комбинации последовательностей, необходимые для построения любой желаемой молекулы ДНК. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

Домены FN3 изобретения, специфически связывающие EGFR или с-

Met, можно выделить путем получения библиотеки FN3, такой как библиотека Tencon, с использованием *cis*-дисплея для лигирования фрагментов ДНК, кодирующих каркасные белки, с фрагментом ДНК, кодирующим *RepA*, для создания пула комплексов белок - ДНК, образованных после трансляции *in vitro*, причем каждый белок стабильно связан с кодирующей его ДНК (патент США № 7,842,476; Odegrip *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2806-2810, 2004), и анализа библиотеки на специфическое связывание с EGFR и/или с-Met любым способом, известным в данной области или описанным в примере. Примеры хорошо известных способов, которые можно применять, представляют собой ИФА, иммуноанализ сэндвич-типа и конкурентный и неконкурентный анализы (см., например, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Дополнительно характеризуют идентифицированные домены FN3, специфически связывающие EGFR или с-Met, по способности блокировать связывание лиганда EGFR, например, EGF, с EGFR, или связывание HGF с с-Met, а также по способности ингибировать сигнализацию EGFR и/или с-Met с применением способов, описанных в настоящем документе.

Домены FN3 изобретения, специфически связывающие EGFR или с-Met, можно создавать, применяя любой домен FN3 в качестве матрицы для создания библиотеки и проведения скрининга в библиотеке молекул, специфически связывающих EGFR или с-Met, с применением предложенных в ней способов. Примеры подходящих для применения доменов FN3 включают в себя 3-й домен FN3 тенасцина С (TN3) (SEQ ID NO: 75), Fibcon (SEQ ID NO: 76) и 10-й домен FN3 фибронектина (FN10) (SEQ ID NO: 77). Применяют стандартные методики клонирования и экспрессии для клонирования библиотек в вектор или синтеза кассет библиотеки с двухцепочечной кДНК, чтобы экспрессировать библиотеки или транслировать их *in vitro*. Например, можно использовать рибосомный дисплей (Hanes and Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937-4942, 1997), мРНК-дисплей (Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12297-12302, 1997) или другие бесклеточные системы (патент США № 5,643,768). Библиотеки вариантов домена FN3 можно



экспрессировать как слитные белки, отображающиеся на поверхности, например, любого подходящего бактериофага. Хорошо известны способы отображения слитных полипептидов на поверхности бактериофага (патентная публикация США № 2011/0118144; международная патентная публикация № WO2009/085462; патент США № 6,969,108; патент США № 6,172,197; патент США № 5,223,409; патент США № 6,582,915; патент США № 6,472,147).

Домены FN3 изобретения, специфически связывающие EGFR или c-Met, можно модифицировать для улучшения их свойств, например, улучшения термической стабильности и обратимости термического свертывания и развертывания. Для повышения эффективной термической стабильности белков и ферментов использовали ряд способов, включая рациональную конфигурацию, основанную на сравнении с термостабильными последовательностями с высокой степенью сходства, конфигурацию стабилизирующих дисульфидных мостиков, мутации для повышения склонности к образованию альфа-спирали, конструирование солевых мостиков, изменение поверхностного заряда белка, направленную эволюцию и композицию консенсусных последовательностей (Lehmann and Wyss, *Curr Opin Biotechnol*, 12, 371–375, 2001). Высокая термическая стабильность может повышать выход экспрессируемого белка, растворимость или активность, снижать иммуногенность и минимизировать необходимость в холодной линии при производстве. Остатки, в которые можно ввести замены для повышения термической стабильности Tenson (SEQ ID NO: 1), представляют собой положения остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86, как описано в патентной публикации США № 2011/0274623. Замены, соответствующие этим остаткам, можно вводить в домены FN3 или в биспецифические молекулы изобретения, содержащие домены FN3.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с EGFR и блокирует связывание EGF с EGFR, который содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137, и дополнительно содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37,

46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1).

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с с-Met и блокирует связывание HGF с с-Met, который содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49, 111-114, и дополнительно содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1).

Примеры замен представляют собой замены E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y и E86I (нумерация соответствует SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления домены FN3 изобретения содержат замены, соответствующие заменам L17A, N46V и E86I в Tencon (SEQ ID NO: 1).

Домены FN3, специфически связывающие EGFR (Фиг. 1), имеют удлиненную петлю FG по сравнению с Tencon (SEQ ID NO: 1). Следовательно, остатки, соответствующие остаткам 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1), представляют собой остатки 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 91 в доменах FN3 EGFR, показанных на Фиг. 1A и 1B, кроме домена FN3 с SEQ ID NO: 24, в котором соответствующие остатки представляют собой остатки 11, 14, 17, 38, 74 и 92 вследствие вставки одной аминокислоты в петлю BC.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с EGFR и блокирует связывание EGF с EGFR, который содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137, и необязательно имеет замены, соответствующие заменам L17A, N46V и E86I в Tencon (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления изобретения предложен выделенный домен FN3, который специфически связывается с с-Met и блокирует связывание HGF с с-Met, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49 или 111-114, и необязательно имеет замены, соответствующие заменам L17A, N46V и E86I в Tencon (SEQ ID NO: 1).

Измерение стабильности белка и лабильности белка можно рассматривать как один или разные аспекты целостности белка.

Белки чувствительны, или «лабильны», при денатурации, вызванной нагревом, ультрафиолетовым или ионизирующим излучением, изменениями осмолярности окружающей среды и pH при нахождении в жидком растворе, механическим сдвиговым усилием, вызванным фильтрованием через поры малого размера, ультрафиолетовым излучением, ионизирующим излучением, таким как гамма-облучение, химической или термической дегидратацией или любым другим воздействием или усилием, которые могут привести к разрушению структуры белка. Стабильность молекулы можно определить с применением стандартных способов. Например, стабильность молекулы можно определить путем измерения температуры термического плавления (ТМ) – температуры в градусах Цельсия (°C), при которой половина молекул разворачивается, с применением стандартных способов. Как правило, чем выше ТМ, тем более стабильной является молекула. Помимо нагрева способность белка сохранять конкретную трехмерную структуру также может изменяться в зависимости от химической среды.

В одном варианте осуществления домены FN3 изобретения, связывающие EGFR или c-Met, демонстрируют стабильность, повышенную, по меньшей мере, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более по сравнению с таким же доменом до конструирования, что измеряется по повышению ТМ.

Химическую денатурацию аналогичным образом можно измерить различными способами. К химическим денатурирующим соединениям относятся гидрохлорид гуанидина, тиоцианат гуанидина, карбамид, ацетон, органические растворители (диметилформамид, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия); восстановители (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитротииобензол и гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные детергенты, кислоты (например, соляная кислота (HCl), уксусная кислота (CH<sub>3</sub>COOH), галогенуксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды) и специализированные денатурирующие соединения. Количественное определение степени денатурации может

быть основано на потере функционального свойства, такого как способность связываться с молекулой-мишенью, или на физико-химических свойствах, таких как склонность к агрегации, открытие доступа к ранее недоступным растворителю остаткам, или на разрушении или образовании дисульфидных связей.

В одном варианте осуществления домены FN3 изобретения, связывающие EGFR или c-Met, демонстрируют стабильность, повышенную, по меньшей мере, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более по сравнению с таким же каркасом до конструирования, что измеряется путем применения гидрохлорида гуанидина в качестве химического денатурирующего вещества. Повышение стабильности можно измерять в зависимости от снижения флуоресценции триптофана при обработке повышающимися концентрациями гидрохлорида гуанидина с применением хорошо известных способов.

Домены FN3 изобретения можно создать в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, как средство повышения валентности и, следовательно, avidности к связыванию молекулы-мишени или создания би- или мультиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более разных молекулы-мишени. Димеры и мультимеры можно создать путем связывания моноспецифических, би- или мультиспецифических белковых каркасов, например, путем включения аминокислотного линкера, например, линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают в себя (GS)<sub>2</sub>, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 79), (AP)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 80), (AP)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 81), (AP)<sub>10</sub> (SEQ ID NO: 82), (AP)<sub>20</sub> (SEQ ID NO: 83), A(EAAAK)<sub>5</sub>AAA (SEQ ID NO: 84), линкеры. Димеры и мультимеры могут соединяться друг с другом в направлении от N-конца к C-концу. Применение природных и искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell *et al.*, *J Biol Chem* 264, 5260-5268, 1989; Alfthan *et al.*, *Protein Eng.* 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996; патент США №

5,856,456).

### **Биспецифические молекулы, связывающие EGFR и c-Met**

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домены FN3, могут обеспечивать благоприятный эффект в плане специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами EGFR и иметь улучшенное проникание в ткани по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител. Настоящее изобретение, по меньшей мере, частично основано на неожиданном открытии того, что биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домены FN3, обеспечивают существенно повышенный синергический ингибиторный эффект по сравнению со смесью EGFR- и c-Met-связывающих доменов FN3. Молекулы можно настроить на конкретную аффинность в отношении как EGFR, так и c-Met для максимального проникновения в опухоль и удержания в ней.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенную биспецифическую молекулу, содержащую домен FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домены FN3, можно создать путем ковалентного связывания любого EGFR-связывающего домена FN3 и любого c-Met-связывающего домена FN3 напрямую или посредством линкера. Следовательно, первый домен FN3 биспецифической молекулы может иметь характеристики, описанные выше применительно к EGFR-связывающим доменам FN3, а второй домен FN3 биспецифической молекулы может иметь характеристики, описанные выше применительно к c-Met-связывающим доменам FN3.

В одном варианте осуществления первый домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3,

ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $1,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках NCI-N441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF.

В другом варианте осуществления первый домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от около  $1,8 \times 10^{-8}$  М до около  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от около  $4 \times 10^{-9}$  М до около  $1,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках NCI-N441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF.

В другом варианте осуществления первый домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, связывается с человеческим EGFR с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, а второй домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, связывается с человеческим c-Met с  $K_D$  менее чем приблизительно  $5 \times 10^{-8}$  М.

В биспецифической молекуле, связывающей как EGFR, так и c-Met, первый домен FN3 связывается с человеческим EGFR с  $K_D$  в диапазоне от около  $2 \times 10^{-10}$  до около  $1 \times 10^{-8}$  М, а второй домен FN3 связывается с человеческим c-Met с  $K_D$  в диапазоне от около  $3 \times 10^{-10}$  до около  $5 \times 10^{-8}$  М.

Аффинность биспецифической к EGFR/c-Met молекулы по отношению к EGFR и c-Met можно определить так, как описано выше для моноспецифических молекул.

Первый домен FN3 в биспецифической к EGFR/c-Met молекуле

изобретения может блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от около  $1 \times 10^{-9}$  М до около  $1,5 \times 10^{-7}$  М в анализе с использованием клеток A431 и детекции величины флуоресценции от связанного биотинилированного EGF с использованием конъюгата стрептавидин-фикоэритрин при длине волны 600 нм в клетках A431, инкубированных с первым доменом FN3 или без него. Первый домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы изобретения может блокировать связывание EGF с EGFR, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению со связыванием EGF с EGFR в отсутствие первых доменов FN3 при использовании одинаковых условий анализа.

Второй домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы изобретения может блокировать связывание HGF с c-Met со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от около  $2 \times 10^{-10}$  М до около  $6 \times 10^{-8}$  М в анализе на детекцию ингибирования связывания биотинилированного HGF со слитным белком c-Met-Fc в присутствии второго домена FN3. Второй домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы может блокировать связывание HGF с c-Met, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению со связыванием HGF с c-Met в отсутствие второго домена FN3 при использовании одинаковых условий анализа.

Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула изобретения может ингибировать сигнализацию EGFR и/или c-Met, по меньшей мере, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем сигнализации в отсутствие биспецифической к EGFR/c-Met молекулы изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Сигнализацию EGFR и c-Met можно измерить с применением различных хорошо известных способов, описанных выше применительно к моноспецифическим молекулам.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие первый домен FN3, специфически связывающий EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающий c-Met, обеспечивают

значительно более высокое синергичное ингибирование сигнализации EGFR и c-Met и пролиферации опухолевых клеток по сравнению с синергичным ингибированием, наблюдаемым в случае смеси первого и второго доменов FN3. Синергичное ингибирование можно оценивать, например, путем измерения ингибирования фосфорилирования ERK посредством биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, и посредством смеси двух моноспецифических молекул, одна из которых связывается с EGFR, а другая - с c-Met. Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением  $IC_{50}$ , которое, по меньшей мере, приблизительно в 100 раз меньше, например, по меньшей мере, в 500, 1000, 5000 или 10 000 раз меньше по сравнению со значением  $IC_{50}$  для смеси двух моноспецифических доменов FN3, что указывает на, по меньшей мере, 100-кратно более высокую эффективность биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, по сравнению со смесью двух моноспецифических доменов FN3. Примеры биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением  $IC_{50}$  около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее. Фосфорилирование ERK можно измерять с применением стандартных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула изобретения, содержащая домен FN3, может ингибировать пролиферацию клеток H292 со значением  $IC_{50}$ , которое, по меньшей мере, в 30 раз меньше значения  $IC_{50}$  ингибирования роста клеток H292 смесью первого домена FN3 и второго домена FN3, причем пролиферация клеток индуцируется средой, содержащей 10% FBS с добавлением 7,5 нг/мл HGF. Биспецифическая молекула изобретения может ингибировать пролиферацию опухолевых клеток со значением  $IC_{50}$ , которое в около 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или около 1000 раз меньше по сравнению со значением  $IC_{50}$  ингибирования пролиферации опухолевых клеток смесью первого домена FN3 и второго домена FN3. Ингибирование пролиферации опухолевых клеток можно измерять с применением стандартных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой



биспецифическую молекулу, содержащую домен FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met, причем

первый домен FN3 содержит:

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180), где X<sub>9</sub> представляет собой M или I; и

петлю BC, содержащую последовательность X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 181), причем:

X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;

X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;

X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;

X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;

X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;

X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D; и

X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L; и

второй домен FN3 содержит:

тяж C и петлю CD, содержащую последовательность DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub> (SEQ ID NO: 184), где:

X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V;

X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;

X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;

X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;

X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;

X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K; и

X<sub>16</sub> представляет собой E или D; и

тяж F и петлю FG, содержащую последовательность TEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>V KGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub> (SEQ ID NO: 185), где:

X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;

X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;

X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;

X<sub>20</sub> представляет собой G или S;

X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;

X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L; и

X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

В другом варианте осуществления биспецифическая молекула содержит первый домен FN3, связывающийся с EGFR, который содержит последовательность:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP  
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182)  
или последовательность:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP  
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHNDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

причем в SEQ ID NO: X и X;

X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;

X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;

X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;

X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;

X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;

X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D;

X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L; и

X<sub>9</sub> представляет собой M или I.

В другом варианте осуществления биспецифическая молекула содержит второй домен FN3, связывающийся с c-Met, который содержит последовательность:

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>  
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>VKGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub>PLSAEFTT (SEQ ID  
NO: 186),

где:

X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V; и

X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;

X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;

X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;

X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;

X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K;

X<sub>16</sub> представляет собой E или D;

X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;

X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;

X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;

X<sub>20</sub> представляет собой G или S;

X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;

X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L; и

X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

Примеры биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домены FN3, содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121 или 138-165.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения имеют некоторые структурные характеристики, связанные с их функциональными характеристиками, такими как ингибирование аутофосфорилирования EGFR, например, петля FG первого домена FN3, связывающегося с EGFR, которая содержит последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDVML (SEQ ID NO: 180), где X<sub>9</sub> представляет собой M или I.

В одном варианте осуществления биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домен FN3:

ингибируют индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $8 \times 10^{-7}$  М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF;

ингибируют индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $8,4 \times 10^{-7}$  М при измерении в клетках NCI-H441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF;

ингибируют индуцированную HGF пролиферацию клеток NCI-H292 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $9,5 \times 10^{-6}$  М, причем пролиферацию клеток индуцируют 10% FBS, содержащим 7,5 нг HGF;

связываются с EGFR с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно  $2,0 \times 10^{-8}$  М;

связываются с c-Met с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно  $2,0 \times 10^{-8}$

М.

В другом варианте осуществления биспецифические к EGFR/c-

Met молекулы изобретения, содержащие домен FN3:

ингибируют индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от около  $4,2 \times 10^{-9}$  М до  $8 \times 10^{-7}$  М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF;

ингибируют индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением  $IC_{50}$  от около  $2,4 \times 10^{-8}$  М до около  $8,4 \times 10^{-7}$  М при измерении в клетках NCI-H441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF;

ингибируют индуцированную HGF пролиферацию клеток NCI-H292 со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от около  $2,3 \times 10^{-8}$  М до около  $9,5 \times 10^{-6}$  М, причем пролиферацию клеток индуцируют 10% FBS, содержащим 7,5 нг HGF;

связываются с EGFR с  $K_D$  от около  $2 \times 10^{-10}$  М до около  $2,0 \times 10^{-8}$  М;

связываются с c-Met с  $K_D$  от около  $1 \times 10^{-9}$  М до около  $2,0 \times 10^{-8}$  М.

В одном варианте осуществления биспецифические к EGFR/c-Met молекулы содержат EGFR-связывающий домен FN3, содержащий последовательность:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGV HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

где:

X<sub>1</sub> представляет собой D;

X<sub>2</sub> представляет собой D;

X<sub>3</sub> представляет собой P;

X<sub>4</sub> отсутствует;

X<sub>5</sub> представляет собой H или W;

X<sub>6</sub> представляет собой A;

X<sub>7</sub> представляет собой F;

X<sub>8</sub> представляет собой Y; и

X<sub>9</sub> представляет собой M или I; и

c-Met-связывающий домен FN3 с последовательностью:

PAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>  
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>VKGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub> PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),

где:

- X<sub>10</sub> представляет собой W;
- X<sub>11</sub> представляет собой F;
- X<sub>12</sub> представляет собой F;
- X<sub>13</sub> представляет собой V или L;
- X<sub>14</sub> представляет собой G или S;
- X<sub>15</sub> представляет собой S или K;
- X<sub>16</sub> представляет собой E или D;
- X<sub>17</sub> представляет собой V;
- X<sub>18</sub> представляет собой N;
- X<sub>19</sub> представляет собой L или M;
- X<sub>20</sub> представляет собой G или S;
- X<sub>21</sub> представляет собой S или K;
- X<sub>22</sub> представляет собой I; и
- X<sub>23</sub> представляет собой P.

Примеры биспецифических к EGFR/c-Met молекул представляют собой молекулы с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 57, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 и 68.

Биспецифические молекулы изобретения могут дополнительно содержать замены в одном или более положениях остатков в первом домене FN3 и/или втором домене FN3, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1), как описано выше, и замену в положении 29. Примеры замен представляют собой замены E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y, E86I и D29E (нумерация соответствует SEQ ID NO: 1). Специалисту в данной области будет понятно, что для замен можно использовать другие аминокислоты, например, аминокислоты из семейства аминокислот, связанных по боковым цепям, как описано ниже. Созданные варианты можно протестировать на стабильность и связывание с EGFR и/или c-Met с применением способов, описанных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3, содержит первый домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающийся с c-Met, причем первый домен FN3 содержит последовательность:

LPAPKNLVVSX<sub>24</sub>VTX<sub>25</sub>DSX<sub>26</sub>RLSWDDPX<sub>27</sub>AFYX<sub>28</sub>SFLIQYQX<sub>29</sub>SEKVGGEAIX<sub>30</sub>LTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYX<sub>31</sub>VHNVYKDTNX<sub>32</sub>RGLPLSAX<sub>33</sub>FTT (SEQ ID NO: 187), где:

X<sub>24</sub> представляет собой E, N или R;

X<sub>25</sub> представляет собой E или P;

X<sub>26</sub> представляет собой L или A;

X<sub>27</sub> представляет собой H или W;

X<sub>28</sub> представляет собой E или D;

X<sub>29</sub> представляет собой E или P;

X<sub>30</sub> представляет собой N или V;

X<sub>31</sub> представляет собой G или Y;

X<sub>32</sub> представляет собой M или I; и

X<sub>33</sub> представляет собой E или I;

и второй домен FN3 содержит последовательность:

LPAPKNLVVSX<sub>34</sub>VTX<sub>35</sub>DSX<sub>36</sub>RLSWTAPDAAFDSEWIRYFX<sub>37</sub>FX<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>GX<sub>41</sub>AIX<sub>42</sub>L  
 TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIX<sub>43</sub>X<sub>44</sub>VKGGX<sub>45</sub>ISPPLSAX<sub>46</sub>FTT (SEQ ID NO: 188); где:

X<sub>34</sub> представляет собой E, N или R;

X<sub>35</sub> представляет собой E или P;

X<sub>36</sub> представляет собой L или A;

X<sub>37</sub> представляет собой E или P;

X<sub>38</sub> представляет собой V или L;

X<sub>39</sub> представляет собой G или S;

X<sub>40</sub> представляет собой S или K;

X<sub>41</sub> представляет собой E или D;

X<sub>42</sub> представляет собой N или V;

X<sub>43</sub> представляет собой L или M;

X<sub>44</sub> представляет собой G или S;

X<sub>45</sub> представляет собой S или K; и

X<sub>46</sub> представляет собой E или I.

В других вариантах осуществления биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3, содержит первый домен FN3, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 87% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и второй домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 83% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домен FN3, могут быть созданы с учетом конкретной аффинности в отношении EGFR и c-Met для максимального накопления в опухоли.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенную биспецифическую молекулу, содержащую домен FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met, причем первый домен FN3 и второй домен FN3 выделены из библиотеки, разработанной на основе последовательности Tencon SEQ ID NO: 1.

Биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу изобретения, содержащую домен FN3, можно создать путем ковалентного соединения EGFR-связывающего домена FN3 и c-Met-связывающего домена FN3 изобретения с применением известных способов. Домены FN3 можно соединить посредством линкера, например, линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают в себя (GS)<sub>2</sub>, (SEQ ID NO: 78), (GGGG)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 79), (AP)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 80), (AP)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 81), (AP)<sub>10</sub> (SEQ ID NO: 82), (AP)<sub>20</sub> (SEQ ID NO: 83), A(EAAAK)<sub>5</sub>AAA (SEQ ID NO: 84), линкеры. Применение природных и искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell et al., *J Biol Chem* 264, 5260–5268, 1989; Alfthan et al., *Protein Eng.* 8, 725–731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109–116, 1996; патент США № 5,856,456). Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения можно соединить вместе С-концом первого домена FN3 к N-концу второго домена FN3 или С-концом второго домена FN3 к N-концу первого домена FN3. Любой EGFR-связывающий домен FN3 можно ковалентно соединять с c-Met-связывающим доменом FN3. Примеры EGFR-связывающих доменов FN3 представляют собой

домены с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137, а примеры с-Met-связывающих доменов FN3 представляют собой домены с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32-49 и 111-114. EGFR-связывающие домены FN3, которые нужно соединить с биспецифической молекулой, могут дополнительно содержать инициатор-метионин (Met) на своих N-концах.

Варианты биспецифических к EGFR/с-Met молекул, содержащих домен FN3, находятся в рамках объема изобретения. Например, в биспецифическую к EGFR/с-Met молекулу, содержащую домены FN3, можно вводить заместители, если полученный вариант будет сохранять аналогичную исходной молекуле избирательность и эффективность в отношении EGFR и с-Met. Примеры модификаций представляют собой, например, консервативные замены, приводящие к получению вариантов с характеристиками, которые аналогичны характеристикам исходных молекул. Консервативными называют замены, проводимые внутри семейства аминокислот, связанных по боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты можно разделить на четыре семейства: (1) кислые (аспартат, глутамат); (2) щелочные (лизин, аргинин, гистидин); (3) неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); и (4) незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин). Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда объединяют в одну группу ароматических аминокислот. Альтернативно набор аминокислот можно разделить на следующие группы: (1) кислые (аспартат, глутамат); (2) щелочные (лизин, аргинин, гистидин); (3) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), причем серин и треонин могут при необходимости образовывать отдельную группу алифатических-гидроксильных; (4) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); (5) амидные (аспарагин, глутамин); и (6) серосодержащие (цистеин и метионин) (Stryer (ed.), *Biochemistry*, 2nd ed, WH Freeman and Co., 1981). Возможно введение в биспецифическую к EGFR/с-Met молекулу, содержащую домен FN3, неконсервативных замен, которые включают в себя



замены аминокислотных остатков на другие классы аминокислот для улучшения свойств биспецифических молекул. Чтобы быстро определить возможность получения функционального гомолога в результате изменения аминокислотной последовательности полипептида или его фрагмента, можно оценить способность модифицированного полипептида или фрагмента вызывать ответ аналогично немодифицированному полипептиду или фрагменту с применением анализов, описанных в настоящем документе. Пептиды, полипептиды или белки с более чем одной заменой также можно легко протестировать аналогичным образом.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домен FN3, можно создавать, например, в форме димеров или мультимеров в качестве средства повышения валентности и, таким образом, avidности связывания с молекулой-мишенью. Мультимеры можно получать путем соединения одного или более EGFR-связывающих доменов FN3 и одного или более c-Met-связывающих доменов FN3 с образованием молекул, содержащих, по меньшей мере, три отдельных домена FN3, которые являются, по меньшей мере, биспецифическими к EGFR или c-Met, например, посредством включения аминокислотного линкера с применением хорошо известных способов.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой биспецифическую молекулу, содержащую домен FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met, причем молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50-72 или 106.

#### **Фрагменты, увеличивающие период полужизни**

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домен FN3, или моноспецифические EGFR- или c-Met-связывающие домены FN3 настоящего изобретения могут включать в себя другие

субъединицы, например, посредством ковалентного взаимодействия. В одном аспекте изобретения биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домен FN3, дополнительно содержат фрагмент, увеличивающий период полужизни. Примеры фрагментов, увеличивающих период полужизни, представляют собой альбумин, альбумин-связывающие белки и/или домены, трансферрин и их фрагменты и аналоги, а также Fc-области. Пример альбумин-связывающего домена представлен в SEQ ID NO: 117.

К молекулам изобретения можно присоединить всю константную область антитела или ее часть для придания им антителоподобных свойств, особенно тех свойств, которые связаны с Fc-участком, например, эффекторные функции Fc, такие как связывание с C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, подавление ингибирования рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR), и их можно дополнительно модифицировать путем модификации остатков, которые в Fc отвечают за данные функции (см. обзор в публикации Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20, 685-691, 2009).

В биспецифические молекулы изобретения можно встроить дополнительные фрагменты, такие как молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), такие как ПЭГ-5000 или ПЭГ-20 000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например, лаурат, мирилат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандиовую кислоту, тетрадекандиовую кислоту, октадекандиовую кислоту, докозандиовую кислоту и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго- или полисахариды) для получения желаемых свойств. Эти фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с кодирующими белковый каркас последовательностями, и их можно создавать с помощью стандартных методик клонирования и экспрессии. Альтернативно для прикрепления фрагментов в формируемые рекомбинантным способом молекулы изобретения можно применять хорошо известные способы химического связывания.

К биспецифическим или моноспецифическим молекулам изобретения можно добавить, например, пегильный фрагмент путем добавления цистеинового остатка к С-концу молекулы и присоединения пегильной группы к цистеину с помощью хорошо известных способов. Примеры биспецифических молекул с С-концевым цистеином представляют собой молекулы с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ IN NO: 170–178.

Моноспецифические и биспецифические молекулы изобретения, которые включают дополнительные фрагменты, можно сравнить по функциональности с помощью ряда известных анализов. Например, изменение свойств моноспецифических и/или биспецифических молекул вследствие встраивания доменов Fc и/или вариантов домена Fc можно проанализировать в анализах связывания с рецепторами Fc с применением растворимых форм рецепторов, таких как рецепторы FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с применением хорошо известных клеточных анализов для измерения, например, ADCC или CDC или оценки фармакокинетических свойств молекул изобретения на моделях *in vivo*.

#### **Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева**

В изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие EGFR- или c-Met-связывающие домены FN3 или биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домены FN3 в виде выделенных полинуклеотидов или в виде участков векторов экспрессии, или в виде участков линейных последовательностей ДНК, включая линейные последовательности ДНК, применяемые для транскрипции/трансляции *in vitro*, векторов, совместимых с экспрессией, секрецией и/или представлением композиций или результатов их направленного мутагенеза в прокариотах, эукариотах или нитчатых фагах. В настоящем документе описаны некоторые примеры полинуклеотидов, однако другие полинуклеотиды, которые, учитывая вырожденность генетического кода или предпочтения в отношении кодона в данной системе экспрессии, кодируют белковые каркасы и библиотеки белковых каркасов изобретения, также входят в объем изобретения.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой

выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, который имеет аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18–29, 107–110 или 122–137.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 97–98 или 168–169.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3, специфически связывающийся с c-Met, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32–49 или 111–114.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическую к EGFR/-c-Met молекулу, содержащую домен FN3, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 50–72, 106, 118–121 или 138–165.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 115–116 или 166–167.

Полинуклеотиды изобретения можно получить путем химического синтеза, такого как синтез полинуклеотидов в твердой фазе на автоматическом синтезаторе полинуклеотидов, и сборки в полные одно- или двухцепочечные молекулы. Альтернативно полинуклеотиды изобретения можно получить другими методиками, такими как ПЦР с последующим стандартным клонированием. Методики производства или получения полинуклеотидов с заданной известной последовательностью хорошо известны в данной области.

Полинуклеотиды изобретения могут содержать, по меньшей мере, одну некодирующую последовательность, такую как промоторная или энхансерная последовательность, интрон, сигнал полиаденилирования, *cis*-последовательность, облегчающую связывание с RepA, и т. п. Полинуклеотидные последовательности также могут содержать дополнительные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты, которые кодируют, например, маркерную последовательность или последовательность тега, такую как гистидиновый тег или HA-тег для облегчения

очистки или определения белка, сигнальную последовательность, партнер для слитного белка, такой как RepA, Fc или белок покрытия бактериофага, такой как pIX или pIII.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой вектор, содержащий, по меньшей мере, один полинуклеотид изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, подходящие для введения полинуклеотидов изобретения в данный организм или генетическое окружение любым образом. Такие векторы могут представлять собой векторы экспрессии, содержащие элементы нуклеотидной последовательности, которые могут контролировать, регулировать, вызывать или допускать экспрессию полипептидов, кодируемых таким вектором. Такие элементы могут содержать сайты связывания энхансера транскрипции, сайты инициации РНК-полимеразы, сайты связывания рибосом и другие сайты, способствующие экспрессии закодированных полипептидов в заданной экспрессирующей системе. Такие экспрессирующие системы могут представлять собой клеточные или бесклеточные системы, хорошо известные в данной области.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор изобретения. Моноспецифический EGFR- или c-Met-связывающий домен FN3 или биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу изобретения, содержащую домены FN3, можно необязательно получить с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно в данной области. См., например, публикации Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY,

(1997–2001).

Выбранная для экспрессии клетка-хозяин может быть получена от млекопитающего или ее можно выбрать из клеток COS-1, COS-7, HEK293, VHK21, CHO, BSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых производных, иммортализованных или преобразованных упомянутых клеток. Альтернативно клетку-хозяина можно выбирать из видов или организмов, неспособных к гликозилированию полипептидов, например, прокариотической клетки или организма, такого как BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), и любого из природных или сконструированных штаммов *E. coli*, *Klebsiella* или *Pseudomonas*.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ получения выделенного домена FN3 изобретения, специфически связывающегося с EGFR или c-Met, или выделенной биспецифической к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащей домен FN3, включающий в себя культивирование выделенной клетки-хозяина изобретения в таких условиях, чтобы экспрессировался выделенный домен FN3, специфически связывающийся с EGFR или c-Met, или выделенная биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3, а также очистки домена или молекулы.

Домен FN3, специфически связывающийся с EGFR или c-Met, или выделенную биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу изобретения, содержащую домен FN3, можно очистить из рекомбинантных клеточных культур с помощью хорошо известных способов, например, путем очистки белком А, осаждением сульфатом аммония или этанолом, кислотной экстракцией, анионной или катионной обменной хроматографией, фосфоцеллюлозной хроматографией, хроматографией с гидрофобным взаимодействием, аффинной хроматографией, гидроксилпатитной хроматографией, лектиновой хроматографией или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

Использование биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домены FN3, и EGFR- или c-Met-связывающих доменов FN3 изобретения

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домены

FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3 можно применять для диагностики, мониторинга, модуляции, лечения, ослабления, профилактики развития или снижения симптомов заболевания человека или конкретных патологий клеток, тканей, органов, текучих сред или по существу хозяина. Способы изобретения можно применять для лечения любого пациента-животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают в себя млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Один аспект изобретения представляет собой способ ингибирования роста или пролиферации клеток, экспрессирующих EGFR и/или с-Met, включающий в себя приведение в контакт клеток с выделенной биспецифической к EGFR/с-Met молекулой, содержащей домен FN3, EGFR-связывающим доменом FN3 или с-Met-связывающим доменом FN3.

Другой аспект изобретения представляет собой способ ингибирования роста или метастазирования экспрессирующих EGFR и/или с-Met опухолевых или раковых клеток у субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества выделенной биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домены FN3, EGFR-связывающего домена FN3 или с-Met-связывающего домена FN3 таким образом, чтобы ингибировать рост или метастазирование экспрессирующих EGFR и/или с-Met опухолевых или раковых клеток.

Биспецифическую к EGFR/с-Met молекулу, содержащую домен FN3, EGFR-связывающий домен FN3 или с-Met-связывающий домен FN3 изобретения можно применять для лечения любого заболевания или расстройства, характеризующегося аномальной активацией или продукцией EGFR, с-Met, EGF или иного лиганда EGFR или HGF, или расстройства, связанного с экспрессией EGFR или с-Met, которые могут быть связаны или не связаны со злокачественными образованиями или раком, причем аномальная активация и/или продукция EGFR, с-Met, EGF или иного лиганда EGFR или HGF происходит в клетках или тканях субъекта с заболеванием или расстройством или субъекта, предрасположенного к заболеванию или расстройству.

Биспецифическую к EGFR/с-Met молекулу изобретения,

содержащую домен FN3, можно применять для лечения опухолей, включая раковые заболевания и доброкачественные опухоли. Виды рака, которые поддаются лечению с помощью биспецифических молекул изобретения, включают в себя виды, связанные со сверхэкспрессией EGFR и/или с-Met. Примеры видов рака, которые поддаются лечению посредством биспецифических молекул изобретения, включают в себя виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), легочную аденокарциному, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичек, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени или спорадическую или наследственную папиллярную почечную карциному (PRCC).

Домены FN3 изобретения, специфически связывающиеся с с-Met и блокирующие связывание HGF с с-Met, можно применять для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды рака, которые поддаются лечению посредством с-Met-связывающих доменов FN3 изобретения, включают в себя виды, связанные со сверхэкспрессией с-Met. Примеры видов рака, которые поддаются лечению посредством доменов FN3 изобретения, включают в себя виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичек, рак желудка и рак тимуса.

Section 1.01 Домены FN3 изобретения, специфически связывающиеся с EGFR и блокирующие связывание EGF с EGFR, можно применять для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды рака, которые поддаются лечению посредством доменов FN3 изобретения, включают в себя виды, связанные со сверхэкспрессией EGFR, или варианты. Примеры видов рака, которые поддаются лечению посредством доменов FN3



изобретения, включают в себя виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичек, рак желудка и рак тимуса.

#### Введение/фармацевтические композиции

Для терапевтического применения биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или c-Met-связывающие домены FN3 изобретения, можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество домена или молекулы в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или носителю, с которыми вводят активное соединение. Такие носители могут быть жидкостями, таким как вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4% соляной раствор и 0,3% раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их стерилизацию можно проводить с помощью стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты для регулирования и буферизации pH, стабилизаторы, загустители, увлажняющие и красящие агенты и т. п. Концентрация молекул изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т. е. обычно от менее чем приблизительно 0,5% или, по меньшей мере, около 1% и до 15 или 20% вес., и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т. п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Подходящие носители и составы, включая другие белки человека, например, сывороточный альбумин человека, описаны, например, в

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691–1092, см. в особенности pp. 958–989.

Способ введения для терапевтического применения биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домены FN3, EGFR-связывающих доменов FN3 или c-Met-связывающих доменов FN3 может представлять собой любой подходящий путь, обеспечивающий доставку агента в организм хозяина, такой как парентеральное введение, например, внутривенное, подкожное, легочное; интраперитонеальное, внутримышечное, интраназальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное); с применением состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, гранул; и содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе; или же с помощью других средств, очевидных для квалифицированного специалиста, которые хорошо известны в данной области. Локализованное введение можно обеспечить, например, путем доставки в сустав, бронхи, брюшную полость, внутрь капсулы, хрящ, полость, клетку, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, простату, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, внутрь пораженных тканей, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Таким образом, фармацевтическую композицию изобретения для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной забуференной воды и от около 1 нг до около 100 мг, например, от около 50 нг до около 30 мг, или более предпочтительно от около от 5 мг до около 25 мг домена FN3 изобретения. Аналогичным образом, фармацевтическая композиция изобретения для внутривенного введения может содержать около 250 мл стерильного раствора Рингера и от около 1 мг до около 30 мг, например, от около 5 мг до около 25 мг биспецифической к EGFR/c-

Met молекулы, содержащей домен FN3, EGFR-связывающего домена FN3 или с-Met-связывающего домена FN3 изобретения. Фактические способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3 изобретения можно лиофилизировать для хранения и перед применением восстанавливать в подходящем носителе. Было показано, что данная методика эффективна для стандартных белковых препаратов, при этом можно использовать известные в данной области способы лиофилизации и восстановления.

Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3, можно вводить пациенту одной дозой, или же введения могут быть повторными, например, через одни сутки, двое суток, трое суток, пятеро суток, шестеро суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца или три месяца. Повторное введение можно выполнять в той же дозе или в другой дозе. Введение можно повторять один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более.

Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим средством одновременно, последовательно или раздельно. Второе терапевтическое средство может представлять собой химиотерапевтический агент, противоангиогенный агент или цитотоксическое лекарственное средство. При применении для лечения рака биспецифические к EGFR/с-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3, можно применять в комбинации с традиционными средствами лечения рака, такими как хирургия, радиотерапия, химиотерапия или их комбинации. Примеры агентов, которые можно применять в комбинации с доменами FN3 изобретения, представляют

собой антагонисты HER2, HER3, HER4, VEGF и белковые ингибиторы тирозинкиназ, такие как Iressa® (гефитиниб) и Tarceva (эрлотиниб).

Хотя изобретение описано в общих терминах, варианты осуществления изобретения будут более подробно описаны в следующих примерах, которые не следует толковать как ограничивающие объем формулы изобретения.

#### **ПРИМЕР 1. Создание библиотек Tencon**

Tencon (SEQ ID NO: 1) представляет собой каркасный иммуноглобулин-подобный домен фибронектина типа III (FN3), разработанный на основе консенсусной последовательности пятнадцати доменов FN3 тенасцина-С человека (Jacobs *et al.*, Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107–117, 2012; патентная публикация США № 2010/0216708). На кристаллической структуре Tencon имеются шесть поверхностных петель, соединяющих семь бета-тяжей. Данные петли или выбранные остатки в пределах каждой петли можно подвергать рандомизации для создания библиотеки доменов фибронектина типа III (FN3), которые можно применять для выбора новых молекул, связывающихся с конкретными мишенями.

Tencon:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT  
GLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO 1):

#### **Создание библиотеки TCL1**

Библиотека, разработанная с рандомизацией только петли FG в Tencon (SEQ ID NO: 1), TCL1, была создана для применения с *cis*-дисплейной системой (Jacobs *et al.*, Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107–117, 2012). В этой системе создается одноцепочечная ДНК, в которую включены последовательности для промотора Tac, кодовая последовательность библиотеки Tencon, кодовая последовательность RepA, *cis*-элемент и *ori*-элемент. При экспрессии в системе транскрипции/трансляции *in vitro* формируется комплекс слитного белка Tencon-RepA, связанный в *cis* с ДНК, которая его кодирует. Затем комплексы, связывающиеся с молекулой-мишенью, выделяют и амплифицируют с помощью

полимеразной цепной реакции (ПЦР) так, как описано ниже.

Конструирование библиотеки TCL1 для применения с *cis*-дисплеем осуществляли путем последовательных циклов ПЦР с получением конечных линейных двухцепочечных молекул ДНК из двух половин; 5'-фрагмент содержит последовательности промотора и Tencon, а 3'-фрагмент содержит ген *repA* и элементы *cis*- и *ori*. Эти две половины объединяют путем рестриктазного расщепления с получением полного конструкта. Библиотека TCL1 была разработана с возможностью включения случайных аминокислот только в петлю FG в Tencon, KGGHRSN (SEQ ID NO: 86). При создании данной библиотеки применяли NNS-кодона, что позволило встроить в петлю FG все 20 аминокислот и один стоп-кодон. Библиотека TCL1 содержит шесть отдельных подбиблиотек, каждая из которых имеет разную рандомизированную длину петли FG - от 7 до 12 остатков - для дополнительного повышения разнообразия. Конфигурация библиотек на основе Tencon представлена в таблице 2.

Таблица 2

<u>Библиотека</u>	<u>Конфигурация петли BC</u>	<u>Конфигурация петли FG</u>
WT Tencon	TAPDAAFD*	KGGHRSN**
TCL1	TAPDAAFD*	XXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXXXX
TCL2	#####	#####S##

\*TAPDAAFD: остатки 22–28 в SEQ ID NO: 1.

\*\*KGGHRSN: SEQ ID NO: 86.

X обозначает вырожденные аминокислоты, кодируемые NNS-кодонами.

# обозначает «разработанное распределение аминокислот», описанное в тексте.

Для создания библиотеки TcL1 выполняли последовательные циклы ПЦР для присоединения промотора Tac, введения вырожденных элементов в петлю F:G и добавления необходимых сайтов рестрикции для конечной сборки. Сначала в два этапа создали последовательность ДНК, содержащую промоторную последовательность и последовательность 5'-фрагмента петли FG Tencon. В качестве матрицы для ПЦР использовали ДНК, соответствующую полной последовательности гена Tencon, с праймерами POP2220 (SEQ ID NO: 2) и Tc5'toFG (SEQ ID NO: 3). Полученный в результате этой реакции продукт ПЦР использовали в качестве матрицы для следующего цикла ПЦР-амплификации с праймерами 130mer (SEQ ID NO: 4) и Tc5'toFG для завершения присоединения последовательности 5'-фрагмента и промоторной последовательности к Tencon. Затем в петлю F:G вводили диверсификацию путем амплификации ДНК-продукта, полученного на первом этапе, с прямым праймером POP2222 (SEQ ID NO: 5) и обратными праймерами TCF7 (SEQ ID NO: 6), TCF8 (SEQ ID NO: 7), TCF9 (SEQ ID NO: 8), TCF10 (SEQ ID NO: 9), TCF11 (SEQ ID NO: 10) или TCF12 (SEQ ID NO: 11), содержащими вырожденные нуклеотиды. Выполняли, по меньшей мере, по восемь ПЦР-реакций по 100 мкл для каждой подбиблиотеки, чтобы свести к минимуму число циклов ПЦР и максимально увеличить разнообразие библиотеки. По меньшей мере 5 мкг этого продукта ПЦР очищали из геля и использовали на последующем этапе с праймерами POP2222 (SEQ ID NO: 5) и POP2234 (SEQ ID NO: 12), выполнив в результате прикрепление 6xHis-тега и сайта рестрикции NotI к 3'-концу последовательности Tencon. Эту ПЦР-реакцию проводили с использованием лишь пятнадцати циклов ПЦР и, по меньшей мере, 500 нг ДНК-матрицы. Полученный продукт ПЦР очищали из геля, расщепляли рестрикционным ферментом NotI и очищали на колонке Qiagen.

3'-фрагмент библиотеки представляет собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая сайт рестрикции PspOMI, кодирующую область гена *repA* и *cis*- и *ori*-элементы. ПЦР проводили с использованием плазмиды (pCR4Blunt)

(Invitrogen), содержащей данный ДНК-фрагмент, с праймерами M13 Forward (прямой) и M13 Reverse (обратный). Полученные продукты ПЦР расщепляли PspOMI в течение ночи и очищали из геля. Для лигирования 5'-участка библиотечной ДНК с 3'-фрагментом ДНК, содержащим ген *repA*, 2 пмоль 5'-фрагмента ДНК лигировали с эквимольным количеством 3'-фрагмента *repA* ДНК в присутствии ферментов NotI и PspOMI и лигазы T4. После лигирования в течение ночи при 37°C небольшую часть лигированной ДНК прогоняли через гель для проверки эффективности лигирования. Лигированный библиотечный продукт разделяли на двенадцать ПЦР-амплификаций и проводили ПЦР в 12 циклов с парой праймеров POP2250 (SEQ ID NO: 13) и DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Выход ДНК для каждой подбиблиотеки в библиотеке TCL1 находился в диапазоне от 32 до 34 мкг.

Для оценки качества библиотеки небольшой участок рабочей библиотеки амплифицировали с праймерами Tcon5new2 (SEQ ID NO: 15) и Tcon6 (SEQ ID NO: 16) и клонировали в модифицированном векторе pET посредством безлигазного клонирования. Плазмидную ДНК трансформировали в компетентные клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) и 96 случайно выбранных колоний секвенировали с применением праймера промотора T7. Дублирующиеся последовательности обнаружены не были. В целом приблизительно 70–85% клонов имели полный промотор и кодирующую последовательность Tenson без мутации сдвига рамки считывания. Доля функционального секвенирования, которая исключает клоны со стоп-кодонами, находилась в диапазоне от 59% до 80%.

### **Создание библиотеки TCL2**

Была создана библиотека TCL2, в которой в Tenson были рандомизированы как петля BC, так и петля FG, а распределение аминокислот в каждом положении строго контролировалось. В таблице 3 представлено распределение аминокислот в желаемых положениях петель в библиотеке TCL2. Разработанное распределение аминокислот имело две цели. Во-первых, библиотека была ориентирована на остатки, которые предположительно являются структурно значимыми для сворачивания и стабильности Tenson на

основании анализа кристаллической структуры Tencon и/или гомологического моделирования. Например, положение 29 было предназначено только для подмножества гидрофобных аминокислот, так как этот остаток погружен в гидрофобную сердцевину свернутого Tencon. Второй уровень разработки включал в себя смещение распределения аминокислот к распределению остатков, которые предпочтительно находятся в тяжелой цепи HCDR3 антител, для эффективного получения соединений с высокой аффинностью связывания (Birtalan *et al.*, *J Mol Biol* 377:1518–28, 2008; Olson *et al.*, *Protein Sci* 16:476–84, 2007). Таким образом, «разработанное распределение» из таблицы 3 относится к представленному ниже распределению: 6% аланина, 6% аргинина, 3,9% аспарагина, 7,5% аспарагиновой кислоты, 2,5% глутаминовой кислоты, 1,5% глутамина, 15% глицина, 2,3% гистидина, 2,5% изолейцина, 5% лейцина, 1,5% лизина, 2,5% фенилаланина, 4% пролина, 10% серина, 4,5% треонина, 4% триптофана, 17,3% тирозина и 4% валина. В данном распределении отсутствуют метионин, цистеин и стоп-кодоны.

Таблица 3

Положение остатка*	Остатки дикого типа (д.т.)	Распределение в библиотеке TCL2
22	T	Разработанное распределение
23	A	Разработанное распределение
24	R	50% R+разработанное распределение
25	D	Разработанное распределение
26	A	20% A+20% G+разработанное распределение
27	A	Разработанное распределение
28	F	20% F, 20% I, 20% L, 20% V, 20% Y
29	D	33% D, 33% E, 33% T
75	K	Разработанное распределение
76	G	Разработанное распределение



77	G	Разработанное распределение
78	H	Разработанное распределение
79	R	Разработанное распределение
80	S	100% S
81	N	Разработанное распределение
82	P	50% P+разработанное распределение

\*Нумерация остатков основана на последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

5'-фрагмент библиотеки TCL2 содержал промотор и кодирующую область Tenson (SEQ ID NO: 1), который химически синтезировали в виде библиотечного пула (Cloning Biotechnology). Данный пул ДНК содержал, по меньшей мере,  $1 \times 10^{11}$  разных элементов. В конец фрагмента был включен сайт рестрикции BsaI в конфигурации для лигирования с *RepA*.

3'-фрагмент библиотеки представлял собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая 6xHis-тег, кодирующую область гена *repA* и *cis*-элемент. ДНК получали в ПЦР-реакции с помощью существующей ДНК-матрицы (выше) и праймеров LS1008 (SEQ ID NO: 17) и DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Для сборки готовой библиотеки TCL2 общее количество 1 мкг расщепленного рестриктазой BsaI 5'-фрагмента библиотечной ДНК Tenson лигировали с 3,5 мкг 3'-фрагмента, полученного путем рестрикционного расщепления этим же ферментом. После лигирования в течение ночи ДНК очищали на колонке Qiagen и проводили количественную оценку ДНК путем измерения поглощения при 260 нм. Лигированный библиотечный продукт амплифицировали ПЦР в 12 циклов с парой праймеров POP2250 (SEQ ID NO: 13) и DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Всего провели 72 реакции, в каждой из которых в качестве матрицы использовали 50 нг лигированных ДНК-продуктов. Общий выход рабочей библиотеки ДНК TCL2 составил около 100 мкг. Небольшой участок рабочей библиотеки подвергли субклонированию и секвенированию, как описано выше для библиотеки TCL1. Дублирующиеся последовательности обнаружены не были. Около 80% последовательностей содержали полный промотор и кодирующие

последовательности Tencon без мутаций сдвига рамки считывания.

#### **Создание библиотеки TCL14**

Верхние (BC, DE и FG) и нижние (AB, CD и EF) петли, например, отмеченные поверхности связывания в доменах FN3, разделены бета-тяжами, которые образуют центр структуры FN3. Альтернативные поверхности, расположенные с двух «сторон» доменов FN3 и имеющие другие формы, нежели поверхности, образованные только петлями, образованы с одной стороны домена FN3 двумя антипараллельными бета-тяжами, бета-тяжами C и F и петлями CD и FG, и в настоящем документе называются поверхностью C-CD-F-FG.

Была создана библиотека, рандомизирующая альтернативную поверхность Tencon путем рандомизации выбранных открытых на поверхности остатков, относящихся к тягам C и F, а также к участкам петель CD и FG, как показано на Фиг. 4. Для создания библиотеки использовали вариант Tencon - Tencon27 (SEQ ID NO: 99), имеющий следующие замены по сравнению с Tencon (SEQ ID NO: 1): E11R L17A, N46V, E86I. Полное описание способов, применяемых для разработки этой библиотеки, приведено в заявке на патент США № 13/852,930.

**ПРИМЕР 2. Выбор доменов фибронектина типа III (FN3), связывающихся с EGFR и ингибирующих связывание с EGF**

#### **Скрининг библиотеки**

Для выбора EGFR-связывающих доменов из библиотек TCL1 и TCL2 применяли *cis*-дисплей. Рекombинантный человеческий внеклеточный домен EGFR, слитый с IgG1 Fc (R&D Systems), биотинилировали стандартными способами и применяли для пэннинга (остатки 25-645 полноразмерного EGFR с SEQ ID NO: 73). Для транскрипции и трансляции *in vitro* (ITT) 2-6 мкг библиотечной ДНК инкубировали с 0,1 мМ полного набора аминокислот, компонентами 1X премикса S30 и 30 мкл экстракта S30 (Promega) в общем объеме 100 мкл и инкубировали при 30°C. Через 1 час добавляли 450 мкл блокирующего раствора (PBS, pH 7,4, с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина, 100 мкг/мл ДНК спермы сельди и 1 мг/мл гепарина) и реакционную смесь инкубировали на льду в течение 15

минут. Собирали комплексы EGFR-Fc:EGF с молярными соотношениями 1:1 и 10:1 для EGFR к EGF путем смешивания рекомбинантного человеческого EGF (R&D Systems) с биотинилированным рекомбинантным EGFR-Fc в блокирующем растворе в течение 1 часа при комнатной температуре. Для связывания 500 мкл заблокированных реакционных смесей ИТТ смешивали с 100 мкл комплексов EGFR-Fc:EGF и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего связанные комплексы извлекали магнитными гранулами с нейтравидином или стрептавидином (Seradyne). Несвязанные элементы библиотеки удаляли путем последовательных промывок PBST и PBS. После промывки ДНК элюировали из связанных комплексов путем нагревания до 65°C в течение 10 минут, амплифицировали ПЦР и присоединяли к ДНК-фрагменту, кодирующему RepA, путем рестрикционного расщепления и лигирования для дополнительных циклов пэннинга. Соединения с высокой аффинностью связывания выделяли путем последовательного понижения концентрации мишени EGFR-Fc в каждом цикле от 200 нМ до 50 нМ и повышения жесткости условий промывки. В циклах 4 и 5 несвязанные и слабо связанные домены FN3 удаляли путем промывки в присутствии 10-кратного молярного избытка небiotинилированных EGFR-Fc в течение ночи в PBS.

После пэннинга выбранные домены FN3 амплифицировали ПЦР с применением олигонуклеотидов Tcon5new2 (SEQ ID NO: 15) и Tcon6 (SEQ ID NO: 16), субклонировали в вектор pET, модифицированный путем включения сайта безлигазного клонирования, и трансформировали в клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) для экспрессии растворимого продукта в *E. coli* с применением стандартных методик молекулярной биологии. К каждому домену FN3 добавляли генную последовательность, кодирующую С-концевой полигистидиновый тег, для обеспечения возможности очистки и обнаружения. Культуры выращивали до достижения оптической плотности 0,6–0,8 в среде 2YT с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина в 96-луночных блоках объемом 1 мл при 37°C, затем добавляли IPTG до 1 мМ и в этот момент температуру снижали до 30°C. Клетки собирали приблизительно через 16 часов путем

центрифугирования и замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Лизирование клеток проводили путем инкубации каждого осадка в 0,6 мл лизирующего буфера BugBuster® HT (Novagen EMD Biosciences) со встряхиванием при комнатной температуре в течение 45 минут.

#### **Выбор доменов FN3, связывающихся с EGFR на клетках**

Для оценки способности разных доменов FN3 связываться с EGFR в более физиологическом контексте измеряли их способность связываться с клетками A431. Клетки A431 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1555) обладают сверхэкспрессией EGFR  $\sim 2 \times 10^6$  рецепторов на клетку. Клетки высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давали им прикрепиться в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$ . Лизаты экспрессирующих домены FN3 бактерий 1000-кратно разбавляли в буфере для окрашивания при FACS (Becton Dickinson) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в трех планшетах. Лизаты удаляли и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата антител к пентагистидину His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с помощью считывателя Asimen eX3. Бактериальные лизаты, содержащие домены FN3, отбирали посредством скрининга по их способности связываться с клетками A431 (1320 неочищенных бактериальных лизатов по библиотекам TCL1 и TCL2) и выявили 516 позитивных клонов, у которых связывание  $\geq 10$ -кратно превосходило фоновый сигнал. Для связывания посредством скрининга отбирали 300 лизатов из библиотеки TCL14, получив 58 уникальных последовательностей доменов FN3, связывающихся с EGFR.

#### **Выбор доменов FN3, ингибирующих связывание EGF с EGFR на клетках**

Чтобы лучше охарактеризовать механизм связывания с EGFR, измеряли способность различных обнаруженных клонов домена FN3

связываться с EGFR в конкуренции с EGF с применением клеток A431 параллельно со скрининговым анализом связывания с A431. Клетки A431 высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка разбавленного 1:1000 лизата бактерий в течение 1 часа при комнатной температуре в трех планшетах. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по кат. E-3477) добавляли в каждую лунку с конечной концентрацией 30 нг/мл и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза буфером для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (Invitrogen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 600 нм с помощью считывателя Asuмен eX3.

Скрининг бактериальных лизатов, содержащих домены FN3, проводили в анализе на конкуренцию с EGF, описанном выше. Скринингу подвергли 1320 неочищенных бактериальных лизатов из библиотек TCL1 и TCL2, получив 451 позитивный клон с ингибированием связывания с EGF > 50%.

#### **Экспрессия и очистка идентифицированных доменов FN3, связывающихся с EGFR**

Домены FN3 с His-тегом очищали из лизатов *E. coli* с использованием планшетов His MultiTrap™ HP (GE Healthcare) и элюировали в буфере, содержащем 20 mM фосфата натрия, 500 mM хлорида натрия и 250 mM имидазола, pH 7,4. В очищенных образцах для анализа заменяли буфер на PBS, pH 7,4, с применением планшетов PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare).

#### **Анализ методом эксклюзионной хроматографии**

Для оценки состояния агрегации доменов FN3, связывающихся EGFR, применяли эксклюзионную хроматографию (SEC). Аликвоты (10 мкл) каждого очищенного домена FN3 вводили в колонку Superdex 75

5/150 (GE Healthcare) со скоростью потока 0,3 мл/мин в подвижной фазе PBS с pH 7,4. Элюирование с колонки отслеживали по поглощению на 280 нм. Centyrin, показывающие высокие уровни агрегации по SEC, исключали из дополнительного анализа.

### **Скорость диссоциации выбранных EGFR-связывающих доменов FN3 от EGFR-Fc**

Для выбранных EGFR-связывающих доменов FN3 проводили скрининг для идентификации доменов с низкими константами диссоциации ( $k_{off}$ ) при связывании с EGFR-Fc на приборе ProteOn XPR-36 (Bio-Rad) для упрощения выбора соединений с высокой аффинностью связывания. Козьи антитела к человеческим Fc IgG (R&D systems) в концентрации 5 мкг/мл напрямую иммобилизовали посредством аминного связывания (при pH 5,0) во всех 6 горизонтально ориентированных лигандных каналах на чипе при скорости потока 30 мкл/мин в PBS, содержащем 0,005% Tween-20. Значения плотности иммобилизации в среднем составляли около 1500 отвечающих единиц (RU) с менее чем 5%-ным разбросом между разными каналами. EGFR-Fc захватывался поверхностью с антителами к человеческому Fc IgG с плотностью около 600 RU в вертикальной ориентации лиганда. Все протестированные домены FN3 нормализовали к концентрации 1 мкМ и тестировали их на связывание в горизонтальной ориентации. Для доменов FN3 применяли все 6 каналов для анализа, чтобы максимально увеличить производительность скрининга. Фазу диссоциации отслеживали в течение 10 минут при скорости потока 100 мкл/мин. В качестве эталонов при отслеживании неспецифического связывания между анализами и поверхностью с иммобилизованными IgG применяли сигналы связывания между пятнами, и сигналы вычитали из всех сигналов связывания. Обработанные данные связывания локально аппроксимировали простой моделью связывания Ленгмюра 1:1 для получения  $k_{off}$  по каждому домену FN3, связывающемуся с захваченными EGFR-Fc.

### **Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR**

Очищенные EGFR-связывающие домены FN3 тестировали на их способность ингибировать стимулированное EGF фосфорилирование

EGFR в клетках A431 в одной концентрации. Фосфорилирование EGFR отслеживали с помощью набора EGFR phospho(Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Клетки высевали по 20 000/лунка на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл/лунка (Gibco), содержащую GlutaMAX™, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco), и позволяли им прикрепиться на ночь при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в течение ночи в условиях голодания в 100 мкл/лунка среды, не содержащей FBS, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки обрабатывали по 100 мкл/лунка предварительно нагретой (37°C) средой без питательных веществ, содержащей EGFR-связывающие домены FN3, в концентрации 2 мкМ в течение 1 часа при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Контроли обрабатывали только средой без питательных веществ. Клетки стимулировали путем добавления и осторожного перемешивания 100 мкл/лунка подогретой (37°C) среды без питательных веществ, содержащей 100 нг/мл рекомбинантного человеческого EGF (R&D Systems, № по кат. 236-EG) с конечными концентрациями 50 нг/мл EGF, а также 1 мкМ EGFR-связывающего домена FN3 и инкубированием при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 15 минут. Один набор контрольных лунок оставляли без стимуляции в качестве отрицательных контролей. Среду полностью удаляли и клетки лизировали при помощи 100 мкл/лунка лизирующего буфера Complete Lysis Buffer (Meso Scale Discovery) в течение 10 минут при комнатной температуре при встряхивании, как описано в инструкциях производителя. Планшеты для анализа, предназначенные для измерения EGFR, фосфорилированного по тирозиновому остатку 1173 (Meso Scale Discovery), блокировали входящим в комплект блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1,5–2 часов. Затем планшеты промывали 4 раза, используя 200 мкл/лунка 1X Tris Wash Buffer (Meso Scale Discovery). Аликвоты клеточных лизатов (30 мкл/лунка) переносили в планшеты для анализа, которые закрывали пленкой для герметизации планшетов (VWR), и инкубировали при

комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа. Планшеты для анализа промывали 4 раза, по 200 мкл/лунка Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли по 25 мкл ледяного раствора детекторного антитела (Meso Scale Discovery), стараясь избегать появления пузырей. Планшеты инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа, затем промывали 4 раза по 200 мкл/лунка Tris Wash Buffer. Сигналы обнаруживали путем добавления по 150 мкл/лунка буфера считывания (Meso Scale Discovery) и считывали на приборе SECTOR® Imager 6 000 (Meso Scale Discovery) с применением заданных производителем параметров для данного анализа по умолчанию. Процентное ингибирование стимулированного EGF позитивного контрольного сигнала вычисляли для каждого EGFR-связывающего домена FN3.

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR измеряли для 232 идентифицированных клонов из библиотек TCL1 и TCL2. 22 из этих клонов ингибировали фосфорилирование EGFR на величину  $\geq 50\%$  при концентрации 1 мкМ. После удаления клонов, которые либо плохо экспрессировались, либо были сочтены мультимерами в соответствии с данными эксклюзионной хроматографии, отобрали девять клонов для дополнительной биологической характеристики. Последовательности петель BC и FG данных клонов представлены в таблице 4. Восемь из девяти выбранных клонов имели общую последовательность петли FG (HNVYKDTNMRGL; SEQ ID NO: 95), и между несколькими клонами наблюдали существенное сходство в последовательностях петель BC.



Таблица 4

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

### **ПРИМЕР 3. Характеризация EGFR-связывающих доменов FN3, которые ингибируют связывание EGF**

#### **Крупномасштабная экспрессия, очистка и удаление эндотоксина**

9 доменов FN3, представленных в таблице 4, подвергли крупномасштабной экспрессии, чтобы получить больше материала для подробной характеристики. Культивируемую в течение ночи культуру, содержащую каждый из вариантов EGFR-связывающего домена FN3, инокулировали в 0,8 л бульонной питательной среды Terrific с добавлением 100 мкг/мл ампициллина с разбавлением 1/80 ночной культуры свежей средой и инкубировали при встряхивании при 37°C. Когда была достигнута оптическая плотность ~ 1,2–1,5 при 600 нм, культуру индуцировали путем добавления IPTG до конечной концентрации 1 мМ и снижали температуру до 30°C. Через 4 часа клетки собирали путем центрифугирования и клеточный осадок хранили при -80°C столько, сколько необходимо.

Для лизирования клеток оттаявший осадок повторно суспендировали в растворе 1X BugBuster® с добавлением 25 Е/мл Benzonase® (Sigma-Aldrich) и 1 тыс. ЕД/мл rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) в соотношении 5 мл BugBuster® на грамм осадка. Лизирование проводили в течение 1 часа при комнатной температуре с осторожным встряхиванием, затем центрифугировали при 56 000 x g в течение 50 минут при 4°C. Супернатант отбирали и фильтровали через фильтр 0,2 мкм, после чего наносили на 5-миллилитровую колонку HisTrap FF, предварительно доведенную до равновесного состояния при помощи буфера А (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) с применением хроматографической системы GE Healthcare ÄKTAexplorer 100s. Колонку промывали буфером А объемом, составляющим 20 объемов колонки, и дополнительно промывали 16% буфером В (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ NaCl, 250 мМ имидазола) с объемом, составляющим 6 объемов колонки. Домены FN3 элюировали 50% буфером В с объемом, составляющим 10 объемов колонки, а затем градиентом 50–100% буфера В с объемом, составляющим 6 объемов колонки. Фракции, содержащие белок домена FN3, объединяли, концентрировали с использованием концентратора

Millipore 10K MWC0 и фильтровали, после чего наносили на колонку HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare), предварительно доведенную до равновесного состояния PBS. Выбирали пик мономерного белка, элюирующийся из эксклюзионной колонки.

Эндотоксины удаляли, используя пакетный подход, при помощи смолы ActiClean Etox (Sterogene Bioseparations). Перед удалением эндотоксина смолу предварительно обрабатывали 1 н. NaOH в течение 2 часов при 37°C (или в течение ночи при 4°C) и обильно промывали PBS до стабилизации pH на уровне ~7 по измерениям с помощью индикаторной бумаги для определения pH. Очищенный белок фильтровали через фильтр 0,2 мкм, затем добавляли 1 мл смолы Etox в соотношении 10 мл белка на 1 мл смолы. Связывание эндотоксина со смолой проводили при комнатной температуре в течение, по меньшей мере, 2 часов при осторожном вращении. Смолу удаляли центрифугированием при 500 x g в течение 2 минут и отбирали белковый супернатант. Уровни эндотоксина измеряли с применением кассет EndoSafe®-PTS™ и анализировали на считывателе EndoSafe®-MCS (Charles River). Если уровень эндотоксина превышал 5 ЭЕ/мг после первой обработки Etox, описанную выше процедуру повторяли до тех пор, пока уровень эндотоксина не снижался до  $\leq 5$  ЭЕ/мг. Когда уровень эндотоксина был выше 5 ЭЕ/мг и стабилизировался после двух последовательных обработок Etox, для белка разрабатывали условия анионообменной или гидрофобной хроматографии для удаления оставшихся эндотоксинов.

#### **Определение аффинности выбранных EGFR-связывающих доменов FN3 к EGFR-Fc (аффинность к EGFR-Fc)**

Аффинность связывания выбранных EGFR-связывающих доменов FN3 с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR дополнительно характеризовали методами поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Proteon (BioRad). Схема анализа (подготовка чипа, захват EGFR-Fc) была аналогична описанной выше схеме применительно к анализу скорости диссоциации. Выбранные EGFR-связывающие домены FN3 тестировали в концентрации 1 мкМ в серии 3-кратных разбавлений в горизонтальной ориентации. Для отслеживания исходной стабильности также вводили образец буфера.

Фазу диссоциации для всех концентраций каждого EGFR-связывающего домена FN3 отслеживали при скорости потока 100 мкл/мин в течение 30 минут (для доменов с  $k_{off} \sim 10^{-2} \text{ с}^{-1}$  в соответствии с данными скринингового исследования скорости диссоциации) или 1 часа (для доменов с  $k_{off} \sim 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  или менее). Из данных ответов вычитали два набора эталонных данных: 1) сигналы между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между EGFR-связывающим доменом FN3 и поверхностью с иммобилизованными IgG; 2) сигналы канала буфера для коррекции смещения базовой линии из-за диссоциации со временем захваченного EGFR-Fc с поверхности. Обработанные данные связывания при всех концентрациях для каждого домена FN3 глобально аппроксимировали простой моделью связывания Ленгмюра 1:1 для получения кинетических констант ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и константы аффинности ( $K_D$ ). В таблице 5 представлены кинетические константы для каждого из конструкторов с аффинностью от 200 пМ до 9,6 нМ.

#### **Связывание выбранных EGFR-связывающих доменов FN3 с EGFR на клетках («анализ связывания с клетками A431»)**

Клетки A431 высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Очищенные EGFR-связывающие домены FN3 (от 1,5 нМ до 30 мкМ) добавляли к клеткам (50 мкл) в течение 1 часа при комнатной температуре в трех планшетах. Супернатант удаляли и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата антител к пентагистидину His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с помощью считывателя Asimen eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad

Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений  $EC_{50}$ . В таблице 5 представлены значения  $EC_{50}$  для каждого из конструкторов в диапазоне от 2,2 до > 20 мкМ.

**Ингибирование связывания EGF с EGFR на клетках с использованием выбранных EGFR-связывающих доменов FN3 (анализ конкуренции с EGF на клетках A431)**

Клетки A431 высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5%  $CO_2$ . Очищенные EGFR-связывающие домены FN3 (от 1,5 нМ до 30 мкМ) добавляли к клеткам (50 мкл/лунка) в течение 1 часа при комнатной температуре в трех планшетах. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по кат. E-3477) добавляли в каждую лунку с конечной концентрацией 30 нг/мл и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза буфером для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (Invitrogen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 600 нм с помощью считывателя Acumen eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений  $IC_{50}$ . В таблице 5 представлены значения  $IC_{50}$  для каждого из конструкторов в диапазоне от 1,8 до 121 нМ.

**Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR (анализ фосфо-EGFR)**

Выбранные домены FN3, которые в значительной степени ингибировали стимулированное EGF фосфорилирование EGFR, более полно оценивали путем измерения значений  $IC_{50}$  для ингибирования. Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR анализировали при разных концентрациях домена FN3 (от 0,5 нМ до

10 мкМ), как описано выше в разделе «ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR». Строили график зависимости сигнала электрохемилюминесценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определяли значения IC<sub>50</sub> путем аппроксимации данных сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). В таблице 5 представлены значения IC<sub>50</sub> для каждого из конструктов в диапазоне от 18 нМ до > 2,5 мкМ.

#### **Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток (анализ роста клеток NCI-H292 и NCI-H322)**

Ингибирование EGFR-зависимого роста клеток оценивали по измерению жизнеспособности клеток человеческих опухолевых клеточных линий со сверхэкспрессией EGFR, NCI-H292 и NCI-H322 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1848 и CRL-5806 соответственно) после воздействия EGFR-связывающим доменом FN3. Клетки высевали по 500 клеток/лунка (NCI-H292) или по 1000 клеток/лунка (NCI-H322) на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (Nunc), в среду RPMI (Gibco) 100 мкл/лунка, содержащую GlutaMAX™ и 10 мМ HEPES, с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco), и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали фосфатно-буферным соляным раствором (PBS), содержащим разные концентрации EGFR-связывающих доменов FN3, по 5 мкл/лунка. Контроли обрабатывали 5 мкл/лунка только PBS или 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты в PBS. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 120 часов. Жизнеспособные клетки обнаруживали путем добавления 75 мкл/лунка реагента CellTiter-Glo® (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 2 минут и инкубацией в темноте при комнатной температуре в течение дополнительных 10 минут. Планшеты считывали на считывателе для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices) в режиме люминесценции с временем считывания 0,5 секунды/лунка по сравнению с пустой средой. Строили график

зависимости процента роста обработанных PBS клеток от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения  $IC_{50}$  определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном с использованием GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). В таблице 5 представлены значения  $IC_{50}$  в диапазоне от 5,9 нМ до 1,15 мкМ и от 9,2 нМ до >3,1 мкМ при применении клеток NCI-H292 и NCI-H322 соответственно.

В таблице 5 представлена сводная информация по биологическим свойствам EGFR-связывающих доменов FN3 для каждого анализа.

Таблица 5

Идентификатор клона домена FN3	SEQ ID NO:	Аффинность к EGFR-Fc (нМ)	Связывание с клетками A431	Конкуренция с EGF на клетках A431	Фосфо-EGFR	Рост NCI- H292	Рост NCI- H322
			EC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)
P53A1R5-17	18	1,89	4,0	9,8	> 2500	86	65
P54AR4-17	19	9,62	16	21	184	H/o	H/o
P54AR4-47	20	2,51	8,6	7,1	295	44	39
P54AR4-48	21	7,78	12	9,8	170	H/o	H/o
P54AR4-73	22	0,197	9,4	4,6	141	83	73
P54AR4-74	23	H/o	77	H/o	H/o	H/o	H/o
P54AR4-81	24	H/o	84	121	H/o	H/o	H/o
P54AR4-83	25	0,255	2,2	1,8	18	5,9	9,2
P54CR4-31	26	0,383	> 20000	55	179	1150	> 3073



**ПРИМЕР 4. Конструирование EGFR-связывающих доменов FN3**

Было сконструировано подмножество EGFR-связывающих доменов FN3 для увеличения конформационной стабильности каждой молекулы. Мутации L17A, N46V и E86I (описаны в патентной публикации США № 2011/0274623) были введены в клоны P54AR4-83, P54CR4-31 и P54AR4-37 путем синтеза ДНК. Новые мутанты, P54AR4-83v2, P54CR431-v2 и P54AR4-37v2, экспрессировали и очищали так, как описано выше. Для оценки стабильности каждого мутанта для сравнения с соответствующей исходной молекулой применяли дифференциальную сканирующую калориметрию в PBS. В таблице 6 показано, что каждый клон в значительной степени стабилизировали со средним увеличением  $T_m=18,5$  °C.

Таблица 6

Клон домена FN3	SEQ ID NO:	$T_m$ (°C)
P54AR4-83	25	50,6
P54AR4-83v2	27	69,8
P54CR4-31	26	60,9
P54CR4-31v2	28	78,9
P54AR4-37	22	45,9
P54AR4-37v2	29	64,2

**ПРИМЕР 5. Введение цистеина и химическая конъюгация EGFR-связывающих доменов FN3**

Цистеиновые мутанты доменов FN3 получали из базовой молекулы Tenson и ее вариантов, которые не содержат цистеиновых остатков. Эти мутации можно получить с применением стандартных методик молекулярной биологии, известных в данной области, чтобы ввести уникальный цистеиновый остаток в базовую последовательность Tenson (SEQ ID NO: 1) или в другие домены FN3, чтобы он служил сайтом для химической конъюгации с низкомолекулярными лекарственными средствами, флуоресцентными метками, полиэтиленгликолем или любым числом других химических объектов. Выбираемый для мутации сайт должен удовлетворять определенным критериям. Например, молекула Tenson, в которую

вводятся мутации для получения свободного цистеина, должна: (i) хорошо экспрессироваться в *E. coli*; (ii) сохранять высокий уровень растворимости и термической стабильности; и (iii) сохранять связывание с мишенью-антигеном после конъюгации. Поскольку Tenson-каркас содержит всего ~90–95 аминокислот, можно легко сконструировать варианты с одиночным цистеином в каждом положении каркаса и точно определить идеальное (-ые) положение (-я) для химической конъюгации.

Каждый отдельный аминокислотный остаток в положениях 1–95 (или 2–96 при наличии N-концевого метионина) мутанта P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), связывающегося с EGFR, меняли на цистеин для оценки наилучших сайтов для химической конъюгации.

#### Конструирование, экспрессия и очистка

Аминокислотную последовательность каждого отдельного цистеинового варианта P54AR4-83v2 обратно транслировали в нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, с применением предпочтительных для экспрессии в *E. coli* кодонов, и получали синтетический ген (ДНК 2.0). Эти гены клонировали в вектор pJexpress401 (ДНК 2.0) для экспрессии, стимулируемой промоторной последовательностью T5, и трансформировали в штамм *E. coli* BL21(Agilent). Библиотека «cys-сканирования» P54AR4-83v2 была получена в виде наборов в глицерине, нанесенных на 96-луночный планшет, и экспрессию и очистку каждого гена проводили в соответствии с процедурой, описанной в примере 2.

#### Химическая конъюгация

В случае библиотеки «cys-сканирования» P54AR4-83v2 конъюгация была встроена в процесс очистки. Цистеиновые варианты в очищенном лизате связывали со смолой Ni-NTA в 96-луночном формате с применением планшетов His-trap HP (№ по кат. 28-4008-29, GE Healthcare) путем добавления лизатов в лунки и центрифугирования при 100×g в течение 5 мин. Смолу 3 раза промывали буфером А, а затем добавляли N-этилмалеимид (NEM) в виде 500 мкл 1,5 мМ раствора. После часовой инкубации при комнатной температуре на вращательном шейкере излишки NEM удаляли путем центрифугирования и трех промывок буфером А.

Конъюгированные цистеиновые варианты элюировали 2×150 мкл буфера В и меняли на PBS на фильтрующих планшетах MultiScreen с мембраной Ultracel-10 (№ по кат. MAUF1010, Millipore) или 96-луночных планшетах PD MultiTrap (№ по кат. 28-9180-06, GE Healthcare). Конъюгаты характеризовали с помощью масс-спектрометрии (таблица 7). Цистеиновые варианты, которые плохо экспрессировались (менее чем 0,1 мг полученного белка из 5 мл культуры или белок не детектируется масс-спектрометрией) или плохо конъюгировались с NEM (менее чем 80% конъюгированных по данным масс-спектрометрии) исключали из дополнительного анализа. При этом из-за плохой экспрессии убрали L1C, W21C, Q36C, E37C, A44C, D57C, L61C, Y67C и F92C, а из-за низкой эффективности конъюгации - A17C, L19C, I33C, Y35C, Y56C, L58C, T65C, V69C, I71C и T94C.

Таблица 7

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Выход белка (мг)	Конъюгация
L1C	0,58	Белок не определялся
P2C	0,28	Да
A3C	1,05	Да
P4C	0,77	Да
K5C	0,19	Да
N6C	0,56	Да
L7C	0,96	Да
V8C	1,40	Да
V9C	0,92	Да
S10C	0,91	Да
E11C	0,82	Да
V12C	0,76	Да
T13C	0,53	Да
E14C	1,05	Да
D15C	1,12	Да
S16C	0,65	Да
A17C	0,70	Нет

R18C	1,14	Да
L19C	0,47	Нет
S20C	1,02	Да
W21C	0,09	Нет белка
D22C	0,80	Да
D23C	0,90	Да
P24C	0,63	Да
W25C	1,24	Да
A26C	1,34	Да
F27C	0,92	Да
Y28C	1,15	Да
E29C	1,10	Да
S30C	0,80	Да
F31C	0,75	Да
L32C	0,64	Да
I33C	0,09	Нет
Q34C	1,14	Да
Y35C	0,85	Нет
Q36C	0,04	Нет белка
E37C	0,84	Нет белка
S38C	0,80	Да
E39C	0,72	Да
K40C	1,20	Да
V41C	0,99	Да
G42C	1,27	Да
E43C	0,22	Да
A44C	0,07	Да
I45C	1,14	Да
V46C	0,14	Да
L47C	1,12	Да
T48C	1,22	Да
V49C	1,10	Да
P50C	0,69	Да
G51C	1,15	Да

S52C	0,24	Да
E53C	1,13	Да
R54C	1,55	Да
S55C	0,88	Да
Y56C	1,71	Нет
D57C	0,09	Нет белка
L58C	0,59	Нет
T59C	0,80	Да
G60C	1,24	Да
L61C	0,05	Нет белка
K62C	1,12	Да
P63C	1,44	Да
G64C	1,30	Да
T65C	0,90	Нет
E66C	0,20	Да
Y67C	0,06	Нет белка
T68C	0,76	Да
V69C	0,62	Нет
S70C	0,59	Да
I71C	0,77	Нет
Y72C	1,22	
G73C	0,83	Да
V74C	0,52	Да
H75C	0,55	Да
N76C	1,10	Да
V77C	1,12	Да
Y78C	1,29	Да
K79C	0,29	Да
D80C	1,23	Да
T81C	0,59	Да
N82C	0,14	Да
M83C	1,03	Да
R84C	1,40	Да
G85C	1,17	Да

L86C	0,52	Да
P87C	1,53	Да
L88C	1,68	Да
S89C	1,20	Да
A90C	0,71	Да
I91C	0,64	Да
F92C	0,05	Нет белка
T93C	0,64	Да
T94C	0,26	~50% конъюгированного
G95C	0,88	Да
83v2His6-cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	1,28	Да

#### Аналитическая эксклюзионная хроматография

Эксклюзионную хроматографию для каждого из конъюгированных с NEM цистеиновых вариантов P54AR4-83v2 выполняли так, как описано в примере 2. Результаты представлены в таблице 8. Процентную долю мономера для каждого белка определяли путем интегрирования сигнала Abs280 и сравнения пика в области мономера (5,5–6 минут) с пиками в области олигомеров (4–5,3 минуты).

Таблица 8

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Процентная доля мономера
L1C	100
P2C	86
A3C	100
P4C	100
K5C	100
N6C	94
L7C	93
V8C	91
V9C	Двойной пик
S10C	80
E11C	100
V12C	66

T13C	82
E14C	96
D15C	97
S16C	75
A17C	93
R18C	93
L19C	83
S20C	94
W21C	Нет белка
D22C	85
D23C	100
P24C	88
W25C	76
A26C	95
F27C	97
Y28C	92
E29C	85
S30C	94
F31C	57
L32C	100
I33C	100
Q34C	97
Y35C	100
Q36C	100
E37C	87
S38C	93
E39C	100
K40C	97
V41C	98
G42C	87
E43C	100
A44C	100
I45C	97
V46C	100

L47C	100
T48C	90
V49C	88
P50C	100
G51C	96
S52C	100
E53C	97
R54C	96
S55C	100
Y56C	97
D57C	100
L58C	67
T59C	100
G60C	100
L61C	нет белка
K62C	95
P63C	92
G64C	100
T65C	83
E66C	100
Y67C	Нет белка
T68C	100
V69C	90
S70C	100
I71C	Двойной пик
Y72C	100
G73C	66
V74C	100
H75C	100
N76C	94
V77C	92
Y78C	90
K79C	100
D80C	79



T81C	86
N82C	100
M83C	91
R84C	100
G85C	95
L86C	83
P87C	98
L88C	98
S89C	96
A90C	100
I91C	100
F92C	Нет белка
T93C	100
T94C	100
G95C	100
83v2His <sub>6</sub> -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	97

#### Анализ связывания EGFR

Относительную аффинность связывания конъюгированных с NEM цистеиновых вариантов P54AR4-83v2 с EGFR оценивали так, как описано в примере 2. В таблице 9 представлены сводные данные, показывающие отношения значений аффинности связывания каждого цистеинового варианта с EGFR относительно исходного белка P54AR4-83v2. Цистеиновые конъюгаты, которые имели уменьшенное связывание с EGFR (< 65% от сигнала, наблюдаемого для исходного белка P54AR4-83v2 при обработке 10 нМ белка) по данным иммуноферментного анализа (ИФА), были исключены из дополнительного анализа: P2C, A3C, P4C, K5C, L7C, D23C, W25C, F27C, Y28C, F31C, S55C, G73C, H75C, V77C, Y78C, T81C, N82C, M83C и G85C.

Таблица 9

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Количество варианта в анализе: 500 нМ	100 нМ	10 нМ
P2C	0,01	0,00	0,00
A3C	0,82	0,88	0,34
P4C	0,12	0,02	0,02

K5C	0,92	1,06	0,61
N6C	0,89	1,01	0,76
L7C	0,90	1,00	0,35
V8C	0,90	1,03	0,96
V9C	0,93	1,03	0,94
S10C	0,96	1,07	0,83
E11C	0,95	1,08	0,90
V12C	0,93	1,06	0,87
T13C	0,90	1,04	0,87
E14C	1,15	1,27	1,11
D15C	0,97	1,09	0,98
S16C	0,63	1,05	0,88
R18C	0,94	1,05	0,86
S20C	0,91	1,05	0,81
D22C	0,90	1,02	0,84
D23C	0,40	0,20	0,02
P24C	0,83	0,85	0,45
W25C	0,70	0,64	0,38
A26C	0,95	1,06	0,95
F27C	0,23	0,07	0,00
Y28C	0,09	0,01	0,00
E29C	0,93	1,07	0,89
S30C	0,90	1,02	0,90
F31C	0,62	0,34	0,04
L32C	0,91	1,01	0,87
Q34C	0,94	1,03	0,89
S38C	0,82	0,93	0,80
E39C	0,90	1,00	0,90
K40C	0,86	0,95	0,88
V41C	0,95	0,99	0,92
G42C	0,90	0,99	0,84
E43C	0,92	1,04	0,68
I45C	0,93	1,04	0,91
V46C	0,90	1,01	0,61

L47C	0,91	1,02	0,92
T48C	0,93	1,00	0,88
V49C	0,98	1,01	0,96
P50C	0,97	1,05	0,91
G51C	0,92	1,03	0,88
S52C	0,93	1,03	0,78
E53C	0,91	1,02	0,91
R54C	0,93	1,01	0,89
S55C	0,11	0,00	0,00
T59C	0,93	1,04	0,83
G60C	0,93	1,02	0,86
K62C	0,61	0,73	0,64
P63C	0,92	1,02	0,95
G64C	1,36	1,42	1,28
E66C	H/0	H/0	H/0
T68C	0,95	1,04	0,83
S70C	0,93	1,01	0,86
Y72C	0,93	1,00	0,93
G73C	0,21	0,02	0,00
V74C	0,95	1,01	0,76
H75C	0,25	0,19	0,07
N76C	0,91	0,97	0,75
V77C	0,03	0,00	0,03
Y78C	0,68	0,63	0,31
K79C	0,93	0,99	0,90
D80C	0,91	0,97	0,70
T81C	1,02	0,90	0,50
N82C	0,96	0,97	0,56
M83C	0,24	0,04	0,07
R84C	0,98	1,04	0,91
G85C	0,29	0,02	0,19
L86C	0,92	0,96	0,77
P87C	0,91	0,93	0,73
L88C	0,97	1,03	0,95

S89C	1,04	1,02	0,97
A90C	1,01	1,05	0,94
I91C	1,00	1,01	0,90
T93C	1,04	1,05	0,96
G95C	1,00	1,03	1,01
83v2His <sub>6</sub> -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	1,00	1,00	1,00

#### Термическая стабильность

Термическую стабильность конъюгатов цистеин-NEM оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Тестировали только конъюгаты, которые были определены как экспрессирующиеся с высокой эффективностью, эффективно конъюгируемые и сохраняющие связывание с EGFR. Кроме того, были исключены цистеиновые варианты внутри петель BC и FG. Данные по стабильности получали путем нагревания 400 мкл аликвоты варианта от 25°C до 100°C при скорости нагрева 1°C в минуту в микрокалориметре VP-DSC (MicroCal). Для оценки обратимости термического сворачивания/разворачивания провели на образце второе идентичное сканирование. Для вычисления температуры плавления полученные данные аппроксимировали в модели разворачивания с 2 состояниями (таблица 10). Из дополнительного анализа были исключены цистеиновые варианты со сниженными температурами плавления ( $\leq 63^\circ\text{C}$  или на  $> 8^\circ\text{C}$  ниже, чем у исходного белка P54AR4-83v2) или варианты, демонстрирующие необратимое разворачивание: V9C, V12C, T13C, R18C, E29C, E39C, G42C, V49C, P50C, G51C и P63C.

Таблица 10

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Первое сканирование, T <sub>m</sub> (°C)	Второе сканирование, T <sub>m</sub> (°C)	Обратимо?
N6C	71	70	Да
V8C	69	69	Да
V9C	46	46	Нет
S10C	68	68	Да

E11C	71	72	Да
V12C	58	58	Да
T13C	63	63	Да
E14C	70	71	Да
D15C	73	73	Да
S16C	68	68	Да
R18C	62	62	Да
S20C	70	70	Да
E29C	63	66	Да
S30C	71	71	Да
L32C	71	70	Да
Q34C	75	74	Да
S38C	65	65	Да
E39C	67	69	Нет
K40C	70	70	Да
V41C	71	71	Да
G42C	65	67	Нет
I45C	69	68	Да
L47C	67	67	Да
T48C	72	72	Да
V49C	54	55	Нет
P50C	63	65	Нет
G51C	61	61	Да
E53C	76	75	Да
R54C	65	65	Да
T59C	67	67	Да
G60C	66	66	Да
K62C	65	65	Да
P63C	60	62	Нет
G64C	70	70	Да
T68C	72	72	Да
S70C	73	72	Да
Y72C	70	69	Да
V74C	68	67	Да

L88C	70	70	Да
S89C	72	71	Да
A90C	67	67	Да
I91C	70	69	Да
T93C	69	69	Да
83v2His <sub>6</sub> -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	71	71	Да
P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27)	71	71	Да

#### Анализ цитотоксичности

Цистеиновые варианты P54AR4-83v2 конъюгировали с цитотоксическим ингибитором тубулина монометилауристатином F (MMAF) посредством отщепляемого ферментом линкера Val-Cit или неотщепляемого линкера PEG<sub>4</sub> (VC-MMAF; см. Фиг. 2) с применением методологии, описанной для конъюгации с NEM. Выполняли конъюгацию 32 вариантов, оставшихся после исключений на предыдущих этапах, с исходным белком P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 217 и 255) и Tenson (SEQ ID NO: 265) в качестве отрицательного контроля.

Уничтожение клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток человеческой опухолевой линии H1573 со сверхэкспрессией EGFR после воздействия конъюгатов цистеиновых вариантов с цитотоксином. Клетки высевали на черные планшеты с прозрачным дном, обработанные для культивирования клеток (Falcon 353219), в количестве 7000/лунка, 100 мкл на лунку среды RPMI без фенолового красного (Gibco 11835-030) с 5% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco). Клетки оставляли на ночь для прикрепления при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Среду отсасывали из 96-луночного планшета и клетки обрабатывали 50 мкл свежей среды и 50 мкл 2X ингибитора, приготовленного в свежей среде. Жизнеспособность клеток определяли по анализу по конечной точке с помощью Cell TiterGlo (Promega) через 70 часов. Значения IC<sub>50</sub> определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном с использованием GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). В таблице 11 приведены

значения  $IC_{50}$ , полученные на основе данных анализа CellTiter Glo. Среднее значение  $IC_{50}$  для двух повторностей конъюгата 83v2-cys/vcMMAF составляло 0,7 нМ. Четыре из 32 протестированных конъюгатов имели значения  $IC_{50}$ , которые более чем в два раза превышали значение для исходного белка (более 1,4 нМ), и были отброшены: L32C, T68C, Y72C и V74C. Кроме того, три конъюгата давали значения  $IC_{50}$ , в два раза более эффективные, чем у исходного белка, и они могут особенно хорошо подходить для преобразования в конъюгаты лекарственного средства: N6C, E53C и T93C.

Таблица 11

Вариант	$IC_{50}$ (нМ)
N6C	0,16
V8C	0,35
S10C	0,43
E11C	0,94
E14C	0,34
D15C	0,33
S16C	0,75
S20C	0,36
S30C	0,78
L32C	2,92
Q34C	0,74
S38C	0,76
K40C	0,73
V41C	1,13
I45C	0,63
L47C	1,03
T48C	0,59
E53C	0,09
R54C	0,37
T59C	0,44
G60C	1,00
K62C	1,25
G64C	0,36
T68C	3,70
S70C	1,14
Y72C	1,85
V74C	3,13
L88C	0,81
S89C	0,94

A90C	1,00
I91C	0,54
T93C	0,20
83v2His <sub>6</sub> -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	0,61
83v2His <sub>6</sub> -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	0,79
Д.т.	146,00
Д.т.	166,30

#### Конечные цистеиновые варианты

Было показано, что из 96 протестированных положений для 28 цистеиновых вариантов наблюдалось выполнение критериев сохранения высокого уровня экспрессии в *E. coli*, эффективной конъюгации посредством тиол-малеимидной реакции, сохранения связывания с антигеном-мишенью EGFR, сохранения свойств термостабильности и обратимого разворачивания и сохранения способности к уничтожению клеток с высокой экспрессией EGFR при конъюгации цистеинового варианта с цитотоксическим лекарственным средством. Эти положения таковы: N6C (SEQ ID NO: 210 и 248), V8C (SEQ ID NO: 189 и 227), S1°C (SEQ ID NO: 190 и 228), E11C (SEQ ID NO: 191 и 229), E14C (SEQ ID NO: 192 и 230), D15C (SEQ ID NO: 193 и 231), S16C (SEQ ID NO: 194 и 232), S2°C (SEQ ID NO: 195 и 233), S3°C (SEQ ID NO: 196 и 234), Q34C (SEQ ID NO: 197 и 235), S38C (SEQ ID NO: 198 и 236), K4°C (SEQ ID NO: 199 и 237), V41C (SEQ ID NO: 200 и 238), I45C (SEQ ID NO: 201 и 239), L47C (SEQ ID NO: 202 и 240), T48C (SEQ ID NO: 203 и 241), E53C (SEQ ID NO: 204 и 242), R54C (SEQ ID NO: 205 и 243), T59C (SEQ ID NO: 206 и 244), G6°C (SEQ ID NO: 207 и 245), K62C (SEQ ID NO: 208 и 246), G64C (SEQ ID NO: 209 и 247), T68C (SEQ ID NO: 210 и 248), S7°C (SEQ ID NO: 211 и 249), L88C (SEQ ID NO: 212 и 250), S89C (SEQ ID NO: 213 и 251), A9°C (SEQ ID NO: 214 и 252), I91C (SEQ ID NO: 215 и 253) и T93C (SEQ ID NO: 216 и 254). Местоположения этих 28 положений в пределах структуры белка 83v2 показаны на Фиг. 3.

**ПРИМЕР 6.** Выбор доменов фибронектина типа III (FN3), связывающихся с c-Met и ингибирующих связывание с HGF

#### **Пэннинг на человеческом c-Met**

Проводили скрининг библиотеки TCL14 на биотинилированный внеклеточный домен человеческого c-Met (bt-c-Met) для



идентификации доменов FN3, способных к специфическому связыванию с с-Met. Для выбора 3 мкг библиотеки TCL14 транскрибировали и транслировали *in vitro* (IVTT) в линейном экстракте S30 *E. Coli* (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США) и экспрессированную библиотеку блокировали Cis Block (2% BSA (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, штат Миссури, США), 100 мкг/мл ДНК спермы сельди (Promega) и 1 мг/мл гепарина (Sigma-Aldrich)). Для выбора добавляли bt-c-Met в концентрациях 400 нМ (цикл 1), 200 нМ (циклы 2 и 3) и 100 нМ (циклы 4 и 5). Связанные элементы библиотеки извлекали с применением магнитных гранул с нейтравидином (Thermo Fisher, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США) (циклы 1, 3 и 5) или магнитных гранул со стрептавидином (Promega) (циклы 2 и 4), а несвязанные элементы библиотеки удаляли путем промывки гранул 5–14 раз 500 мкл PBS-T с последующей 2-кратной промывкой 500 мкл PBS.

Выполняли дополнительные циклы выбора для идентификации молекул доменов FN3 с улучшенными значениями аффинности. Вкратце, результаты цикла 5 получали так, как описано выше, и подвергали дополнительным итерационным циклам выбора со следующими изменениями: инкубацию с bt-c-Met уменьшили с 1 часа до 15 минут, продолжительность захвата на гранулы снизили с 20 минут до 15 минут, концентрацию bt-c-Met уменьшили до 25 нМ (циклы 6 и 7) или 2,5 нМ (циклы 8 и 9) и провели дополнительную промывку в присутствии избытка небиотинилированного с-Met в течение 1 часа. Цель данных изменений заключалась в одновременном выборе связующих с потенциально более высокой скоростью ассоциации и более низкой скоростью диссоциации, что позволяет получить по существу меньшее значение  $K_D$ .

Продукты циклов 5, 7 и 9 клонировали с помощью ПЦР в модифицированный вектор pET15 (EMD Biosciences, г. Гиббстаун, штат Нью-Джерси, США), содержащий сайт безлигазного клонирования (pET15-LIC), с применением праймеров TCON6 (SEQ ID NO: 30) и TCON5 E86I short (SEQ I D NO: 31), а белки экспрессировали как белки с His6-тегом на C-конце после преобразований и индукции IPTG (конечная концентрация 1 мМ, 30°C в течение 16 часов) с

применением стандартных протоколов. Клетки собирали путем центрифугирования и затем лизировали с помощью Bugbuster HT (EMD Biosciences) с добавлением 0,2 мг/мл лизоцима из белка куриного яйца (Sigma-Aldrich). Бактериальные лизаты очищали путем центрифугирования и супернатанты переносили в новые 96-луночные планшеты deep-well.

#### **Скрининг на домены FN3, ингибирующие связывание HGF с c-Met**

Домены FN3, присутствующие в лизатах *E. coli*, подвергали скринингу на их способность ингибировать связывание HGF с очищенным внеклеточным доменом c-Met в биохимическом формате. Рекомбинантный человеческий химерный белок c-Met Fc (0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунка) наносили на 96-луночные планшеты White Maxisorp Plates (Nunc) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты дважды промывали, используя 300 мкл/лунка трис-буферного соляного раствора с 0,05% Tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich) в приборе для промывки планшетов Biotek. Планшеты для анализа блокировали StartingBlock T20 (200 мкл/лунка, Thermo Fisher Scientific, г. Рокленд, штат Иллинойс, США) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) при встряхивании и повторно дважды промывали 300 мкл TBS-T. Лизаты с доменом FN3 разбавляли в StartingBlock T20 (от 1:10 до 1:100000) с помощью роботизированной системы Hamilton STARplus. Лизаты (50 мкл/лунка) инкубировали на планшетах для анализа в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Без промывки планшетов добавляли bt-HGF (1 мкг/мл в StartingBlock T20, 50 мкл/лунка, биотинилированный) на 30 мин при комнатной температуре при встряхивании. В контрольные лунки, содержащие лизаты Tencon27, добавляли либо Starting Block T20, либо разбавленный bt-HGF. Затем планшеты промывали четыре раза 300 мкл/лунка TBS-T и инкубировали с 100 мкл/лунка Streptavidin-HRP (1:2000 в TBS-T, Jackson ImmunoResearch, г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) в течение 30–40 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты повторно промывали TBS-T четыре раза. Для формирования сигнала на планшет добавляли хемилюминесцентный субстрат, POD Chemiluminescence Substrate (50

мкл/лунка, Roche Diagnostics, г. Индианаполис, штат Индиана, США), полученный в соответствии с инструкциями производителя, и в течение приблизительно 3 минут регистрировали хемилюминесценцию на приборе Molecular Devices M5 с использованием SoftMax Pro. Процентное ингибирование определяли с применением следующих расчетов:  $100 - ((RLU_{\text{образец}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}}) / (\text{среднее } RLU_{\text{контроль bt-HGF}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}}) * 100)$ . Значения процентного ингибирования 50% или более считались успешными.

### **Высокопроизводительная экспрессия и очистка доменов FN3**

Домены FN3 с His-тегом очищали из лизатов *E. coli* с использованием планшетов His MultiTrap™ HP (GE Healthcare) и элюировали в буфере, содержащем 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и 250 мМ имидазола, pH 7,4. В очищенных образцах для анализа заменяли буфер на PBS, pH 7,4, с применением планшетов PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare).

### **Определение IC<sub>50</sub> для ингибирования связывания HGF с c-Met**

Выбранные домены FN3 дополнительно характеризовали в анализе на конкуренцию с HGF. Строили кривые «доза - ответ» для очищенных доменов FN3 с использованием описанного выше анализа (начальные концентрации - 5 мкМ). Вычисляли значения процентного ингибирования. Строили график зависимости % ингибирования от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определяли значения IC<sub>50</sub> путем аппроксимации данных сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4.

В цикле 5 идентифицировали 35 уникальных последовательностей, показывающих активность при разбавлениях 1:10 со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,5 до 1500 нМ. В цикле 7 получали 39 уникальных последовательностей с активностью при разбавлениях 1:100 и значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,16 до 2,9 нМ. В цикле 9 идентифицировали 66 уникальных последовательностей, среди которых удачными считались варианты, демонстрирующие активность при разбавлениях 1:1000. В цикле 9 (таблица 13) наблюдали значения IC<sub>50</sub> лишь 0,2 нМ.

### **ПРИМЕР 7. Характеризация доменов FN3, связывающихся с c-Met**

**и ингибирующих связывание HGF**

Домены FN3 экспрессировали и очищали так, как описано выше в примере 2. Эксклюзионную хроматографию и кинетический анализ проводили так, как описано выше в примерах 1 и 2 соответственно. В таблице 12 показаны последовательности тяжа С, петли CD, тяжа F и петли FG, а также полная аминокислотная последовательность SEQ ID NO: для каждого домена.

Таблица 12

Клон		Петля С	Тяж CD	Петля F	Тяж FG
Название	SEQ ID NO:				
P114AR5P74-A5	32	FDSFWIRYDE	WVGGE	TEYYVNILGV	KGGSISV
P114AR5P75-E9	33	FDSFFIRYDE	FLRSGE	TEYWVTILGV	KGGLVST
P114AR7P92-F3	34	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYIVNIMGV	KGGSISH
P114AR7P92-F6	35	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNILGV	KGGGLSV
P114AR7P92-G8	36	FDSFVIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P92-H5	37	FDSFWIRYLE	FLLGGE	TEYAWQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P93-D11	38	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVGINGV	KGGYSSY
P114AR7P93-G8	39	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYGVTINGV	KGGRVST
P114AR7P93-H9	40	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYWQIIGV	KGGHISL
P114AR7P94-A3	41	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGKISP
P114AR7P94-E5	42	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYAVNIMGV	KGGRVSV
P114AR7P95-B9	43	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGSISV

P114AR7P95-D3	44	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGSISY
P114AR7P95-D4	45	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P95-E3	46	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P95-F10	47	FDSFWIRYFE	FTTAGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-G7	48	FDSFWIRYFE	LISTGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP

Остатки петли C соответствуют остаткам 28–37 указанной SEQ ID NO:

Остатки тяжа CD соответствуют остаткам 38–43 указанной SEQ ID NO:

Остатки петли F соответствуют остаткам 65–74 указанной SEQ ID NO:

Остатки тяжа FG соответствуют остаткам 75–81 указанной SEQ ID NO:

#### **Связывание выбранных с-Met-связывающих доменов FN3 с с-Met на клетках**

Клетки NCI-H441 (№ по кат. НТВ-174, Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США) высевали по 20 000 клеток на лунку на покрытые поли-D-лизинном черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США) и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Очищенные домены FN3 (50 мкл/лунка; 0–1000 нМ) добавляли к клеткам на 1 час при 4°C на двух планшетах. Супернатанты удаляли и клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка, BD Biosciences, № по кат. 554657). Клетки инкубировали с биотинилированным антителом к HIS (с разбавлением 1:160 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл/лунка, R&D Systems, № по кат. ВAM050) в течение 30 минут при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания

при FACS (150 мкл/лунка), после чего инкубировали с конъюгированными антителами к мышиному IgG1-Alexa 488 (с разбавлением 1:80 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл/лунка, Life Technologies, № по кат. A21121) в течение 30 минут при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка) и оставляли в буфере для окрашивания при FACS (50 мкл/лунка). Определяли полную флуоресценцию на считывателе Acumen eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений EC<sub>50</sub>. Было обнаружено, что домены FN3 показывают диапазон значений активности связывания со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 1,4 до 22,0, как показано в таблице 13.

#### **Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования c-Met**

Очищенные домены FN3 тестировали на их способность ингибировать стимулированное HGF фосфорилирование c-Met в NCI-H441 с применением набора c-Met phospho(Tyr1349) производства Meso Scale Discovery (г. Гейтерсберг, штат Мерилэнд, США). Клетки высевали по 20 000/лунка на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани, в среду RPMI 100 мкл/лунка (содержащую GlutaMax и HEPES, Life Technologies), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Life Technologies) и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в условиях голодания в бессывороточной среде RPMI (100 мкл/лунка) при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Затем к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI (100 мкл/лунка), содержащую домены FN3 в концентрации 20 мкМ и ниже, на 1 час при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Контроли обрабатывали только средой. Клетки стимулировали 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF (100 мкл/лунка, R&D Systems, № по кат. 294-HGN) и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в течение 15 минут. Один набор контрольных лунок оставляли без стимуляции в качестве отрицательных контролей. Среду полностью

удаляли и лизировали клетки полным лизирующим буфером Complete Lysis Buffer (50 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) в течение 10 минут при комнатной температуре со встряхиванием в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты для анализа, предназначенные для измерения фосфорилированного c-Met, блокировали входящим в комплект блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты трижды промывали Tris Wash Buffer (200 мкл/лунка, Meso Scale Discovery). Клеточные лизаты (30 мкл/лунка) наносили на планшеты для анализа и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа. Затем планшеты для анализа четырехкратно промывали Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли ледяной раствор детекторного антитела (25 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) на 1 час при комнатной температуре со встряхиванием. Планшеты повторно четырехкратно промывали Tris Wash Buffer. Сигналы обнаруживали путем добавления буфера 150 Read Buffer (150 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) и считывания на приборе SECTOR® Imager 6 000 (Meso Scale Discovery) с применением заданных производителем параметров для данного анализа по умолчанию. Строили график зависимости сигнала электрохемилюминесценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определили значения  $IC_{50}$  путем аппроксимации данных сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. Было обнаружено, что домены FN3 ингибировали фосфорилированные c-Met со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 4,6 до 1415 нМ, как показано в таблице 13.

#### **Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток**

Ингибирование c-Met-зависимого роста клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток U87-MG (Американская коллекция типовых культур, № по кат. НТВ-14) после воздействия c-Met-связывающих доменов FN3. Клетки высевали по 8000 клеток на лунку на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл/лунка с добавлением 10% FBS и позволяли им прикрепиться в течение ночи

при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через двадцать четыре часа после высевания среду отсасывали и к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI. Через двадцать четыре часа после обработки бессывороточной средой клетки обрабатывали путем добавления бессывороточной среды, содержащей с-Met-связывающие домены FN3 (30 мкл/лунка). Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов. Жизнеспособные клетки обнаруживали путем добавления 100 мкл/лунка реагента CellTiter-Glo® (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 10 минут. Планшеты считывали на считывателе для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices), настроенном на режим люминесценции, с временем считывания 0,5 секунды/лунка. Строили график зависимости исходных единиц люминесценции (RLU) от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения IC<sub>50</sub> определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. В таблице 13 показаны значения IC<sub>50</sub> в диапазоне от 1 нМ до > 1000 нМ.



Сводная информация по биологическим свойствам с-Met-связывающих доменов FN3

Клон		Аффинность (Kd, нМ)	Конкуренция с HGF, IC <sub>50</sub> (нМ)	Связывание с клетками H441 (EC <sub>50</sub> , нМ)	Ингибирование pMet в клетках H441 (IC <sub>50</sub> , нМ)	Ингибирование пролиферации клеток U87-MG (IC <sub>50</sub> , нМ)
Название	SEQ ID NO:					
P114ARSP74-A5	32	10,1	5,2	18,7	1078	464,4
P114AR5P75-E9	33	45,8	51,9	H/o	1415	1193,9
P114AR7P92-F3	34	0,4	0,2	1,5	8,3	2,7
P114AR7P92-F6	35	3,1	2,2	4,9	165,3	350,5
P114AR7P92-G8	36	1,0	1,6	S,9	155,3	123,9
P114AR7P92-H5	37	11,6	H/o	22,0	766,4	672,3
P114AR7P93-D11	38	H/o	H/o	2,3	16	14,4
P114AR7P93-G8	39	6,9	1	3,8	459,5	103,5
P114AR7P93-H9	40	3,3	2,9	1,2,9	288,2	2,69,9
P114AR7P94-A3	41	0,4	0,2	1,4	5	9,3
P114AR7P94-E5	42	4,2	0,7	3,4	124,3	195,6
P114AR7P95-B9	43	0,5	0,3	H/o	9,8	17,4
P114AR7P95D3	44	0,3	0,2	1,5	4,6	1,7
P114AR7P95-D4	45	0,4	H/o	1,4	19,5	19,4
P114AR7P95-E3	46	1,5	H/o	3,2	204,6	209,2
P114AR7P95-F10	47	4,2	1,4	4,4	187,6	3,29,7

P114AR7P95-G7	48	20,0	H/o	11,3	659,3	692
P114AR7P95-H8	49	3,7	H/o	4,1	209,8	280,7

### Термическая стабильность с-Met-связывающих доменов FN3

Для оценки стабильности каждого домена FN3 применяли дифференциальную сканирующую калориметрию в PBS. Результаты эксперимента показаны в таблице 14.

Таблица 14

Клон		Термическая стабильность (T <sub>m</sub> , °C)
Название	SEQ ID NO:	
P114AR5P74-A5	32	74,1
P114AR5P75-E9	33	H/o
P114AR7P92-F3	34	81,5
P114AR7P92-F6	35	76,8
P114AR7P92-G8	36	90,9
P114AR7P92-H5	37	87
P114AR7P93-D11	38	H/o
P114AR7P93-G8	39	76,8
P114AR7P93-H9	40	88,2
P114AR7P94-A3	41	86,2
P114AR7P94-E5	42	80
P114AR7P95-B9	43	86,3
P114AR7P95-D3	44	82
P114AR7P95-D4	45	85,3
P114AR7P95-E3	46	94,2
P114AR7P95-F10	47	85,2
P114AR7P95-G7	48	87,2
P114AR7P95-H8	49	83

ПРИМЕР 8. Создание и характеристика биспецифических к EGFR/c-Met молекул

Создание биспецифических к EGFR/c-Met молекул

Множество комбинаций EGFR- и с-Met-связывающих доменов FN3, описанных в примерах 1–6, соединяли в биспецифические молекулы, способные связываться как с EGFR, так и с с-Met. Кроме того, были созданы и соединены в биспецифические молекулы EGFR-связывающих доменов FN3, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107–110, и с-Met-связывающих доменов FN3, которые имеют аминокислотные

последовательности, представленные в SEQ ID NO: 111–114. Были созданы синтетические гены, кодирующие аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO 50–72 и 106 (таблица 15), так чтобы сохранялся следующий формат: EGFR-связывающий домен FN3, затем пептидный линкер, затем с-Met-связывающий домен FN3. Для обеспечения очистки на С-конце встраивали полигистидиновый тег. Помимо этих молекул, описанных в таблице 15, линкер между двумя доменами FN3 варьировали по длине, составу последовательности и структуре в соответствии с указанным в таблице 16. Предусмотрена возможность применения ряда других линкеров для соединения таких доменов FN3. Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы экспрессировали и очищали из *E. coli*, как описано применительно к моноспецифическим EGFR или с-Met доменам FN3, с применением этапов ИМАС и гельпроникающей хроматографии.

Таблица 15

Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула		EGFR-связывающий домен FN3		c-MET-связывающий домен FN3		Линкер	
Идентификационный номер клона	SEQ ID	Идентификационный номер клона	SEQ ID	Идентификационный номер клона	SEQ ID	Последовательность	SEQ ID
ECB1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB5	54	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB6	55	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB7	56	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB15	57	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB27	58	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB60	59	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB37	60	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB94	61	P54AR4-83v22	108	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB95	62	P54AR4-83v22	108	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB96	63	P54AR4-83v22	108	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB97	64	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB106	65	P54AR4-83v23	109	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB107	66	P54AR4-83v23	109	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) <sub>5</sub>	81

ECB108	67	P54AR4-83v23	109	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB109	68	P54AR4-83v23	109	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB118	69	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) <sub>5</sub>	8I
ECB119	70	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB120	71	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB121	72	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB91	106	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB18	118	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	8I
ECB28	119	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB38	120	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB39	121	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81

Таблица 16

Линкер	SEQ ID NO:	Длина линкера в аминокислотах	Структура
GS	78	2	Неупорядоченная
GGGGS	105	5	Неупорядоченная
(GGGGS) <sub>4</sub>	79	20	Неупорядоченная
(AP) <sub>2</sub>	80	4	Жесткая
(AP) <sub>5</sub>	81	5	Жесткая
(AP) <sub>10</sub>	82	20	Жесткая
(AP) <sub>20</sub>	83	40	Жесткая
A (EAAAK) <sub>5</sub> AAA	84	29	$\alpha$ -спиральная

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы повышают эффективность по сравнению с отдельными моноспецифическими молекулами, что указывает на avidность

Клетки NCI-H292 высевали на 96-луночные планшеты в среду RPMI, содержащую 10% FBS. Через 24 часа среду заменяли на бессывороточную RPMI. Через 24 часа после бессывороточной среды клетки обрабатывали различными концентрациями доменов FN3: моноспецифического к EGFR домена FN3 с высокой аффинностью (P54AR4-83v2), моноспецифического к c-Met домена FN3 с низкой аффинностью (P114AR5P74-A5), смеси двух моноспецифических к EGFR и c-Met доменов FN3 или биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3 с низкой аффинностью к c-Met, соединенный с доменом FN3 с высокой аффинностью к EGFR (ECB1). Клетки обрабатывали в течение 1 ч моноспецифическими или биспецифическими молекулами и затем стимулировали EGF, HGF или комбинацией EGF и HGF в течение 15 минут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки лизировали лизирующим буфером MSD и оценивали сигнализацию в клетках с применением соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

Домен FN3 с низкой аффинностью к c-Met ингибировал фосфорилирование c-Met со значением IC<sub>50</sub>, равным 610 нМ (Фиг. 6). Как и ожидалось, домен FN3, связывающийся с EGFR, не был способен ингибировать фосфорилирование c-Met, а смесь моноспецифических молекул выглядела идентично только домену FN3,

связывающемуся с с-Met. Однако биспецифическая к EGFR/с-Met молекула ингибировала фосфорилирование с-Met с  $IC_{50}$ , равным 1 нМ (Фиг. 6), т. е. с обеспечением сдвига эффективности более чем на 2 порядка относительно одной моноспецифической к с-Met молекулы.

Потенциал биспецифической к EGFR/с-Met молекулы в отношении увеличения ингибирования фосфорилирования с-Met и/или EGFR посредством эффекта авидности оценивали на множестве типов клеток с различными значениями плотности и соотношениями с-Met и EGFR (Фиг. 7). Клетки NCI-H292, NCI-H441 или NCI-H596 высевали на 96-луночные планшеты в среду RPMI, содержащую 10% FBS. Через 24 часа среду заменяли на бессывороточную RPMI. Через 24 часа после бессывороточной среды клетки обрабатывали разными концентрациями моноспецифического EGFR-связывающего домена FN3, моноспецифического с-Met-связывающего домена FN3 или биспецифической к EGFR/с-Met молекулы (ECB5, образована из P53A1R5-17v2 и P114AR7P94-A3). Клетки обрабатывали в течение 1 ч моноспецифическими или биспецифическими молекулами, а затем стимулировали EGF, HGF или комбинацией EGF и HGF в течение 15 минут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки лизировали лизирующим буфером MSD и оценивали сигнализацию в клетках с применением соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

На Фиг. 7 (А-С) показано ингибирование EGFR с помощью моноспецифического EGFR-связывающего домена FN3 по сравнению с биспецифической к EGFR/с-Met молекулой в трех разных клеточных линиях. Для оценки авидности в анализе на фосфорилирование EGFR EGFR-связывающий домен FN3 со средней аффинностью (1,9 нМ) (P53A1R5-17v2) сравнивали с биспецифической к EGFR/с-Met молекулой, содержащей тот же EGFR-связывающий домен FN3, соединенный с с-Met-связывающим доменом FN3 с высокой аффинностью (0,4 нМ) (P114AR7P94-A3). В клетках H292 и H596 ингибирование фосфорилирования EGFR для моноспецифических и биспецифических молекул было сопоставимым (Фиг. 7А и 7В), вероятно, вследствие того, что данные клеточные линии имели высокое соотношение рецепторов EGFR и с-Met. Для проверки данной



теории оценивали ингибирование фосфорилирования EGFR в клетках NCI-H441, содержащих больше рецепторов c-Met, чем EGFR. Обработка клеток NCI-H441 биспецифической к EGFR/c-Met молекулой снижала IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению с моноспецифическим EGFR-связывающим доменом FN3 в 30 раз (Фиг. 7C).

Потенциал повышения эффективности в случае биспецифической к EGFR/c-Met молекулы оценивали в анализе фосфорилирования c-Met с применением молекулы с высокой аффинностью к EGFR (0,26 нМ) и средней аффинностью к c-Met (10,1 нМ). Как в клетках NCI-H292, так и в клетках NCI-H596 ингибирование фосфорилирования c-Met биспецифической молекулой было увеличено по сравнению с моноспецифическим c-Met-связывающим доменом FN3 в 134 и 1012 раз соответственно (Фиг. 7D и 7E).

Было подтверждено, что повышенная эффективность ингибирования фосфорилирования EGFR и c-Met биспецифическими к EGFR/c-Met молекулами отражается в увеличенном ингибировании сигнализации и пролиферации. В этих экспериментах смесь EGFR- и c-Met-связывающих доменов FN3 сравнивали с биспецифической к EGFR/c-Met молекулой. Как описано в таблицах 17 и 18, значения IC<sub>50</sub> для фосфорилирования ERK (таблица 17) и пролиферации клеток H292 (таблица 18) были снижены при обработке клеток биспецифической к EGFR/c-Met молекулой по сравнению с моноспецифическими связующими. IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования ERK биспецифической к EGFR/c-Met молекулой было в 143 раза ниже, чем в случае смеси двух моноспецифических к EGFR и c-Met доменов FN3, что демонстрирует влияние авидности на эффективность молекул в данном анализе. В таблице 17 моноспецифические EGFR- или c-Met-связывающие домены FN3 ингибируют активность не полностью, и, следовательно, показанные значения IC<sub>50</sub> следует считать нижними пределами. Анализ пролиферации выполняли с применением разных комбинаций EGFR- и c-Met-связывающих доменов FN3 либо в виде смеси, либо в виде связанных в биспецифический формат. IC<sub>50</sub> для ингибирования пролиферации для биспецифической к EGFR/c-Met молекулы было в

34–236 раз ниже, чем при использовании смеси моноспецифических исходных EGFR- или c-Met-связывающих доменов FN3. Это подтверждает, что эффект avidности, наблюдавшийся на уровне рецепторов (Фиг. 6 и Фиг. 7), преобразуется в улучшение ингибирования сигнализации в клетках (таблица 17) и пролиферации (таблица 18).

Таблица 17

Специфичность молекулы, содержащей домен FN3	Клон №	Тип	IC <sub>50</sub> (нМ) (фосфорилирование ERK)
EGFR	P54AR4-83v2	Моноспецифическая	> 10000
c-Met	P114AR5P74-A5	Моноспецифическая	2366
EGFR или c-Met	P54AR4-83v2+P114AR5P74-A5	Смесь моноспецифических молекул	798,4
EGFR и c-Met	ECB1	Биспецифическая	5,6

Таблица 18

EGFR-связывающий домен FN3 (аффинность)	с-Met-связывающий домен FN3 (аффинность)	IC <sub>50</sub> для смеси моноспецифических молекул (нМ)	IC <sub>50</sub> для биспецифических молекул (нМ)	Кратность повышения IC <sub>50</sub> для биспецифических молекул/смеси моноспецифических молекул
P54AR4-83v2 (0,28 нМ)	P114ARP94-A3 (0,4 нМ)	36,5	1,04	35
P54AR4-83v2 (0,26 нМ)	P114AR7P93-H9 (3,3 нМ)	274,5	8,05	34
P54AR4-83v2 (0,26 нМ)	P114AR5P74-A5 (10,1 нМ)	1719	7,29	236

Опухолевые ксенотрансплантаты in vivo:  
фармакокинетика/фармакодинамика (ФК/ФД)

Для определения эффективности моноспецифических и биспецифических молекул, содержащих домены FN3, in vivo конструировали опухолевые клетки, секретирующие человеческий HGF (мышинный HGF не связывается с человеческим HGF). Человеческий HGF стабильно экспрессировался в клетках NCI-H292 с применением инфицирования лентивирусом (лентивирусный ДНК-вектор, экспрессирующий человеческий HGF (№ по кат. X16322), и набор для лентивирусной упаковки производства Genecoroeia). После инфицирования экспрессирующие HGF клетки выбирали, используя 4 мкг/мл пурамицина (Invitrogen). Человеческий белок HGF обнаруживали в кондиционированной среде объединенных клеток с применением планшетов для анализа производства MesoScale Discovery.

Мышей линии SCID Beige подкожно инокулировали клетками NCI-H292, экспрессирующими человеческий HGF ( $2,0 \times 10^6$  клеток в Cultrex (Trevigen) в объеме 200 мкл), в дорзальную часть бока каждого животного. Измерения опухолей проводили дважды в неделю до тех пор, пока объем опухоли не составил 150–250 мм<sup>3</sup>. Затем мышам и/п вводили одну дозу биспецифических к EGFR/c-Met молекул (связанных с альбумин-связывающим доменом для увеличения периода полужизни) или носитель PBS. Через 6 ч или 72 ч после введения опухоли извлекали и немедленно замораживали в жидком азоте. Образцы крови собирали посредством кардиальной пункции в 3,8% цитрат, содержащий ингибиторы протеаз. Сразу же после сбора образцы крови центрифугировали, полученную плазму переносили в пробирки для образцов и хранили при -80°C. Опухоли взвешивали, разрезали на небольшие части и лизировали в пробирках Lysing Matrix A (LMA), содержащих буфер RIPA с ингибиторами протеаз/фосфатаз HALT (Pierce), 50 mM фторида натрия (Sigma), 2 mM активированного ортованадата натрия (Sigma) и 1 mM PMSF (MesoScale Discovery). Лизаты удаляли из матрицы LMA и центрифугировали для удаления нерастворимого белка. Растворимый белок опухоли количественно определяли в анализе на белок BCA и

разбавляли до эквивалентных уровней белка в лизирующем буфере для опухоли. Фосфорилированные c-Met, EGFR и ERK измеряли при помощи планшетов для анализов производства MesoScale Discovery (в соответствии с протоколом производителя и приведенным выше описанием).

На Фиг. 6 показаны результаты экспериментов. Каждая биспецифическая к EGFR/c-Met молекула в значительной степени снижала уровни фосфорилированных c-Met, EGFR и ERK как через 6 ч, так и через 72 ч. Данные, представленные на Фиг. 6, показывают значимость одновременного ингибирования как c-Met, так и EGFR, а также то, как аффинность биспецифической к EGFR/c-Met молекулы для каждого рецептора влияет на ингибирование расположенной ниже ERK. Молекулы, содержащие высокоаффинные EGFR-связывающие домены FN3 (P54AR4-83v2; показан как элемент «8» на фигуре,  $K_D=0,26$  нМ), ингибировали фосфорилирование EGFR в большей степени, чем молекулы, содержащие среднеаффинные EGFR-связывающие домены FN3 (P53A1R5-17v2; показан как элемент «17» на фигуре,  $K_D=1,9$  нМ), как через 6 ч, так и через 72 ч. Все четыре протестированные биспецифические молекулы полностью ингибировали фосфорилирование ERK в момент времени через 6 ч независимо от аффинности. К 72-часовому сроку молекулы, содержащие высокоаффинный c-Met-связывающий домен (P114AR7P94-A3; показан как элемент «A3» на фигуре,  $K_D=0,4$  нМ), в значительной степени ингибировали фосфорилирование ERK по сравнению со среднеаффинным c-Met-связывающим доменом FN3 (P114AR5P74-A5; показан как элемент «A5» на фигуре;  $K_D=10,1$  нМ; Фиг. 6).

Концентрацию каждой биспецифической к EGFR/c-Met молекулы измеряли через 6 часов и 72 часа после введения в крови и в опухоли (Фиг. 9). Интересно, что биспецифическая молекула со среднеаффинным EGFR-связывающим доменом (P53A1R5-17v2;  $K_D=1,9$  нМ), но высокоаффинным c-Met-связывающим доменом FN3 (P114AR7P94-A3;  $K_D=0,4$  нМ) значительно сильнее накапливалась в опухоли через 6 часов по сравнению с другими молекулами, причем различие уменьшалось к 72 часам. Можно предположить, что клетки за пределами опухоли имеют более низкие уровни экспрессии как

EGFR, так и с-Met на поверхности, и, следовательно, молекула со средней аффинностью к EGFR не связывается с нормальной тканью так прочно, как EGFR-связывающий домен FN3 с высокой аффинностью. Таким образом, для связывания с опухолью остается больше свободного EGFR-связывающего домена FN3 со средней аффинностью. Таким образом, определение соответствующих значений аффинности к каждому рецептору может позволить обнаружить терапевтическое средство со сниженными значениями системной токсичности и повышенным накоплением в опухоли.

Исследования эффективности биспецифических к EGFR/с-Met молекул в отношении опухоли

Мышей линии SCID Beige подкожно инокулировали клетками NCI-H292, экспрессирующими человеческий HGF ( $2,0 \times 10^6$  клеток в Cultrex (Trevigen), 200 мкл), в дорзальную часть бока каждого животного. Через одну неделю после имплантации мышей делили на группы с эквивалентными объемами опухолей (средний объем опухоли =  $77,9 \pm 1,7$  мм<sup>3</sup>). Мышам три раза в неделю вводили биспецифические молекулы и дважды в неделю регистрировали объем опухоли. Ингибирование роста опухоли (TGI) наблюдали при использовании четырех разных биспецифических молекул с различными значениями аффинности к с-Met и EGFR. На Фиг. 10 показан благоприятный эффект ингибирования как с-Met, так и EGFR, поскольку наблюдали задержку роста опухоли у мышей, получавших обработку молекулами, содержащими EGFR-связывающий домен FN3 с высокой аффинностью, по сравнению с EGFR-связывающим доменом FN3 со средней аффинностью, когда с-Met-связывающий домен FN3 имел среднюю аффинность (незаштрихованные и заштрихованные треугольники, P54AR4-83v2-P114AR5P74-A5 по сравнению с P53A1R5-17-P114AR5P74-A5). Кроме того, данные показывают значимость наличия с-Met-связывающего домена FN3 с высокой аффинностью, поскольку биспецифические молекулы, содержащие EGFR-связывающие домены FN3 либо с высокой, либо со средней аффинностью, но с-Met-связывающий домен FN3 с высокой аффинностью, показали наибольшую эффективность (пунктирные серые и черные линии, P54AR4-83v2-P114AR7P94-A3 и P53A1R5-17v2-P114AR7P94-A3).

Эффективность биспецифической молекулы и других ингибиторов EGFR и c-Met

Терапевтическую эффективность *in vivo* биспецифической к EGFR/c-Met молекулы (ECB38) и низкомолекулярных ингибиторов кризотиниба (ингибитор c-Met) и эрлотиниба (ингибитор EGFR), цетуксимаба (антитела к EGFR), каждого по отдельности, а также комбинации кризотиниба и эрлотиниба оценивали в модели подкожной ксенотрансплантации клеток человеческого рака легких H292-HGF мышам линии SCID/Beige (Фиг. 11).

Клетки H292-HGF культивировали *in vitro* в среде RPMI1640 с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (10% об./об.) и L-глутамин (2 мМ) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки регулярно пересеивали дважды в неделю с обработкой трипсин-ЭДТА. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

Для развития опухоли мышей подкожно инокулировали в область правого бока опухолевыми клетками H292-HGF ( $2 \times 10^6$ ) в 0,1 мл PBS с Cultrex (1:1). Обработку начинали, когда средний размер опухоли достигал 139 мм<sup>3</sup>. Введение тестового препарата и число животных в каждой экспериментальной группе показаны в таблице плана эксперимента ниже (таблица 26). Дату инокуляции опухолевыми клетками обозначали как 0 сутки.

Таблица 26

Группа	N	Обработка	Доза (мг/кг)	Способ введения	Плановый график	Фактический график
1	10	Контроль с носителем	0	и/п	QD × 3 недели	QD × 3 недели
2	10	Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула	25	и/п	3 раза в неделю × 3 недели	3 раза в неделю × 3 недели
3	10	Кризотиниб	50	п/о	QD × 3 недели	QD × 17 суток
4	10	Эрлотиниб	50	п/о	QD × 2 недели	QD × 3 недели
5	10	Кризотиниб	50	п/о	QD × 3 недели	QD × 3 недели
		Эрлотиниб	50	п/о	QD × 2 недели	QD × 3 недели
6	10	Цетуксимаб	1 мг/мышь	и/п	Q4d × 6	Q4d × 6

N: число животных; п/о: пероральное введение; и/п: интраперитонеальная инъекция 3 раза в неделю: введение доз в 1, 3 и 5 сутки недели.

QD: один раз в сутки; Q4d: один раз в четверо суток; интервал для комбинации кризотиниба и эрлотиниба составлял 0,5 ч; объем дозы корректировали с учетом массы тела (10 л/г); а: дозу не давали на 14 сутки после деления на группы.



Перед началом обработки всех животных взвешивали и измеряли объемы опухолей. Поскольку объем опухоли может влиять на эффективность любой конкретной обработки, мышей распределяли по группам в соответствии с планом с рандомизированными блоками на основе объемов опухолей у них. Это гарантирует, что все группы на исходном уровне будут сопоставимы. Для распределения экспериментальных животных по группам применяли план с рандомизированными блоками. Во-первых, экспериментальных животных делили на однородные блоки в соответствии с исходным размером опухолей у них. Во-вторых, в пределах каждого блока проводили рандомизацию экспериментальных животных по типам обработки. Распределение экспериментальных животных с использованием плана с рандомизированными блоками гарантирует, что у всех животных имеется одинаковая вероятность получения конкретного типа обработки, и, следовательно, снижается систематическая ошибка.

Во время регулярного контроля у животных проверяли влияние роста опухоли и типа обработки на нормальное поведение, в частности, на подвижность, визуальную оценку потребления корма и воды, прирост/потерю массы тела (вес тела измеряли дважды в неделю), помутнение глаз/шерсти и любые другие аномальные влияния.

Основная конечная точка – возможность замедлить рост опухоли или излечить мышей-носителей опухоли. Размер опухоли измеряли дважды в неделю в двух направлениях с помощью штангенциркуля; объем выражали в  $\text{мм}^3$  с применением формулы:  $V=0,5 a \times b^2$ , где  $a$  и  $b$  представляют собой большой и малый диаметры опухоли соответственно. Затем размер опухоли применяли для вычислений значений как  $T-C$ , так и  $T/C$ . Вычисляли значение  $T-C$ , где  $T$  – время (в сутках), необходимое для того, чтобы опухоль среднего размера в группе лечения достигла  $1000 \text{ мм}^3$ , а  $C$  – время (в сутках), необходимое для того, чтобы опухоль среднего размера в контрольной группе достигла того же размера. Значение  $T/C$  (в процентах) представляло собой показатель противоопухолевой эффективности;  $T$  и  $C$  представляли собой средние объемы в группе

обработки и контрольной группе соответственно в заданные сутки. Полную регрессию опухоли (CR) определяли как уменьшение опухолей до предела, который не обнаруживается при пальпации ( $62,5 \text{ мм}^3$ ). Частичную регрессию опухоли (PR) определяли как уменьшение опухолей относительно исходного объема опухоли. Чтобы CR или PR расценивались как устойчивые, требовалось, чтобы CR или PR определялись минимум в течение 3 или более последовательных измерений опухоли.

Животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или у которых средний размер опухоли в группе превышал  $2000 \text{ мм}^3$ , усыпляли. Исследование завершали через две недели наблюдения после введения конечной дозы.

Сводная статистика, включающая среднее и стандартную погрешность среднего (СПС), представлена для объема опухоли в каждой группе и в каждый момент времени (показана в таблице 19 ниже). Статистические анализы различий в объеме опухоли между группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими отдельными сравнениями с применением критерия Геймса-Хоуэлла (не предполагает равные дисперсии). Все данные анализировали с применением SPSS 18.0. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

Размеры опухолей в группах обработки

Сутки	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) а					
	Носитель	Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула 25 мг/кг	Кризотиниб при дозе 50 мг/кг	Эрлотиниб при дозе 50 мг/кг	Кризотиниб; эрлотиниб при дозе 50 мг/кг; 50 мг/кг	Цетуксимаб при дозе 1 мг/мышь
7	139±7	137±7	140±9	141±8	139±8	139±10
9	230±20	142±7	217±20	201±19	134±9	168±13
13	516±45	83±6	547±43	392±46	109±10	212±20
16	808±104	44±7	914±92	560±70	127±15	252±28
20	1280±209	30±6	1438±239	872±136	214±30	371±48
23	1758±259	23±7	2102±298	1122±202	265±40	485±61
27	2264±318	21±5	--	1419±577	266±42	640±82
30	--	23±6	--	1516±623	482±61	869±100

Средний размер опухоли в группе, получавшей обработку носителем (группа 1), достиг  $1758 \text{ мм}^3$  на 23 сутки после инокуляции опухоли. Лечение биспецифической к EGFR/c-Met молекулой при уровне дозы  $25 \text{ мг/кг}$  (группа 2) приводило к полной регрессии опухоли (CR) у всех мышей, которая была устойчива при  $> 3$  последовательных измерениях опухоли (среднее значение объема опухоли  $23 \text{ мм}^3$ , значение T/C=1%,  $p=0,004$ , по сравнению с группой, получавшей носитель, на 23 сутки).

Обработка только кризотинибом при уровне дозы  $50 \text{ мг/кг}$  (группа 3) не показала противоопухолевой эффективности; средний размер опухоли составил  $2102 \text{ мм}^3$  на 23 сутки (значение T/C=120%,  $p=0,944$ , по сравнению с группой, получавшей носитель).

Обработка только эрлотинибом при уровне дозы  $50 \text{ мг/кг}$  (группа 4) показала небольшую противоопухолевую эффективность, но не было выявлено достоверных отличий от группы, получавшей носитель; средний размер опухоли составил  $1122 \text{ мм}^3$  на 23 сутки (значение T/C=64%,  $p=0,429$ , по сравнению с группой, получавшей носитель), при этом наблюдалась задержка роста опухоли на 4 суток при размере опухоли  $1000 \text{ мм}^3$  по сравнению с группой, получавшей носитель.

Комбинация кризотиниба ( $50 \text{ мг/кг}$ , группа 5) и эрлотиниба ( $50 \text{ мг/кг}$ , группа 5) продемонстрировала значительную противоопухолевую активность; средний размер опухоли составил  $265 \text{ мм}^3$  на 23 сутки (T/C=15%;  $p=0,008$ ), при этом наблюдалась задержка роста опухоли на 17 суток при размере опухоли  $1000 \text{ мм}^3$  по сравнению с группой, получавшей носитель.

Обработка только цетуксимабом при уровне дозы  $1 \text{ мг/мышь}$  (группа 6) не продемонстрировала значительной противоопухолевой активности; средний размер опухоли составил  $485 \text{ мм}^3$  на 23 сутки (T/C=28%;  $p=0,018$ ), при этом наблюдалась задержка роста опухоли на 17 суток при размере опухоли  $1000 \text{ мм}^3$  по сравнению с группой, получавшей носитель. На Фиг. 11 показаны значения противоопухолевой активности различных терапевтических средств.

## Противоопухолевая активность

Обработка	Размер опухоли (мм <sup>3</sup> ) на 23 сутки	T/C (%)	T – C (сутки) при 1000 мм <sup>3</sup>	Значение P
Носитель	1758±259	--	--	--
Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула (25 мг/кг)	23±7	1	--	0,004
Кризотиниб (50 мг/кг)	2102±298	120	-1	0,944
Эрлотиниб (50 мг/кг)	1122±202	64	4	0,429
Кризотиниб+эрлотиниб (50 мг/кг+50 мг/кг)	265±40	15	17	0,008
Цетуксимаб (1 мг/мышь)	485±61	28	17	0,018

Потерю массы тела от средней до тяжелой наблюдали в группе, получавшей носитель, что может быть обусловлено растущей опухолевой нагрузкой; 3 мыши погибли, а 1 мышь усыпили, когда потеря массы тела (BWL) к 23 суткам составила > 20%. Небольшую токсичность биспецифической к EGFR/c-Met молекулы наблюдали в группе 2; 3 мышей усыпили при достижении в период обработки BWL > 20%; масса тела постепенно восстанавливалась при отмене обработки в течение 2-недельного периода наблюдения. Более тяжелую потерю массы тела наблюдали в группе монотерапии кризотинибом или эрлотинибом по сравнению с группой, получавшей носитель, что указывает на связанную с обработкой токсичность. Комбинация кризотиниба и эрлотиниба по существу переносилась на фазе дозирования, но к концу исследования наблюдали сильную потерю массы тела, что может быть связано с возобновлением быстрого роста опухоли в период отсутствия обработки. Монотерапия цетуксимабом переносилась в исследовании хорошо; потерю массы тела наблюдали только к концу исследования из-за возобновления роста опухоли.

Таким образом, биспецифическая к EGFR/c-Met молекула при 25

мг/кг (3 раза в неделю x 3 недели) обеспечивала полный ответ в модели ксенотрансплантации клеток человеческого рака легких H292-HGF мышам линии SCID/Beige. Обработку перенесли 7 из 10 мышей, а у 3 из 10 мышей наблюдали сильную потерю массы тела. На Фиг. 11 и в таблице 20 показано влияние различных терапевтических средств на размер опухоли в моменты времени после обработки.

Пример 9. Продление периода полужизни биспецифических к EGFR/c-Met молекул

Было описано множество способов уменьшения почечной фильтрации и, таким образом, продления периода полужизни белков в сыворотке, включая модификацию полиэтиленгликолем (ПЭГ) или другими полимерами, связывание с альбумином, слияние с доменами белков, которые связываются с альбумином или другими сывороточными белками, генетическое слияние с альбумином, слияние с Fc-доменами IgG и слияние с длинными неструктурированными аминокислотными последовательностями.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы модифицировали с помощью ПЭГ для увеличения гидродинамического радиуса путем встраивания свободного цистеина на С-конце молекулы. Чаще всего свободная тиольная группа цистеинового остатка применяется для присоединения молекул ПЭГ, которые функционализировали группами малеимида или йодацетимида с применением стандартных способов. Для модификации белка можно применять различные формы ПЭГ, включая линейные ПЭГ с массой 1000, 2000, 5000, 10000, 20000 или 40000 кДа. Также для модификации можно применять разветвленные молекулы ПЭГ с этими значениями молекулярной массы. В некоторых случаях группы ПЭГ также можно присоединять при помощи первичных аминов в биспецифических к EGFR/c-Met молекулах.

Помимо пегилирования период полужизни биспецифических к EGFR/c-Met молекул продлевали путем получения этих белков в виде слитных молекул с природным 3-спиральным связывающим сывороточный альбумин доменом (ABD) или консенсусным альбумин-связывающим доменом (ABDCon). Эти белковые домены присоединяли к С-концу c-Met-связывающего домена FN3 посредством любого из линкеров, описанных в таблице 16. Домен ABD или ABDCon также

можно помещать в первичную последовательность между EGFR-связывающим доменом FN3 и c-Met-связывающим доменом FN3.

Пример 10. Характеризация выбранных биспецифических к EGFR/c-Met молекул

Выбранные молекулы EGFR/c-Met характеризовали по их аффинности как к EGFR, так и к c-Met, по их способности ингибировать аутофосфорилирование EGFR и c-Met и по их воздействию на пролиферацию клеток HGF. Аффинность связывания биспецифических к EGFR/c-Met молекул с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR и/или c-Met дополнительно оценивали методами поверхностного плазмонного резонанса с помощью прибора Proteon (BioRad) в соответствии с протоколом, описанным в примере 3. Результаты характеризации показаны в таблице 21.

Таблица 21

	K <sub>d</sub> (EGFR, нМ)	K <sub>d</sub> (c-Met, нМ)	Ингиби- рование pMet в клетках H441 (IC <sub>50</sub> , нМ)	H292 ингиби- рование pEGFR в клетках H292 (IC <sub>50</sub> , нМ)	H292-HGF ингибирование пролиферации в индуцированных HGF клетках H292 (IC <sub>50</sub> , нМ)
ЕСВ15	0,2	2,6	Н/Д	4,2	23
ЕСВ94	1	4,3	53,8	5,1	29,6
ЕСВ95	1,1	6,2	178,8	13,6	383,4
ЕСВ96	1,6	22,1	835,4	24,7	9480
ЕСВ97	1,3	1,7	24,2	16,6	31,0
ЕСВ106	16,7	5,1	53,3	367,4	484,5
ЕСВ107	16,9	9	29,9	812,3	2637
ЕСВ108	15,3	25,5	126,2	814,4	11372
ЕСВ109	17,3	2,1	26	432	573,6

Пример 11. Создание и характеризация биспецифических к EGFR/c-Met молекул с внедренными остатками цистеина

Создание биспецифических к EGFR/c-Met молекул

На основе данных, полученных в результате цистеинового сканирования мутанта P54AR4-83v2 (пример 5), для продления

периода полужизни также были разработаны цистеиновые мутанты, обозначенные ЕСВ147 (SEQ ID NO: 218 и 256), в биспецифической к EGFR/c-Met молекуле, которая состоит из P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), связывающего cMet P114AR7P95-C5v2 (SEQ ID NO: 114) и альбумин-связывающего домена. Эти три домена соединены линкерами (Ala-Pro)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 81). Были разработаны варианты с одним, двумя или четырьмя цистеинами с заменами на С-конце, в линкерных областях или в положении Lys-62 одного из доменов FN3 (SEQ ID NO: 219-225 и 257-263). Другой биспецифический вариант, ЕСВ82cys (SEQ ID NO: 226 и 264), состоит из P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), P114AR7P94-A3v22 (SEQ ID NO: 111), варианта альбумин-связывающего домена, причем все три домена соединены линкерами AP, и одного С-концевого цистеина. Также для конструирования контрольных конъюгатов применяли дополнительный цистеиновый вариант не нацеленного на мишень каркаса Tencon (SEQ ID NO: 265). Все варианты конструировали, экспрессировали и очищали так, как описано в предыдущих примерах. Чистоту оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Аналитическая эксклюзионная хроматография с применением колонки Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) показывает, что препараты с доменом FN3 не содержат агрегатов и элюируются во время, соответствующее мономерному белку, По данным масс-спектрометрии, массы соответствовали теоретическим массам (таблица 22).

Таблица 22

Название варианта	Расчетная MW (Да)	Экспериментальная MW (Да)
ЕСВ147v1	27895	27894
ЕСВ147v2	27838	27837
ЕСВ147v3	27877	27876
ЕСВ147v4	27895	27894
ЕСВ147v5	27813	27812
ЕСВ147v6	27838	27837
ЕСВ147v7	27927	27926
P54AR4-83v2-cys	11789	11790
Tencon-cys	10820	

Химическая конъюгация



Для химической конъюгации очищенных биспецифических цистеиновых вариантов с малеимид-содержащими молекулами белка сначала восстанавливали с помощью ТСЕР, получив свободные тиолы. 1–2 мг каждого биспецифического цистеинового варианта смешивали с избытком ТСЕР при нейтральном рН (Sigma, № по кат. 646547) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30–60 минут. ТСЕР удаляли путем добавления 3 объемов насыщенного раствора сульфата аммония (4,02 М) с осаждением цистеиновых вариантов. После центрифугирования при 16000–20000×g при 4°C в течение 20 мин и удаления супернатанта осадок белка растворяли в PBS или натрий-фосфатном буфере и сразу же смешивали с 5- или 10-кратным избытком малеимид-содержащей молекулы. Реакционную смесь инкубировали в течение 30–60 минут при комнатной температуре, а затем гасили избытком свободного тиола, например цистеином или β-меркаптоэтанолом, чтобы убрать избыток малеимида. Несвязанный малеимид удаляли при помощи обессоливающих колонок Zeba (Thermo, № по кат. 89890), препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке Tosoh G3000SWx1 (№ P4619-14N; 7,8 мм × 30 см; 5 мкм) или путем связывания цистеинового варианта со смолой Ni-NTA, промывки и элюирования по существу так, как описано выше. Конъюгаты характеризовали при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза и масс-спектрометрии. Этот общий способ применяли для конъюгации биспецифических цистеиновых вариантов с молекулами флуоресцеин-малеимида (Thermo, № по кат. 62245), ПЭГ24-малеимида (Quanta Biodesign, № по кат. 10319) и малеимид-цитотоксина с помощью различных линкеров (см. структуры на Фиг. 2).

#### Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR

Очищенные биспецифические конъюгаты с ПЭГ24-малеимидом тестировали на способность ингибировать стимулированное EGF фосфорилирование EGFR в клетках человеческой опухолевой линии NCI-H292 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1848) с применением набора EGFR phospho(Tyr1173) производства Meso Scale Discovery (г. Гейтерсберг, штат Мериленд, США), а также так, как описано в примере 3. Эти конъюгаты сравнивали с немодифицированным ЕСВ38 (SEQ ID No. 109), который отличается от

ЕСВ147 двумя аминокислотами. Конъюгаты и ЕСВ38 ингибировали EGFR с аналогичными значениями  $IC_{50}$ , как показано в таблице 23, и этот факт демонстрирует, что модификация в обозначенных сайтах в значительной степени не влияла на связывание с мишенью.

Таблица 23

Название белка	$IC_{50}$ (нМ)
ЕСВ38	2,3
ЕСВ147v3-PEG24	1,6
ЕСВ147v5-PEG24	0,9
ЕСВ147v6-PEG24	1,4
ЕСВ147v7-PEG24	1,4

Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования с-Met

Очищенные биспецифические конъюгаты с ПЭГ24-малеимидом также тестировали на их способность ингибировать стимулированное HGF фосфорилирование с-Met в NCI-H292 с помощью набора с-Met phospho(Tyr1349) производства Meso Scale Discovery (г. Гейтерсберг, штат Мериленд, США), а также так, описано в примере 7. Конъюгаты и ЕСВ38 ингибировали сMet с аналогичными значениями  $IC_{50}$ , как показано в таблице 24, и этот факт демонстрирует, что модификация в этих сайтах в значительной степени не влияет на связывание с мишенью.

Таблица 24

Название белка	$IC_{50}$ (нМ)
ЕСВ38	1,3
ЕСВ147v3-PEG24	0,5
ЕСВ147v5-PEG24	0,4
ЕСВ147v6-PEG24	0,4
ЕСВ147v7-PEG24	0,5

#### Анализ цитотоксичности

Конъюгаты, состоящие из цистеиновых вариантов ЕСВ147, 83v2-cys или Tenson-cys, соединенные с цитотоксическим ингибитором тубулина из семейства ауристатинов (Фиг. 2), тестировали на зависимую от мишени цитотоксичность в раковых клетках. Ингибитор был присоединен к цистеин-содержащему белку посредством нерасщепляемого линкера PEG<sub>4</sub> или расщепляемого ферментом линкера

валин-цитруллин или валин-лизин. Уничтожение клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток человеческих опухолевых линий H1573 и A431 со сверхэкспрессией EGFR, а также EGFR-негативной опухолевой линии MDA-MB-435 после воздействия конъюгатов белок-токсин с применением процедуры, описанной в примере 4. В таблице 25 приведены значения  $IC_{50}$ , полученные при анализе либо прибором CellTiter Glo, либо счетчиком объектов IncuCyte для моментов времени 66, 72 или 90 часов. Конъюгаты белок-лекарственное средство продемонстрировали эффективное уничтожение клеток, экспрессирующих антиген-мишень EGFR. Конъюгаты с несколькими лекарственными средствами также продемонстрировали повышенную цитотоксичность во многих протестированных клеточных линиях.

Таблица 25

Конъюгаты MMAE			
Конъюгат	$IC_{50}$ H1537 (нМ)	$IC_{50}$ A431 (нМ)	$IC_{50}$ MDA-MB-435 (нМ)
TenconCys-mal-PEG <sub>4</sub> -MMAE	Н/о	> 500	
TenconCys-mal-PEG <sub>4</sub> -VC-MMAE	Н/о	841	Плохое соответствие
TenconCys-mal-PEG <sub>4</sub> -VK-MMAE	Н/о	4, 5	Плохое соответствие
83v2cys-mal-PEG <sub>4</sub> -MMAE	Н/о	> 500	
83v2cys-mal-PEG <sub>4</sub> -VC-MMAE	Н/о	315	512
83v2cys-mal-PEG <sub>4</sub> -VK-MMAE	Н/о	19, 6	62
Конъюгаты MMAF			
Конъюгат	$IC_{50}$ H1537 (нМ)	$IC_{50}$ A431 (нМ)	$IC_{50}$ MDA-MB-435 (нМ)
TenconCys-mal-PEG <sub>4</sub> -MMAF	Н/о	> 1000	
TenconCys-mal-PEG <sub>4</sub> -VC-MMAF	996 1541	> 500	> 500
TenconCys-mal-PEG <sub>4</sub> -VK-MMAF	Н/о	> 500	> 500

83v2cys-mal-PEG <sub>4</sub> -MMAF	H/o	> 1000	
83v2cys-mal-PEG <sub>4</sub> -VC-MMAF	1,19 1,05	1,6	> 500
83v2cys-mal-PEG <sub>4</sub> -VK-MMAF	H/o	3,9	> 500
ECB147v3- (mal-PEG <sub>4</sub> -VC-MMAF) <sub>4</sub>	0,15 0,075	0,0078 0,0197	H/o
ECB147v5- (mal-PEG <sub>4</sub> -VC-MMAF) <sub>2</sub>	0,056 0,050	0,087 0,071	H/o
ECB82cys-mal-PEG <sub>4</sub> -VC-MMAF	0,576 0,249	1,1 0,64	H/o

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Искусственная	Tencon	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYRYSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	ДНК	Искусственная	POP2220	CGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACC
3	ДНК	Искусственная	TC5' toFG	AACACCGTAGATAGAAACGGT
4	ДНК	Искусственная	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTMTACATA4CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAAT CATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG GATCTACCATGCTG
5	ДНК	Искусственная	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	ДНК	Искусственная	TCF7	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	ДНК	Искусственная	TCF8	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
8	ДНК	Искусственная	TCF9	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	ДНК	Искусственная	TCF10	GGTGGTGAMTCCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNAACACCGTAGA7AGAAACGGT
10	ДНК	Искусственная	TCF11	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT

11	ДНК	Искусственная	TCF12	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGaAAACGGT
12	ДНК	Искусственная	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG

13	ДНК	Искусственная	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	ДНК	Искусственная	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	ДНК	Искусственная	TconSnew 2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAAATGGTGATGGTGATGGTGACCACCGGTGGTGAATTCC GCAGACAG
16	ДНК	Искусственная	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC
17	ДНК	Искусственная	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCATCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCCAAC T GATCTT C A C C AAAC
18	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQSEKVGGEAINLWPGSERSYDLT GLKPGTFYTVSiYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

19	PRT	Искусственная	P54AR4-17 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	Искусственная	P54AR4-47 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWGYNPDHFDSFUQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	Искусственная	P54AR4-48 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPRGFYDFUQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

22	PRT	Искусственная	P54AR4-37 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	Искусственная	54AR4-74 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWGYNNGDHFDSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Искусственная	P54AR4-31 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQE SEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Искусственная	P54AR4-83 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPWAFYEFSLIQYQES EKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Искусственная	P54CR4-31 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYGESE   KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSY VF E H DV MLR LSAEFTT
27	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQES   EKVGGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	Искусственная	P54CR4-31v2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE1 KVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSY   VFEHDVMLPLSAIFTT
29	PRT	Искусственная	P54AR4-73v2 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES   EKVGGEAiNLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT

30	ДНК	Искусственная	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC   G AA AAA C
31	ДНК	Искусственная	TCON5 E86lshort	GAG CCG CCG CCA CCG GTT TAA TGG TGA TGG TG/i TGG TGA CCA CCG GTG GTG AAG ATC GCA GAC AG
32	PRT	Искусственная	P114AR5P74- A5	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV   WGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGG   SISVPLSAIFTT
33	PRT	Искусственная	P114AR5P75- E9	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLLRSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVVTiLGVKGGVSTPLSAIFTT
34	PRT	Искусственная	P114AR7P92- F3	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL   GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYiVNIMGVKGGSl   SHPLSAIFTT

35	PRT	Искусственная	Pi 14AR7P9 2-F6	LPAPKNLVVSRVTEDESARLSVVTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYWNILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36	PRT	Искусственная	P114AR7P92- G8	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQILGVKGGYISIPLSAiFTT
37	PRT	Искусственная	P114AR7P92- H5	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38	PRT	Искусственная	P114AR7P93- D11	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39	PRT	Искусственная	P114AR7P9 3-G8	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT DLKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40	PRT	Искусственная	P114AR7P93- H9	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQIIIGVKGGHISLPLSAIFTT



41	PRT	Искусственная	P114AR7P9 4-A3	LP AP KNL WSRVTE DSAR LS WTAPDAAF DS F WIRY F E F L GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGKGI SPPLSAiFTT
42	PRT	Искусственная	Pi 14AR7P9 4-E5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSVVTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYAVNIIVIGVKGGRVSVPLSAIFTT
43	PRT	Искусственная	P114AR7P95- B9	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL G SG E AI VL TVP G S E RS Y D L TG L KP G TE Y WQIL GV KG G SI SVPLSAIFTT
44	PRT	Искусственная	P114AR7P95- D3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWNIMGVKGGSISYPLSAIFTT
45	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-D4	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQILGVKGGYI SI PLSAIFTT
46	PRT	Искусственная	P114AR7P95- E3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAiVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQIIIVIGVKGGTVSPPLSAIFTT
47	PRT	Искусственная	P114AR7P95- F10	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
48	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-G7	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWNIMGVKGGSISPPLSAIFTT

49	PRT	Искусственная	P114AR7P95-H8	LPAP KNLVVS RVTE DSARLS WTAP DAAF DS FVV i RYF E F V SKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGSI SPPLSAiFTT
50	PRT	Искусственная	ECB1	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEW VGGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSiS VPLSAI FTT
51	PRT	Искусственная	ECB2	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFUQYQES EKVGEAIVLWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL PAPKNLWSRVTEDSARLSVVTAPDAAFDSFVVIRYFEFLG SGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNiMGVKGGKiS PPLS .AI FTT
52	PRT	Искусственная	ECB3	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFUQYQES EKVGEAIVLWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP DAAF DS F WIRY F E F L GSGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQiIGVKGGHiS LPLSAI FTT

53	PRT	Искусственная	ECB4	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFUQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAP KNLVVS RVTE DSARLS W TAP D.AAF DS F F i RYDE F LR SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGLVS TPLSAIFTT
54	PRT	Искусственная	ECB5	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP D.AAF DS F WI RY F E F L GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKI SPPLSAiFTT
55	PRT	Искусственная	ECB8	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFUQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP D.AAF DS F WI RY F E F L GSGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIiGVKGGHIS LPLSAIFTT

58	PRT	Искусственная	ECB7	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP D.AAF DS F WI RY F E F L GSGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIiGVKGGHIS LPLSAI FTT
57	PRT	Искусственная	ECB15	MLPAPKNLWSEVTED8ARLSWDDPWAFYE8FUQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWI RYFEF LGSGEAI VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNIMGVKGKIS PPLSAI FTT
58	PRT	Искусственная	ECB27	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWSLYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSVVTAPDAAFDSFVVI RYDEVWGGEAiVLTVPGSE SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSiSVPLSAI FTT
59	PRT	Искусственная	ECB60	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPMLPAPKNLWSRVT EDSARLSWTAPDAAFDSFWI RYFEFLGSGEai VLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYWNlMGVKGKkiSPPLSAI FTT

60	PRT	Искусственная	ECB37	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFUQYQES EKVGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAAFDSFWIRYDEVWGGEAlVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSiSVPLSAIFTT
61	PRT	Искусственная	ECB94	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAIFTTAPAPAPAPAP L PAP K NL VVS R VTE D SARLSWTAPDAAAFDSFW I RYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGKI SPPLSAI FTT
62	PRT	Искусственная	ECB95	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAAFDSFWiRYFEFVGSGEAlVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSiSPPLSAIFTT
63	PRT	Искусственная	ECB96	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAAFDSFWIRYFEFVSKGDAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSi SPPLSAI FTT

64	PRT	Искусственная	ECB97	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY K DTNi R G L P LSAi FTTAPAP AP APAPLPAP K NL WS R VTE D SARLSWTAPDAAFDSFWI RYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LSVKGGSISPPLSAI FTT
65	PRT	Искусственная	ECB106	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTPVSIYGVHNVY KDTNI RGL.PLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWI RYFEF LGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGKISPPLSAIFTT
66	PRT	Искусственная	ECB107	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWiRYFEFVGSGEAiVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSISPPLSAiFTT
67	PRT	Искусственная	ECB108	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY K DTNi R G L P LSAi FTTAPAP APAPAPL PAP K NLWSRVTE D SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDai VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSISPPLSAIFTT

68	PRT	Искусственная	ECB109	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd SARLSWTAPDAAFDsFW I RYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LSVKGGSiSPPLSAI FTT
69	PRT	Искусственная	ECB118	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd SARLSWTAPDAAFDsFWIRYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGKI SPPLSAI FTT
70	PRT	Искусственная	ECB119	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd S AR L S W TAP D AAF D S F W l R Y F E F VG S G E Ai V L T V P G S E R SYDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSiSPPLSAiFTT
71	PRT	Искусственная	ECB120	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd SARLSWTAPDAAFDsFWIRYFEFVSKGDAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSi SPPLSAI FTT

72	PRT	Искусственная	ECB121	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAlVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVPfNVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFW I RYFEF LGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LSVKGGSiSPPLSAI FTT
----	-----	---------------	--------	--



SEQ ID NO: 73, PRT, Homo Sapiens, EGFR

1	mrpsgtagaa	llallaalcp	asraleekkv	cqgtsnkltq	lgtfedhfls
	lqrmfnncev				
61	vlgngleityv	qrnydlsflk	tiqevagyvl	ialntverip	lenlqiirgn
	myyensyala				
121	vlsnydankt	glkelpmrnl	qeilhgavrf	snpalcnve	siqwrdivss
	dflshMsmdf				
181	qnhlgscqkc	dpscpngscw	gageencqkl	tkiicaqqcs	grcrgkspsd
	cchnqcaagc				
241	tgpresdclv	crkfrdeatc	kdtcpplmly	npttyqmdvn	pegkysfgat
	cvkkcprnyv				
301	vtdhgscvra	cgadsyemee	dgvrkckkce	gpcrkvcngi	gigefkdsls
	inatnikhfk				
361	nctsisgdlh	ilpvafrgds	fthttpldpq	eldilktvke	itgflliqaw
	penrtdlhaf				
421	enleiirgrt	kqhgqfslav	vslnitslgl	rslkeisdgd	viisgnknlc
	yantinwkkk				
481	fgtsgqktki	isnrgensck	atgqvchalc	spegcwgpep	rdcvscrnvs
	rgrecvdkc				
541	llegeprefv	enseciqchp	eclpqamnit	ctgrgpdnci	qcahyidgph
	cvktcpagvm				
601	genntlvwky	adaghvchlc	hpnctygctg	pglegcptng	pkipsiatgm
	vgalllllv				
661	algiglfmrr	rhivrkrtrl	rllqerelve	pltpsgeapn	qallrilket
	efkkikvlgs				
721	gafgtvykgl	wipegekvti	pvaikelrea	tspkankeil	deayvmasvd
	nphvcrligi				
781	cltstvqlit	qlmpfgclld	yvrehkdng	sqyllnwcqv	iakgmnyled
	rrlvhrdlaa				
841	rnlvltkpqh	vkitdfglak	llgaekeyh	aeggkvpikw	malesilhri
	ythqsdvwsy				
901	gvtvwelmtf	gskpydgipa	seissilekg	erlpqppict	idvymimvkc
	wmidadsrp				
961	freliiefsk	mardpqrylv	iqgdermhlp	sptdsnfyra	lmdeedmddv
	vdadeylipq				
1021	qgffsspsts	rtplllsslsa	tsnnstvac	drnglqscpi	kedsflqrys

sdptgalted

1081 siddtflpvp eyinqsvpkr pagsvqnpvy hnqplnpaps rdphyqdphs  
tavgnpeyln

1141 tvqptcvnst fdspahwaqk gshqisldnp dyqqdffpke akpngifkgs  
taenaeylr

1201 apqssefiga

74	PRT	Homo sapiens	EGF	NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCWGYIG ERCQYRDLKWWELR
----	-----	-----------------	-----	--

SEQ ID NO: 75, PRT, Homo Sapiens, тенасцин-С

1 mgamtqllag vflaflalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf  
nhvyniklpv

61 gsqcsvdles asgekdlapp sepsesfgeh tvdgenqivf thriniprra  
cgcaaapdvk

121 ellsrleele nlvsslreqc tagagcclqp atgrldtrpf csgrgnfste  
gcvcvcepww

181 kgpncsepec pgnchlrgrc idgqcciddg ftgedcsqla cpsdcndqgk  
cvngvcicfe

241 gyagadcsre icpvpcseeh gtcvdglcvc hdgfagddcn kplclnncyn  
rgrcvenecv

301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac  
htqgrceegq

361 cvcdegfagv dcsekrpad chnrgrcvdg rcecdgftg adcgelkcpn  
gcsghgrcvn

421 gqcvcdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsmc  
pndchqhgrc

481 vngmvcddg ytgedcrdrq cprdcnrgl cvdggcvced gftgpdcael  
scpndchggg

541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgq grcvdggqic hegftgldeg  
qhscpsdcnn

601 lgqcvsgrci cnegysgedc sevspkdlv vtevteetvn lawdnemrvt  
eylvvytpth

661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat  
ylpapeglkf

721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifrhMn kedegaitks lrrpetsyrq  
tglapggqeye

781 islhivknnt rgpglkrvtt trldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei

dgieltygik

841 dvpqdrttid ltedenqysi gnlkpdteye vslisrrgdm ssnpaketft  
tgldaprnlr

901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt  
tltgllrpgte

961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpla  
kfdryrlmys

1021 lptgqwgvgvq lprnttsyvl rglepggqeyn vlltaekgrh kskparvka  
teqapelenl

1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiiqvqe ankveaarnl tvpgslravd  
ipglkaatpy

1141 tvsiygvigq yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwa lklnwtapeg  
ayeyffiqvq

1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitirgvtq dfsttplsve  
vlteevpdmg

1261 nltvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs  
meipglragt

1321 pytvtlhgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dglrlnwtaa  
ДHKyehfviq

1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls  
aeastakepe

1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrllle tveynisgae  
rtahisglpp

1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm  
asenafdsfl

1561 vtvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp  
lraeivteae

1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvfdnf vlkirdtkkq sepleitlla  
pertrditgl

1681 reateyeiel ygiskgrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw  
raptaqvesf

1741 rityvpitgg tpsmvtvdgt ktqtrlvkli pgveylvsii amkgfeesep  
vsgsfttald

1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekvpe itrvtsgntv  
eyaltdlepa

1861 teytlrifae kgpqksstit akfttdldsp rdltatevqs etalltwrpp

rasvtgyllv

1921 yesvdgtvke vivgpdttsty sladlspsth ytakiqalng plrshMiqti  
fttiglllypf

1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaeal evfcdmtsdg ggwivflrrk  
ngrenfyqnw

2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaqqy elrvdlrdhg etafavydkf  
svgdaktryk

2101 lkvegysgta gdsamayhngr sfstfdktd saitncalsy kgafwyrnch  
rvnlmgrygd

2161 nnhsqgvnwf hwkghehsiq faemklrpsn frnlegrrkr a

76	PRT	Искусст- венная	Fibcon	LdaptcHqvtnvtdtsitvswippsatit gyritytpsngpgepkeiivppsstw titgitpgveywsIyaIkdnqespplvgt qtt
77	PRT	Искусст- венная	10-й домен FN3 фибронектина (FN10)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTiTVYA VTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	Искусст- венная	Линкер	GSGS
79	PRT	Искусст- венная	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
80	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAP
81	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAPAPAPAP
82	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPA PAPAPAPA PAP

84	PRT	Искусственная	Линкер	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA
85	PRT	Искусственная	Петля BC Tencon	TAPDAAFD

86	PRT	Искусственная	Петля GF Tencon	KGGHRSN
87	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17 Петля BC	ADPHGFYD
88	PRT	Искусственная	P54AR4-17 Петля BC	TYDRDGYD
89	PRT	Искусственная	P54AR4-47 Петля BC	WDPFSFYD
90	PRT	Искусственная	P54AR4-48 Петля BC	DDPRGFYE
91	PRT	Искусственная	P54AR4-73 Петля BC	TWPYADLD
92	PRT	Искусственная	P54AR4-74 Петля BC	GYNGDHFD

93	PRT	Искусственная	P54AR4-81 Петля BC	DYDLGVYD
94	PRT	Искусственная	P54AR4-S3 Петля BC	DDPWDFYE
95	PRT	Искусственная	Петли FG EGFR	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	Искусственная	Петли FG EGFR	LGSYYFEHDVM
97	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ЕСВ97; P54AR4- 83v22	Atggtgccagcgccgaagaacctggtag ltagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgt gggcgttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtc ggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttcciacgac ctgaccggttigaagccgggt accgagtaiacggtgagcatctacggtg itcacaigtctataaggaca ctaatatccgcggtcrgcctctgagcgc

				cattttcaccacc
98	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECB15; P54AR4- 83v2	Atgctgccagcccctaagaatctggtcg tgagcgaagtaaccgagga cagcgcccgcctgagctgggacgaccg tgggcgttctatgagtctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagt tggcgaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgagcgctcctacga tctgaccggcctgaaaccgg gtacggagtacacggtgiccatttacgg tgttcacaatgtgiataaagac aecaacatgctggcctgccgctgrcgg cgattttcaccacc
99	PRT	Искусственная	tencon 27	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLS AIFTT
100	PRT	Искусственная	Библиотека TCL 14	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFD SFXIXYEXXXXXGAEIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLSA IFTI

> SEQ ID NO: 101

PRT

Homo sapiens

c-Met

1 mkapavlapg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvHk yqlpnftaet  
piqnvilheh

61 hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanlsgg  
vwkdniHMal

121 vvdtyyddql iscgsvnrgt cqrhvfphnh tadiqsevhc ifspqieeps  
qcpdcvvsal

181 gakvlssvkd rfinffvgnt inssyfpdhp lhsisvrrlk etkdgfmflt  
dqsyidvlpe

241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtriir fcsinsglhs  
ymemplecil

301 tekrrkrstk kevfnilqaa yvskpgaqla rqigaslndd ilfgvfaqsk  
pdsaepmdrs

361 amcafpikyv ndffnkivnk nnvrclqhfy gpnhehcfnr tllrnssgce  
arrdeyrtef

421 ttalqrvdlf mgqfsevlit sistfikgdl tianlgtseg rfmqvvsrs  
gpstphvnfl

481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvitgkki tkiplnglgc rhfgscsqcl  
sappfvqcgw

541 chdkcvrsee clsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf  
rrnnkfdlkk

601 trvllgnesc tltllestmn tlkctvgpam nkfhMsiiii snhggttqys  
tfsyvdpvit

661 sispykypma ggtlltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk svnsilecy  
tpaqtistef

721 avklkidlan retsifsyre dpivyeiht ksfistwwke plnivsflfc  
fasggstitg

781 vgknlnsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsenseicct tpslqqlnlq  
lplktkaffm

841 ldgilskyfd liyvhnvfk pfekpvmism gnenvleikg ndidpeavkg  
evlkgvknsc

901 enihlhseav lctvpndllk lnsehniewk qaisstvlkg vivqpdqnt  
gliagvvsis

961 tallllllgff lwlkkkrqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt  
temvsnesvd

1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi sspllqntvh  
idlsalnpel

1081 vqavqhvvig psslivhfne vigrghfgcv yhgtlldndg kkihcaavksl  
nritdigevs

1141 qfltegiimk dfshpvnsl lgciclrsegs plvvlpymkh gdlnfirne  
thnptvkdli

1201 gfglqvakgm kylaskkfvh rdlaarncl dekftvkvad fglardmydk  
eyysvhnktg

1261 aklpvkmal eslqtqkftt ksdvwsfgvl lwelmtrgap pypdvntfdi  
tvyllqgrrl

1321 lqpeycpdpl yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrisaifs tfigehyvhv  
natyvvnkcv

1381 apypsllsse ДHKddevdtr pasfwets



102	PRT	Homo sapiens	HGF	<p> QRKRRNTiHEFKKSAKTTLiKIDFALKIK  TKKVNIADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDK  ARKQCLWFPFNSMS  3GVKK FD LYE:  NKDYIRNCIIGKGRSYXGTVSiTKSGIKCQP  WSSMIPHEHSFLPSSYRG  KDL.QENYCRNP  RGE:E:GGPwYCPTSrPE:VRYEiVCD  iPQCSEiVlECFUCRGiESYRGLMDH  TE3GKCQRWDHQTP  iHREiKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRP  WCYTLDPHTRWEYCAiEl  TCADNTMNDTDVPL  ETTEGIQGGEGYRGTvN<sup>TM</sup>NGIpcQRWDSG  YPE-IEHDMTPENFKC  KDLRENYCRNPDGS  ESPWCFTTDPNIRVGYCSQiPNCdMSHGQDC  YRNGKNYMGnLSQT  RSGLTCSMWDKNME  DLHRHiFWEpdASKLNENYCRNPDDDAHGpW  CYTGNPLIPWDYCPiS  RCEGDTTPTIVNL  DHPVISCakTKQLRWRGIPTRTNIGvVfvIV  SLRYRNKHicGGSUKESVv  VLTARQCFP3RD  lKOYEAVVLGiHDV'HGRGOEKCKQVLNVSQ  LVYGPEGSdLVLMKLAR  PAVLD0FV3TDLP  NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINyOGLLRV  AHLyMGNEKCSQHHRG  KVTlNE3ECAG  AEKIGSGPCEGOYGGPLVCEQHkMRMvIGV'  iVPGRGCAIPNRPGFV  RV'AYYAKWIHKJi  LTYKVPOS </p>
-----	-----	--------------	-----	---

103	ДНК	Искусст- венная	> cMET часть ECB97 P114AR7P95 -C5v2	Ctgccggctccgaagaacttggtggtgagcc gtgttaccgaagatagc gcacgccigagclggacggcaccggaigcgg cgltcgatagcticlgg altcgclaisttgagiiictggglagcggig aggcaatsgiiclgacggigcc gggcioigaacgctcciacgatttgaccggt ctgaaaccgggcaccga gtaigiggigaacaiictgagcgitaagggc ggiagcatcagcccaccg ctgagcgcgatcttcacgactggtggiigc
104	ДНК	Искусст- венная	> cMET часть ECB15 P114AR7P94 -A3	Ctgccggcaecgaagaacctggttgtcagcc gtgtgaecgaggatag cgcacgltigagciggaccgciccggalgca gcctstgacagcltcigga ttcgitacittgaaiiictgggtagcgggta ggcgatcgticigacggtgccg ggctctgaacgcagciaigatttgacgggcc tgaagccgggtactgagt acgiggitaacaicatggggcgitaagggigg iaaaatcagcccgccait gtccgcgatcittaccacg
105	PRT	Искусст- венная	линкер	GGGGS
106	PRT	Искусст- венная	ECB91	mipapkniwsevtedsarfswddpwafyesf liqqesekvgeaivftvpgse rsyditglkpgteytvsiiygvhnvykdnir gipIsaifttapapapapapLPAP KNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYF EFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGG SIS PPLSAIFTT

107	PRT	Искусст- венная	P53A1R5- 17v2	ipapkalvvsavtedsarlswadphgfydsf iiqyqesakvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrgip isaiftt
-----	-----	--------------------	------------------	--

108	PRT	Искусст- венная	P54AR4- 83v22	papknlwsevtedsarlswwdpwafyesf iiqyqesekvgeaivltvpgsers vdltglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmir glplsaiftt
109	PRT	Искусст- венная	P54AR4- 83v23	papknlwsevtedsarlswwdphafyesf liqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmirg iplsaiftt
110	PRT	Искусст- венная	P53A1R5- 17v22	papknlwsevtedsarlswadphgfydsf iiqyqesekvgeaivl tvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmirg iplsaiftt
111	PRT	Искусст- венная	P114AR7P94- A3v22	papknlwsrvtedsarlswtapdaafdsf wiryfevlgsgeaivltvpgsersyd tgikpgteywnilgvkkgkispplsaift t
112	PRT	Искусст- венная	P114AR9P121 -A6v2	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFVSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGV KGGISISPPLSAIFTT
113	PRT	Искусст- венная	P114AR9P122 -A7v2	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFVSKGDA VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGV KGGISISPPLSAIFTT
114	PRT	Искусст- венная	P114AR7P95- C5v2	LPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFD SFWIRYFEFLGSGEAI 7LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILSV KGGISISPPLSAIFTT
115	ДНК	Искусст- венная	ECB97	atggttgccagcgcccgaagaacctggtagt tagcgaggttactgaggac

				<p> agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtg  ggcgttctac.gagagcittct  jatccagtatcaagagagcgagaaagtcg  gtgaagegattgtgctgac  cglcccgggctccgagcgttctctacgacc  tgaccggtttgaagccgggt  accgagtataeggtgagcatctacgggtgt  tcacaatgtetataaggaca  ctaatatccgcggtctgcctctgagcgcc  atthtcaccaccgcaccggc  accggctccggctcctgccccgctgccgg  ctccgaagaacttggtggtg  agccgigtaccgaagatagcgcacgcci  gagctggacggcaccgga  gcggcgttc.gatagcittctggattcgt  atthtgagtttctgggtagcggiga  jgcaattgtictgacggtgccgggctcig  aacgetcctacgatttgac.cg  gtetgaaaccgggcaccgagtatgtggtg  aacattctgagegttaaggg  cggtagcatcagcccaccgctgagcgca  tcttcacgactggtgglg </p>
116	ДНК	Искусст- венная	ЕСВ15	<p> atgctgecagecc.ctaagaatctgggtcg  tgagcgaagtaaccgaggae  agcgcgccctgagctgggacgaccggtg  ggcgttctatgagtctttcct  gattcagtalcaagaaagcgaaaaagttg  gccaagcgatcgtccclgac  cgtcccggglagcgagcgtcctacgatc  lgaccggcclgaaaccggg  acggagtacacgggtgtccatttacgggtgt  tcacaatgtgtataaagaca  ccaacatgcgtggccigccgctgtcggcg  atthtcaccaccgcgccigc  gccagcgcctgcaccggctccgcigccgg </p>

				<p>caccgaagaacctggttgt  cagccgtgtgacc.gaggatagcgcacgt  ttgagctggaccgctccgga  gcagcctttgacagcttc.tggattcggt  actttgaatitctgggtagcggig  aggcgatcgttctgacgglgccgggctcl  gaacgcagctatgatttgacg  ggcctgaagccgggtactgagtacgtggt  taacatcatgggcggttaagg  gtggtaaaatcagcccgccattgtccgcg  atctttaccacg</p>
117	PRT	Искусст- венная	альбумин- связывающий домен	<p>idewllkeakekaieelkkagitsdyofd  linkaktvegvnalkdeilka</p>

118	PRT	Искусственная	ECB18	<p>mlpapknlvsevtedsariswddpwaf  yesfliqqesekvgeaivliv  pgsersyditgikpgteyvtvsiygvhmv  ykdtnmrglplsaifttapapapa  paplpapknlvsvrvtedsariswtapd  aafdsfwirydewvggeaivit  vpgsersyditgikpgteyyvnilgvkg  gsisvplsaifitapapapapapi  aeakvianreldkygvsdyykniinnak  tvegkaldellaalp</p>
119	PRT	Искусственная	ECB28	<p>nrilpapknivsevtedsarlswadph  gfydsfliqqesekvgealvltv  pgsersyditgikpgteyivsvrygvhmv  ykdtnmrgipisaifttapapapa  papipapknlvsvrvtedsariswtapd  aafdsfwirydewvggeaivit  vpgsersyditgikpgteyyvnilgvkg  gsisvplsaifttapapapapapi  aeakvianreldkygvsdyykniinnak  tvegkalldeilaalp</p>

120	PRT	Искусственная	ECB38	mlpapknlvsevtedsariswddpwaf yesfliqqesekvgeaivltv pgsersydliglkpgteyvtvsiiygvhnv ykdtnmrgipisaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsariswtapd aafdsfwiryfefflgsgeaivltv pgsersydltgkpgteyvvnimgvkgg kispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyknlinnak tvegvkalldeilaalp
121	PRT	Искусственная	ECB39	mlpapknlvsevtedsariswadphgf ydsfliqqesekvgeaivltv pgsersydltgkpgteyvtvsiiygvhnv ykdtnmrglplsaifttapapapa papipapknlvsvrvtedsariswtapd aafdsfwiryfefflgsgeaivltv pgsersyditglkpgteyvvnirngvkg gkispplsaifttapapapapapi aeakvianreldkygvsdykniinnak lvegvkalideiiaaip
122	PRT	Искусственная	P53A1R5 -17 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWADPHGFY DSFLIQY QESEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	Искусственная	P54AR4- 17 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTYDRDGY DSFLIQY QESEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	Искусственная	P54AR4- 47 c Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNBDH FDSFLIQYQESEKVGAINLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNM RGLPLSAEFTT
125	PRT	Искусственная	P54AR4-	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPRGFY

			48 c Met	ESFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMR GLPLSAEFTT
126	PRT	Искусственная	P54AR4- 73 c Met	M L P A P K N L W S E V T E D S L R L S V V T W P Y A D L D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V H N V Y K D T N M R G L P L S A E F T T
127	PRT	Искусственная	54AR4- 74 c Met	M L P A P K N L V V S E V T E D S L R L S W G Y N G D H F D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I I Y G V H N V Y K D T N M R G L P L S A E F T T
128	PRT	Искусственная	P54AR4- 81 c Met	M L P A P K N L W S E V T E D S L R L S W D Y D L G V Y F D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V H N V Y K D T N M R G L P L S A E F T T
129	PRT	Искусственная	P54AR4- 83 c Met	M L P A P K N L W S E V T E D S L R L S W D D P W A F Y E S F L I Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V H N V Y K D T N M R G L P L S A E F T T

130	PRT	Искусственная	P54CR4- 31 c Met	M L P A P K N L W S E V T E D S L R L S W T A P D A A F D S F U Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I I Y G V L G S Y V F E H D V M L P L S A E F T T
131	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2 c Met	M L P A P K N L W S E V T E D S A R L S W D D P W A F Y E S F L I Q Y Q E S E K V G E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V H N V Y K D T N M R G L P L S A I F T T
132	PRT	Искусственная	P54CR4- 31v2 c Met	M L P A P K N L W S E V T E D S A R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V L G S W F E H D V M L P L S A I F I T
133	PRT	Искусственная	P54AR4-	M L P A P K N L W S E V T E D S L R L S W T W P Y A D L

			73v2 с Met	DSFLIQYQESEKVGAINLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIY GVH NVYKDTNMRGLPL SAEFTT
134	PRT	Искусственная	P53A1RS -17v2 с Met	mipapknivvsevtadsariswadpbgf ydsfiiqqesekvgeaivitvpgser sydltglkpgteyvtvsiygvhnvykdt mrglplsaiftt
135	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v22 с Met	mipapknivsevtedsarfwddpwafy esfliqqesekvgeaivftvpgse rsydltglkpgteyvtvsiygvhnvykdt nirgiplsaiftt
136	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v23 с Met	rnlpapkriivvsevtedsariswddph afyesniqqesekvgeaivitvpgser syditglkpgteyvtvsiygvhnvykdt irgiplsaiftt
137	PRT	Искусственная	P53A1R5 -17v22 с Met	mlpapknlwsevtedsarlswadphgfy dsfliqqesekvgeaivI tvpgser sydltglkpgteyvtvsiygvtnvykdt nirgiplsaiftt
138	PRT	Искусственная	ECB1 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSIYGVHNVIKDTNMRG LPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF D S F W i RYD EVVv'GG EAI VLTVP GSERSYDLTGLKPG TEYYVNI LGVKGGSI SVPLSAI FIT
139	PRT	Искусственная	ECB2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVG.EAiVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVIKDTNMR GLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTA PDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP SERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKIS PPLSAIFTT



140	PRT	Искусственная	ECB3 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGAEI VLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYG VHNVYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAi VLTVPGSERSY DLTGLKPG TEYWQIIIGVKGGHISLPLSAIFTT
-----	-----	---------------	-----------------	--

141	PRT	Искусственная	ECB4 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGAEI VLTVPCSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAP KNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFI RYDEFLLRSGEAi VLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYWVTi LGVKGLVSTPLSAIFTT
142	PRT	Искусственная	ECB5 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQESEKVGAEI VLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYG VHNVYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAi VLTVPGSERSY DLTGLKPG TEYWNIMGVKGKISPPLSAIFTT
143	PRT	Искусственная	ECB6 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQ ESEKVGAEI VLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSiYG VHNVYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAi VLTVPGSERSY DLTGLKPG TEYWQII GVKGGHi SLPLSAi FTT
144	PRT	Искусственная	ECB7 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQ ESEKVGAEI VLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSiYG VHNVYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAi VLTVPGSERSY

				DLTGLKPG TEYWQII GVKGGHi SLPLSAI FTT
145	PRT	Искусственная	ECB15 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGGEAlVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAiFTTAPAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRY FEFLGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYWNiMGVKGGKIS PPLSAI FTT
146	PRT	Искусственная	ECB27 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGGEAlVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAiFTTAPAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRY DEVWGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVNiLGVKGGSiSVPPLSAI FTT
147	PRT	Искусственная	ECB60 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLiQYQESEKVGGEAlVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAiFTTAPAPAPAPAPAPMLPAPK NLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFLGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYWNIMGVKGGKiS PPLSAI FTT
148	PRT	Искусственная	ECB37 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLiQYQESEKVGGEAlVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAI FTTAPAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRY DEVWGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVNiLGVKGGSiSVPPLSAI FTT

149	PRT	Искусственная	ECB94 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQ ESEKVGGEAI VLTVP CSERSYDLTGLKPGT EYTVSiYG VHNiVYKDTNi RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F W i RYF E F L G S G E AiVL'EVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNiL GVKGGKIS PPLSAiFTT
150	PRT	Искусственная	ECB95 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQ ESEKVGGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGT EYTVSiYG VHNiVYKDTNi RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPAPLPAPKNL. WS RVTE

				D SAR LS W TAP D AAF D S F W1R YF E FVG S G EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNI LGVKGGSI SPPLSAIFTT
151	PRT	Искусственная	ECB96 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSVDDPVVAF YESFLIQYQESEKVGAEIIVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNi RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFE FV'SKGDIAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
152	PRT	Искусственная	ECB97 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYES FLIQYQ ESEKVGAEIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNBYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LSVV TAP D AAF D S F W1RY F E F L GS G E AiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILS VKGGSISP PLSAIFTT
153	PRT	Искусственная	ECB106 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSVDDPHAFYE SFLIQYQESEKVG.EAIV'LVTPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSVVTAPDAAFDSFWIRYF EFLGSGEAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
154	PRT	Искусственная	ECB107 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYES FLIQYQ ESEKVGAEIIVLTV'PGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYG VHNBYKDTNi RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F W i RYF E F VG S G EAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNiL

				GVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	Искусственная	ECB108 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYE SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPCSESYDL TGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL 'WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYF EFVSKGDAIVLTVPGSESYDLTGLKPGT EY'WNILGVKGGSISPPLSAiFTT
156	PRT	Искусственная	ECB109 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYE SFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSESYDLTGLKPGT EYTVSiYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFE FLGSGE AIVLTV'PGSESYDLTGLKPGTEYWNIL SVKGGSISP PLSAI FTT

157	PRT	Искусственная	ECB118 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FUQYQ ESEKVGAEIVLTVPCSESYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F WIRYF E F L GS G E AIVLTVPGSESYDLTGLKPGTEYWNILG VKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	Искусственная	ECB119 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FUQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSESYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL. WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F WIR YF E FVG S G EAIVLTVPGSESYDLTGLKPGTEYWNIL

				GVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	Искусственная	ECB120 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F WI RYF E F VS KG D AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILG VKGG SIS PPLSAiFTT
160	PRT	Искусственная	ECB121 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FLiQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFE FLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILS VKGG SIS PLSAIFTT
161	PRT	Искусственная	ECB91 без Met	ipapknlwsevtedsarlswwddpwafyes fliqyqesekvgeaivltvpgsers ydlgtglkpgteytsiygvhnvykdnir glpIsaifttapapapapapLPAPK NLVVSRVTFDSARLSVVTAPDAAFDSFWi RYFER.GSGEaiyL.TVP GSERSYDLTGLKPGTEYWNiLSVKGG SIS PPLSAIFTT
162	PRT	Искусственная	ECB18 без Met	Ipapknlvsevtedsarlswwddpwafye sfliqyqesekvgeaivltvp gsersydlgtglkpgteytsiygvhnvyk dtmrglplsifttapapapap aplpapknlwsrvtedsarlswtapdaaf dsfwirydevvvggeaivltv pgsersydlgtglkpgteyyvriilgvkkg sisvpisifttapapapapapla

				eakvlanreldkygvsdyykniinnaktv egvkalldeilaalp
163	PRT	Искусственная	ECB28 без Met	IpapknivvsevTedsarlswadphgfyd sfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteyvtvsiygvhnvykd tnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaaf dsfwirydevwggeaivltvpg gsersydltglkpgteyyvnilgvkgsi svplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktve gvkalldeilaalp
164	PRT	Искусственная	ECB38 без Met	Ipapknlvsevtedsarlswwdpwafye sfliqyqesekvgeaivltvpg gsersyditglkpgteyvtvsiygvhnvyk dtnmrglplsaifttapapapap aplpapkniwsvrvtedsarlswtapdaaf dsfwiryfeflgsgeaivltvpg gsersydltglkpgteyvriimgvkggk ispplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktv egvkalldeilaalp
165	PRT	Искусственная	ECB39 без Met	lpapknlvsevtedsarlswadphgfy dsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteyvtvsiygvhnvyk dtnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaa fdsfwiryfeflgsgeaivltvpg sersydltglkpgteyvvnimgvkggki spplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktv egvkalldeilaalp
166	ДНК	Искусственная	ECB97 без Met	ttgccagcgccgaagaacctggtagtta gcgaggttactgaggacagc

				<p> gcgcgtctgagctgggacgatccgtggg  cgttctacgagagctttctgat  ccagtatcaagagagcgagaaagtcggt  gaagcgattgtgctgaccgt  cccgggctccgagcgttccctacgacctg  accggtttgaagccgggtacc  gagtatacgggtgagcatctacgggtgttc  acaatgtctataaggacactaa  tatccgcggtctgcctctgagcgcatt  ttcaccaccgcaccggcaccg  gctccggctcctgccccgctgccggctc  cgaagaacttggtggtgagcc  gtgttaccgaagatagcgcacgcctgag  ctggacggcaccggatgcg  gcgttcgatagcttctggattcgtatt  ttgagtttctgggtagcggtgaggc  aattgttctgacggtgccgggctctgaa  cgctcctacgatttgaccgggtct  gaaaccgggcaccgagtatgtggtgaac  attctgagcgttaagggcggt  agcatcagcccaccgctgagcgcgatct  tcacgactggtggttgc </p>
167	ДНК	Искусственная	ECB15 без Met	<p> ctgccagcccctaagaatctggtcgtga  gcgaagtaaccgaggacag  cgcccgctgagctgggacgaccggtgg  gcgttctatgagtctttcctga  ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttgg  cgaagcgatcgtcctgaccg  tcccgggtagcgcgctcctacgatct  gaccggcctgaaaccgggta  cggagtacacgggtgtccatttacgggtgt  tcacaatgtgtataaagacacc  aacatgctggcctgccgctgtcggcga  ttttcaccaccgcgctgcgc  cagcgcctgcaccggctccgctgccggc </p>

				<p>accgaagaacctggttgtca  gccgtgtgaccgaggatagcgcacgttt  gagctggaccgctccggatg  cagcctttgacagcttctggattcgtta  ctttgaatcttctgggtagcgggtgag  gcgatcgttctgacgggtgccgggctctg  aacgcagctatgatttgacggg  cctgaagccgggtactgagtacgtggtt  aacatcatgggcttaaggggtg  gtaaaatcagcccgccattgtccgcgat  ctttaccacg</p>
168	ДНК	Искусственная	<p>&gt; EGFR  часть  ECB97;  P54AR4-  83v22  без Met</p>	<p>ttgccagcgcgaagaacctggtagtta  gcgaggttactgaggacagc  gcgcgtctgagctgggacgatccgtggg  cgttctacgagagctttctgat  ccagtatcaagagagcagaaaagtcggt  gaagcgattgtgctgaccgt  cccgggctccgagcgttccctacgacctg  accggtttgaagccgggtacc  gagtatacgggtgagcatctacgggtgttc  acaatgtctataaggacactaa  tatccgcgggtctgcctctgagcgcatt  ttcaccacc</p>
169	ДНК	Искусственная	<p>&gt; EGFR  часть  ECB15;  P54AR4-  83v2  без Met</p>	<p>ctgccagcccctaagaatctggtcgtga  gcaagtaaccgaggacag  cgcccgcctgagctgggacgaccctggg  ggttctatgagtctttcctga  ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttgg  cgaagcgatcgtcctgaccg  tcccgggtagcagcgcctcctacgatct  gaccggcctgaaaccgggta  cggagtacacgggtgtccatttacgggtgt  tcacaatgtgtataaagacacc  aacatgctggcctgccgctgtcggcga  ttttcaccacc</p>



170	PRT	Искусственная	ECB94 с C-концевым цистеином	MLPAPKN LVVSEVTEDSARLSWD D PWAFFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAP APAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVN ILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
171	PRT	Искусственная	ECB95 с C-концевым цистеином	MLPAPKN LVVSEVTEDSARLSWD D PWAFFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTED SARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFVSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVN ILGVKGGSI SPPLSAIFTTC

172	PRT	Искусственная	ECB96 с C-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPW AFYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
173	PRT	Искусственная	ECB97 с C-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPW AFYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV

				VNILSVKGGGISPPLSAIF TTC
174	PRT	Искусственная	ЕСВ106 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQESEKVG EAIVLTVP SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIF TTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGKISPPLSAIF TTC
175	PRT	Искусственная	ЕСВ107 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQESEKVG EAIVLTVP SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIF TTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSFWIRYFEFV GSG EAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGGISPPLSAIF TTC
176	PRT	Искусственная	ЕСВ108 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQESEKVG EAIVLTVP SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIF TTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSFWIRYFEFV SKG DAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGGISPPLSAIF TTC
177	PRT	Искусственная	ЕСВ109 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQESEKVG EAIVLTVP SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIF TTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYV VNILSVKGGGISPPLSAIF TTC
178	PRT	Искусственная	ЕСВ91 с С- концевым	mlpapknlwsevtedsarlswwdpwa fyesfliqyqesekvgeaivltvpgs

			цистеином	ersydltglkpgteytsiygvhnvy kdnirglpIsaifttapapapapap LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDA AFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVK GGSISPPLSAIFTTC
--	--	--	-----------	---

> SEQ ID NO: 179

PRT

Искусственная

Петля FG EGFR-связывающего домена FN3

HN<sub>9</sub>VYKDTNX<sub>9</sub>RGL;

где X<sub>9</sub> представляет собой M или I

> SEQ ID NO: 180

PRT

Искусственная

Петля FG EGFR-связывающего домена FN3

LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180),

> SEQ ID NO: 181

PRT

Искусственная

Петля BC EGFR-связывающего домена FN3

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 181); где

X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;

X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;

X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;

X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;

X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;

X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D; и

X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L.

> SEQ ID NO: 182

PRT

Искусственная

EGFR-связывающий домен FN3

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DSFLIQYQSEKVGAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHN<sub>9</sub>VYKDTNX<sub>9</sub>RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;  
 X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;  
 X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;  
 X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;  
 X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;  
 X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;  
 X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D;  
 X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L; и  
 X<sub>9</sub> представляет собой M или I

> SEQ ID NO: 183

PRT

Искусственная

EGFR-связывающий домен FN3

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP  
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDMVLP LSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

где

X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;  
 X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;  
 X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;  
 X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;  
 X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;  
 X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;  
 X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D; и  
 X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L.

> SEQ ID NO: 184

PRT

Искусственная

Последовательность тяжа C и петли CD c-Met-связывающего  
 домена FN3

DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub> (SEQ ID NO: 184), где

X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V;  
 X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;  
 X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;  
 X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;  
 X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;  
 X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K; и

X<sub>16</sub> представляет собой E или D; и

> SEQ ID NO: 185

PRT

Искусственная

Тяж F и петля FG с-Met-связывающего домена FN3

TEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>V KGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub> (SEQ ID NO: 185), где

X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;

X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;

X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;

X<sub>20</sub> представляет собой G или S;

X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;

X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L; и

X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

> SEQ ID NO: 186

PRT

Искусственная

с-Met-связывающий домен FN3

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DAFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>  
 AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>VKGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub>PLSAEFTT (SEQ ID  
 NO: 186),

где

X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V; и

X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;

X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;

X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;

X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;

X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K;

X<sub>16</sub> представляет собой E или D;

X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;

X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;

X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;

X<sub>20</sub> представляет собой G или S;

X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;

X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L; и

X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

> SEQ ID NO: 187

PRT

Искусственная

Домен FN3 EGFR биспецифической к EGFR/c-Met молекулы,  
содержащей домен FN3

LPAPKNLVVSX<sub>24</sub>VTX<sub>25</sub>DSX<sub>26</sub>RLSWDDPX<sub>27</sub>AFYX<sub>28</sub>SFLIQYQX<sub>29</sub>SEKVGEAIX<sub>30</sub>LTVP  
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX<sub>31</sub>VHNVYKDTNX<sub>32</sub>RGLPLSAX<sub>33</sub>FTT (SEQ ID NO:  
187), где

X<sub>24</sub> представляет собой E, N или R;

X<sub>25</sub> представляет собой E или P;

X<sub>26</sub> представляет собой L или A;

X<sub>27</sub> представляет собой H или W;

X<sub>28</sub> представляет собой E или D;

X<sub>29</sub> представляет собой E или P;

X<sub>30</sub> представляет собой N или V;

X<sub>31</sub> представляет собой G или Y;

X<sub>32</sub> представляет собой M или I; и

X<sub>33</sub> представляет собой E или I;

> SEQ ID NO: 188

Домен FN3 c-Met биспецифической к EGFR/c-Met молекулы,  
содержащей домен FN3

LPAPKNLVVSX<sub>34</sub>VTX<sub>35</sub>DSX<sub>36</sub>RLSWTAPDAAFDSEFWIRYFX<sub>37</sub>FX<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>GX<sub>41</sub>AIX<sub>42</sub>L  
TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVIX<sub>43</sub>X<sub>44</sub>VKGGX<sub>45</sub>ISPPLSAX<sub>46</sub>FTT (SEQ ID NO:  
188); где

X<sub>34</sub> представляет собой E, N или R;

X<sub>35</sub> представляет собой E или P;

X<sub>36</sub> представляет собой L или A;

X<sub>37</sub> представляет собой E или P;

X<sub>38</sub> представляет собой V или L;

X<sub>39</sub> представляет собой G или S;

X<sub>40</sub> представляет собой S или K;

X<sub>41</sub> представляет собой E или D;

X<sub>42</sub> представляет собой N или V;

X<sub>43</sub> представляет собой L или M;

X<sub>44</sub> представляет собой G или S;

X<sub>45</sub> представляет собой S или K; и

X<sub>46</sub> представляет собой E или I.

189	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-V9C с метионином	MLPAPKNLCVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
190	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S11C с метионином	MLPAPKNLVVCEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
191	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E12C с метионином	MLPAPKNLVVSCVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
192	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E15C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTCD SARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
193	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-D16C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTECSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
194	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S17C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDCARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
195	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S21C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLCWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
196	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S31C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYECFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
197	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-Q35C с	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLICYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD

			метионином	THMRGLPLSAIFTT
198	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S39C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQECEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
199	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K41C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESECVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
200	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-V42C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKCGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
201	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-I46C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEACVLTVPGE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
202	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L48C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVCTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
203	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T49C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLCVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
204	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E54C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSC RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
205	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-R55C с метионином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE CSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
206	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T6C с	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE



			метионином	RSYDLCGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
207	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G61C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTCLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
208	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K63C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
209	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G65C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPCTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
210	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-N7C с метионином	MLPAPKCLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
211	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S71C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVCIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
212	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L89C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPCSAIFTT
213	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S9C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLCAIFTT
214	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2A91C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSCIFTT
215	PRT	Искусственная	P54AR4-	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA

			83v2-I92C с метионином	FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSACFTT
216	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T94C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFCT
217	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-cys с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTGGHHHHHHC
218	PRT	Искусственная	ECB147 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVMNIMSVKGGISISPPLS AIFTTAPSPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
219	PRT	Искусственная	ECB147v1 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVMNIMSVKGGISISPPLS AIFTTAPSPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
220	PRT	Искусственная	ECB147v2 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA

				<p>PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS  FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD  LTGLCPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS  AIFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANREL  DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD  EILAALP</p>
221	PRT	Искусственная	ЕСВ147v3 с метионином	<p>MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA  FYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSE  RSYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKD  THMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPA  PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS  FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD  LTGLCPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS  AIFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANREL  DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD  EILAALP</p>
222	PRT	Искусственная	ЕСВ147v4 с метионином	<p>MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA  FYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSE  RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD  THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA  PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS  FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD  LTGLKPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS  AIFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANREL  DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD  EILAALP</p>
223	PRT	Искусственная	ЕСВ147v5 с метионином	<p>MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA  FYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSE  RSYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKD  THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA  PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS  FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD  LTGLCPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS  AIFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANREL  DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD</p>

				EILAALP
224	PRT	Искусственная	ECB147v6 с метионином	MLPAPKKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLCPGTEYTVS IYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS AIFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
225	PRT	Искусственная	ECB147v7 с метионином	MLPAPKKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS AIFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
226	PRT	Искусственная	ECB82-cys с метионином	MLPAPKKNLVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLS AIFTTAPAPAPAPAPTIDEWLLKEAKE KAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVE GVNALKDEILKAGGHHHHHHHC
227	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2-V8C без метионина	LPAPKNLCVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT

228	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S1C без метионина	LPAPKNLVVCEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
229	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E11C без метионина	LPAPKNLVVSCVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
230	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E14C без метионина	LPAPKNLVVSEVTCD SARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
231	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-D15C без метионина	LPAPKNLVVSEVTECSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
232	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S16C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDCARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
233	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S2C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLCWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
234	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S3C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YECFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
235	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-Q34C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLICYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
236	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S38C без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQECEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT

			метионина	HMRGLPLSAIFTT
237	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K4C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESECVGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
238	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-V41C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKCGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
239	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-I45C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEACVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
240	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L47C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVCTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
241	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T48C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLCVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
242	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E53C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSCR SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
243	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-R54C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSEC SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
244	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T59C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLCGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
245	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G6C	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER

			без метионина	SYDLTCLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
246	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K62C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
247	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G64C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPCTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
248	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-N6C без метионина	LPAPKCLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
249	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S7C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
250	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L88C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPCSAIFTT
251	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S89C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLCAIFTT
252	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2A9°C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSCIFTT
253	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-I91C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSACFTT
254	PRT	Искусственная	P54AR4-	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF

			83v2-T93C без метионина	YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFCT
255	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-cys без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTGGHHHHHHC
256	PRT	Искусственная	ЕСВ147 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMSVKGG SISPPLSA IFTTAPSPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVS DYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
257	PRT	Искусственная	ЕСВ147v1 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMSVKGG SISPPLSA IFTTAPSPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVS DYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
258	PRT	Искусственная	ЕСВ147v2 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLCPGTEYVVNIMSVKGG SISPPLSA IFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANRELD



				KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
259	PRT	Искусственная	ЕСВ147v3 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVSIIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAEIVLTVPGSERSYDL TGLCPGTEYVVNIMSVKGGSI SPPLSA IFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
260	PRT	Искусственная	ЕСВ147v4 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAEIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMSVKGGSI SPPLSA IFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
261	PRT	Искусственная	ЕСВ147v5 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVSIIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAEIVLTVPGSERSYDL TGLCPGTEYVVNIMSVKGGSI SPPLSA IFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
262	PRT	Искусственная	ЕСВ147v6 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVSIIYGVHNVYKDT

				HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMSVKGGISPPLSA IFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
263	PRT	Искусственная	ЕСВ147v7 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMSVKGGISPPLSA IFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
264	PRT	Искусственная	ЕСВ82-cys без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSA IFTTAPAPAPAPAPTIDEWLLKEAKEK AIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEG VNALKDEILKAGGHHHHHHC
265	PRT	Искусственная	Tencon-cys	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAA FDSFLIQYQESEKVGAEINLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVS IYGVKGGHRSN PLSAEFTTGGHHHHHHC

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Janssen Biotech, Inc.  
Jacobs, Steven  
Goldberg, Shalom  
Lin, Tricia  
O'Neil, Karyn

<120> СВЯЗУЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА ТИПА III С ВНЕДРЕННЫМИ  
ОСТАТКАМИ ЦИСТЕИНА

<130> JBI5039WOPST

<140> Переуступка прав

<141> 2014-10-13

<150> 61/890,539

<151> 2013-10-14

<160> 265

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Каркас Tencon FN3

<400> 1

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser  
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85

<210> 2

<211> 58

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> праймер

<400> 2  
ggaacagga tctaccatgc tgccggcgcc gaaaaacctg gttgtttctg aagttacc 58

<210> 3  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<400> 3  
аасасгtag атагааасгg t 21

<210> 4  
<211> 131  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<400> 4  
cggcggtag aacgcggcta caattaatac атаасссат ссссctggtg асааттаатс 60  
atcggctcgt атаатgtgtg гааттgtgag cggataаааа ttccacacag гааасaggat 120  
ctaccatgct g 131

<210> 5  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<400> 5  
cggcggtag aacgcggcta с 21

<210> 6  
<211> 66  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (26)..(27)  
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (29)..(30)  
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (32)..(33)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (35)..(36)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (38)..(39)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (41)..(42)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (44)..(45)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<400> 6  
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnaacac cgtagataga 60  
aacggt 66

<210> 7  
<211> 69  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (26)..(27)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (29)..(30)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (32)..(33)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (35)..(36)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (38)..(39)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (41)..(42)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (44)..(45)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (47)..(48)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 7  
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsns nnsnnsnaa caccgtagat 60  
agaaacggt 69

<210> 8  
<211> 72  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (26)..(27)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (29)..(30)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (32)..(33)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (35)..(36)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (38)..(39)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (41)..(42)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (44)..(45)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (47)..(48)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (50)..(51)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 8

gggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta

60

gatagaaacg gt

72

<210> 9

<211> 75

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> праймер

<220>

<221> прочие приложения

<222> (26)..(27)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (29)..(30)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (32)..(33)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (35)..(36)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (38)..(39)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (41)..(42)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (44)..(45)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> прочие приложения

<222> (47)..(48)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (50)..(51)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (53)..(54)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 9  
gggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnaacacc 60

gtagatagaa acggt 75

<210> 10  
<211> 80  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (28)..(29)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (31)..(32)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (34)..(35)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (37)..(38)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (40)..(41)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (43)..(44)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (46)..(47)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>



<221> прочие приложения  
<222> (49)..(50)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (52)..(53)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (55)..(56)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (58)..(59)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 10  
rmggtggtga attccgcaga cagcgggnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsnnsna 60  
acaccgtaga tagaaacggt 80

<210> 11  
<211> 81  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (26)..(27)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (29)..(30)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (32)..(33)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (35)..(36)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (38)..(39)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (41)..(42)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (44)..(45)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (47)..(48)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (50)..(51)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (53)..(54)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (56)..(57)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (59)..(60)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 11  
ggtagtgat tccgagaca gcggnnsnn snnsnnsns nnsnnsnns nsnnsnnsn 60  
aacaccgtag atagaacgg t 81

<210> 12  
<211> 81  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<400> 12  
aagatcagtt gcggccgcta gactagaacc gctgccatgg tgatggtgat ggtgaccgcc 60  
ggtagtgat tccgagaca g 81

<210> 13  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<400> 13  
cggcggtag aacgcggcta caattaatac 30

<210> 14  
<211> 22

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер

<400> 14  
 catgattacg cсааgстсаg аа 22

<210> 15  
 <211> 65  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер

<400> 15  
 gagccgcccсc caccggttta atggtgatgg tgatggtgac caccggtggt gaattccgca 60  
 gасаg 65

<210> 16  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер

<400> 16  
 ааgаaggаgа ассggtatgc tgссggссgсс gааааас 37

<210> 17  
 <211> 89  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер

<400> 17  
 tttgggaagc ttctaggtct cggcgggtcac catcaccatc accatggcag cggttctagt 60  
 ctagcggccc саactgatct tcассааас 89

<210> 18  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 18

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 19

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 19

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 20

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 20

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 21  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 21

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 22  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 22

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 23

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 23

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 24

<211> 95

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 24

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Phe Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 25  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 25

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 26  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 26

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val Phe  
65 70 75 80

Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 27  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 27

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80



Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 28  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 28

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val Phe  
65 70 75 80

Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 29  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 29

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90

<210> 30  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<400> 30

Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr  
1 5 10 15

Ala Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Ala  
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Cys  
35

<210> 31  
<211> 65  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер

<400> 31

Gly Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly  
20 25 30

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly Thr Gly  
35 40 45

Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala  
50 55 60

Gly  
65

<210> 32  
<211> 89

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 32

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 33  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 33

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Phe  
20 25 30

Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Leu Val Ser  
65 70 75 80

Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 34  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 34

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Ile Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

His Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 35  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 35

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Gly Leu Ser  
65 70 75 80

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 36  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 36

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Val  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser  
65 70 75 80

Ile Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 37  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 37

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Thr Val Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 38  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 38

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Gly Ile Asn Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser  
65 70 75 80

Tyr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 39  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 39

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Asp Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Gly Val Thr Ile Asn Gly Val Lys Gly Gly Arg Val Ser  
65 70 75 80

Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 40

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 40

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly His Ile Ser  
65 70 75 80

Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 41

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 41

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 42

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 42

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Ala Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Arg Val Ser  
65 70 75 80

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 43

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 43

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15



Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 44  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 44

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Tyr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 45  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 45

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser  
65 70 75 80

Ile Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 46

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 46

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Thr Val Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 47

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 47

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Thr Thr Ala Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 48

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 48

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Leu Leu Ser Thr Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 49  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 49

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser Lys Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 50  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 50

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly  
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val  
115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe  
130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala  
145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly  
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly  
180 185 190

Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200 205

<210> 51

<211> 204

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 51

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly  
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr  
115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile  
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu  
165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly  
180 185 190

Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200

<210> 52

<211> 205

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 52

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly  
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val  
 115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe  
 130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala  
 145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly  
 165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly  
 180 185 190

Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
 195 200 205

<210> 53  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 53

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
 20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
 65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly  
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val  
115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe  
130 135 140

Asp Ser Phe Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala  
145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly  
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly  
180 185 190

Gly Leu Val Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200 205

<210> 54  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и с-Met

<400> 54

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly  
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
100 105 110



Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val  
 115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe  
 130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala  
 145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly  
 165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly  
 180 185 190

Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
 195 200 205

<210> 55  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 55

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
 20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
 65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly  
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val  
 115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe  
130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala  
145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly  
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly  
180 185 190

Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200 205

<210> 56

<211> 205

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 56

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly  
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val  
115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe  
130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala  
145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly  
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly  
180 185 190

Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200 205

<210> 57

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 57

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 58

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и с-Met

<400> 58

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val  
130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile  
 165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
 180 185 190

Thr Thr

<210> 59  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 59

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
 20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
 65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn  
 100 105 110

Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr  
 115 120 125

Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe  
 130 135 140

Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160

Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn  
165 170 175

Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile  
180 185 190

Phe Thr Thr  
195

<210> 60

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 60

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val  
130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 61

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 61

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 62

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 62

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175



Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 63

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 63

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 64  
<211> 194  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 64

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 65

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 65

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 66  
<211> 194  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 66

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 67  
<211> 194  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 67

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 68  
<211> 194

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 68

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 69  
<211> 194  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 69

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 70

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 70

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 71

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met



<400> 71

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 72

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и с-Met

<400> 72

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 73  
<211> 1210  
<212> PRT  
<213> HOMO SAPIENS

<400> 73

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20

25

30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe  
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn  
50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys  
65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val  
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr  
100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn  
115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu  
130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu  
145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met  
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro  
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln  
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg  
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys  
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp  
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro  
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly

275

280

285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His  
 290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu  
 305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val  
 325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn  
 340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp  
 355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr  
 370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu  
 385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp  
 405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln  
 420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu  
 435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser  
 450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu  
 485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro  
 500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn  
 515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly

530

535

540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro  
 545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro  
 565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val  
 580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp  
 595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys  
 610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly  
 625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu  
 645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His  
 660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu  
 675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu  
 690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser  
 705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu  
 725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser  
 740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser  
 755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser  
 770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp



1040                                      1045                                      1050  
 Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg  
   1055                                      1060                                      1065  
  
 Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp  
   1070                                      1075                                      1080  
  
 Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro  
   1085                                      1090                                      1095  
  
 Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln  
   1100                                      1105                                      1110  
  
 Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro  
   1115                                      1120                                      1125  
  
 His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln  
   1130                                      1135                                      1140  
  
 Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala  
   1145                                      1150                                      1155  
  
 Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln  
   1160                                      1165                                      1170  
  
 Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys  
   1175                                      1180                                      1185  
  
 Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln  
   1190                                      1195                                      1200  
  
 Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala  
   1205                                      1210

<210> 74  
 <211> 53  
 <212> PRT  
 <213> HOMO SAPIENS

<400> 74

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His  
 1                                      5                                      10                                      15  
  
 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn  
   20                                      25                                      30  
  
 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys  
   35                                      40                                      45

Trp Trp Glu Leu Arg  
50

<210> 75  
<211> 2201  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu  
1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys  
20 25 30

Arg Gln Ser Gly Val Asn Ala Thr Leu Pro Glu Glu Asn Gln Pro Val  
35 40 45

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys  
50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro  
65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn  
85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly  
100 105 110

Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu  
115 120 125

Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala  
130 135 140

Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe  
145 150 155 160

Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys  
165 170 175

Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly  
180 185 190

Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp  
195 200 205



Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp  
 210 215 220

Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu  
 225 230 235 240

Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys  
 245 250 255

Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp  
 260 265 270

Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys  
 275 280 285

Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly  
 290 295 300

Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe  
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe  
 325 330 335

Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr  
 340 345 350

Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala  
 355 360 365

Gly Val Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg  
 370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly  
 385 390 395 400

Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly  
 405 410 415

Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu  
 420 425 430

Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg  
 435 440 445

Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp  
 450 455 460

Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys  
465 470 475 480

Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys  
485 490 495

Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val  
500 505 510

Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala  
515 520 525

Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn  
530 535 540

Gly Gln Cys Val Cys His Glu Gly Phe Met Gly Lys Asp Cys Lys Glu  
545 550 555 560

Gln Arg Cys Pro Ser Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asp Gly  
565 570 575

Gln Cys Ile Cys His Glu Gly Phe Thr Gly Leu Asp Cys Gly Gln His  
580 585 590

Ser Cys Pro Ser Asp Cys Asn Asn Leu Gly Gln Cys Val Ser Gly Arg  
595 600 605

Cys Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Gly Glu Asp Cys Ser Glu Val Ser  
610 615 620

Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val Asn  
625 630 635 640

Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr  
645 650 655

Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly  
660 665 670

Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr  
675 680 685

Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val  
690 695 700

Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe  
705 710 715 720

Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp  
 725 730 735

Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu  
 740 745 750

Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr  
 755 760 765

Arg Gln Thr Gly Leu Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His  
 770 775 780

Ile Val Lys Asn Asn Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr  
 785 790 795 800

Thr Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp  
 805 810 815

Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly  
 820 825 830

Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr  
 835 840 845

Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys  
 850 855 860

Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met  
 865 870 875 880

Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Leu Asp Ala Pro  
 885 890 895

Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp Asn Ser Ile Thr Leu Glu  
 900 905 910

Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala  
 915 920 925

Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val Asp Val Pro Lys Ser Gln  
 930 935 940

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu  
 945 950 955 960

Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro  
 965 970 975

Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln  
980 985 990

Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro  
995 1000 1005

Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr  
1010 1015 1020

Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr  
1025 1030 1035

Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu  
1040 1045 1050

Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys  
1055 1060 1065

Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr  
1070 1075 1080

Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp  
1085 1090 1095

Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys  
1100 1105 1110

Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala  
1115 1120 1125

Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser  
1130 1135 1140

Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala  
1145 1150 1155

Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val  
1160 1165 1170

Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro  
1175 1180 1185

Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp  
1190 1195 1200

Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg  
1205 1210 1215

Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile  
 1220 1225 1230

Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser  
 1235 1240 1245

Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr  
 1250 1255 1260

Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr  
 1265 1270 1275

Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala  
 1280 1285 1290

Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu  
 1295 1300 1305

Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr  
 1310 1315 1320

Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu  
 1325 1330 1335

Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu  
 1340 1345 1350

Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr  
 1355 1360 1365

Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu  
 1370 1375 1380

Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser  
 1385 1390 1395

Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr  
 1400 1405 1410

Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val  
 1415 1420 1425

Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn  
 1430 1435 1440

Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp  
 1445 1450 1455

Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile  
1460 1465 1470

Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly  
1475 1480 1485

Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp  
1490 1495 1500

Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys  
1505 1510 1515

Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu  
1520 1525 1530

Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser  
1535 1540 1545

Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val  
1550 1555 1560

Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser  
1565 1570 1575

Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile  
1580 1585 1590

Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr  
1595 1600 1605

Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val  
1610 1615 1620

Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu  
1625 1630 1635

Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys  
1640 1645 1650

Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu  
1655 1660 1665

Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Ile Thr Gly Leu Arg Glu Ala  
1670 1675 1680

Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg  
1685 1690 1695

Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro  
 1700 1705 1710

Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val  
 1715 1720 1725

Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr  
 1730 1735 1740

Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp  
 1745 1750 1755

Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val  
 1760 1765 1770

Glu Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser  
 1775 1780 1785

Glu Pro Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu Asp Gly Pro Ser  
 1790 1795 1800

Gly Leu Val Thr Ala Asn Ile Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Arg  
 1805 1810 1815

Trp Gln Pro Ala Ile Ala Thr Val Asp Ser Tyr Val Ile Ser Tyr  
 1820 1825 1830

Thr Gly Glu Lys Val Pro Glu Ile Thr Arg Thr Val Ser Gly Asn  
 1835 1840 1845

Thr Val Glu Tyr Ala Leu Thr Asp Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr  
 1850 1855 1860

Thr Leu Arg Ile Phe Ala Glu Lys Gly Pro Gln Lys Ser Ser Thr  
 1865 1870 1875

Ile Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu Asp Ser Pro Arg Asp Leu  
 1880 1885 1890

Thr Ala Thr Glu Val Gln Ser Glu Thr Ala Leu Leu Thr Trp Arg  
 1895 1900 1905

Pro Pro Arg Ala Ser Val Thr Gly Tyr Leu Leu Val Tyr Glu Ser  
 1910 1915 1920

Val Asp Gly Thr Val Lys Glu Val Ile Val Gly Pro Asp Thr Thr  
 1925 1930 1935

Ser Tyr Ser Leu Ala Asp Leu Ser Pro Ser Thr His Tyr Thr Ala  
 1940 1945 1950

Lys Ile Gln Ala Leu Asn Gly Pro Leu Arg Ser Asn Met Ile Gln  
 1955 1960 1965

Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp  
 1970 1975 1980

Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr  
 1985 1990 1995

Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ala Glu Ala Leu Glu Val Phe  
 2000 2005 2010

Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly Trp Ile Val Phe Leu Arg  
 2015 2020 2025

Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln Asn Trp Lys Ala Tyr  
 2030 2035 2040

Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe Trp Leu Gly Leu  
 2045 2050 2055

Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly Gln Tyr Glu Leu Arg  
 2060 2065 2070

Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe Ala Val Tyr Asp  
 2075 2080 2085

Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val  
 2090 2095 2100

Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn  
 2105 2110 2115

Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile  
 2120 2125 2130

Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn  
 2135 2140 2145

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His  
 2150 2155 2160

Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser  
 2165 2170 2175



Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn  
2180 2185 2190

Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala  
2195 2200

<210> 76  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3 Fibcon

<400> 76

Leu Asp Ala Pro Thr Asp Leu Gln Val Thr Asn Val Thr Asp Thr Ser  
1 5 10 15

Ile Thr Val Ser Trp Thr Pro Pro Ser Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
20 25 30

Ile Thr Tyr Thr Pro Ser Asn Gly Pro Gly Glu Pro Lys Glu Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Thr Ile Thr Gly Leu Thr Pro Gly  
50 55 60

Val Glu Tyr Val Val Ser Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Asn Gln Glu Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Val Gly Thr Gln Thr Thr  
85

<210> 77  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr  
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr  
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr  
85 90

<210> 78  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> линкер

<400> 78

Gly Ser Gly Ser  
1

<210> 79  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> линкер

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25

<210> 80  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> линкер

<400> 80

Ala Pro Ala Pro  
1

<210> 81  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> линкер

<400> 81

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro  
1 5 10

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> линкер

<400> 82

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro  
20

<210> 83

<211> 40

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> линкер

<400> 83

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro  
20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro  
35 40

<210> 84

<211> 29

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> линкер

<400> 84

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys  
1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala  
20 25

<210> 85  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Петля BC tencon

<400> 85

Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
1 5

<210> 86  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> петля FG tencon

<400> 86

Lys Gly Gly His Arg Ser Asn  
1 5

<210> 87  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 87

Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp  
1 5

<210> 88  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 88

Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp  
1 5

<210> 89  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 89

Trp Asp Pro Phe Ser Phe Tyr Asp  
1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 90

Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu  
1 5

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 91

Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp  
1 5

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 92

Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp  
1 5

<210> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 93

Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Asp  
1 5

<210> 94

<211> 8

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 94

Asp Asp Pro Trp Asp Phe Tyr Glu  
1 5

<210> 95  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR FG loop

<400> 95

His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu  
1 5 10

<210> 96  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR FG loop

<400> 96

Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met  
1 5 10

<210> 97  
<211> 285  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR, из ECB97; P54AR4-83V22

<400> 97  
atggtgссag сgссgaаgаа сctggtagtт агсgaggтта ctgaggacag сgсgсgtctg 60  
agctgggacg atccgtgggc gttctacgag агctttctga tccagtatca agagagсgag 120  
aaagtcggtg aagcgattgt gctgaccgtc ссgggctccg агсgттсcta сgacстgacc 180  
ggtttgaagc сgggtaccga gtatacggtg агcatctacg gtgttcacaa tgtctataag 240  
gacactaata tccgсggtct gcctctgagc gccattttca ссacc 285

<210> 98  
<211> 285  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR, из ECB15; P54AR4-83V2

<400> 98  
atgctgcccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgtcccgcctg 60  
agctgggacg acccgtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcga 120  
aaagttggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgcctccta cgatctgacc 180  
ggcctgaaac cgggtacgga gtacacggtg tccatttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240  
gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattttca ccacc 285

<210> 99  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3 tencon27

<400> 99

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

<210> 100  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Библиотека TCL14

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (32)..(32)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (34) .. (34)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (36) .. (36)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (38) .. (38)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (39) .. (39)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (40) .. (40)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (41) .. (41)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (68) .. (68)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> ПРОЧИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ  
<222> (70) .. (70)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> ПРОЧИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ  
<222> (72) .. (72)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> ПРОЧИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ  
<222> (78) .. (78)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> ПРОЧИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ  
<222> (79) .. (79)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> ПРОЧИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ  
<222> (81) .. (81)  
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<400> 100

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15



Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Xaa  
20 25 30

Ile Xaa Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Gly Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser  
65 70 75 80

Xaa Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 101

<211> 1408

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 101

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe  
1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys  
20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala  
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu  
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys  
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe  
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp  
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp  
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His  
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys  
 145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val  
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe  
 180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp  
 195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp  
 210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu  
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn  
 245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln  
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu  
 275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg  
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala  
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser  
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp  
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys  
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg  
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg  
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr  
405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly  
420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly  
435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln  
450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu  
465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu  
485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys  
500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln  
515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys  
530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile  
545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu  
565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg  
580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu  
595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys  
610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile  
625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp  
645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly  
 660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg  
 675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn  
 690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe  
 705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe  
 725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser  
 740 745 750

Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu  
 755 760 765

Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn  
 770 775 780

Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala  
 785 790 795 800

Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile  
 805 810 815

Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro  
 820 825 830

Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr  
 835 840 845

Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys  
 850 855 860

Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly  
 865 870 875 880

Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly  
 885 890 895

Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys  
 900 905 910

Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu  
915 920 925

Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln  
930 935 940

Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser  
945 950 955 960

Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg  
965 970 975

Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg  
980 985 990

Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser  
995 1000 1005

Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala  
1010 1015 1020

Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser  
1025 1030 1035

Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu  
1040 1045 1050

Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr  
1055 1060 1065

Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala  
1070 1075 1080

Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe  
1085 1090 1095

Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly  
1100 1105 1110

Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys  
1115 1120 1125

Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu  
1130 1135 1140

Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu  
1145 1150 1155

Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val  
 1160 1165 1170

Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg  
 1175 1180 1185

Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly  
 1190 1195 1200

Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe  
 1205 1210 1215

Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys  
 1220 1225 1230

Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr  
 1235 1240 1245

Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu  
 1250 1255 1260

Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe  
 1265 1270 1275

Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu  
 1280 1285 1290

Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe  
 1295 1300 1305

Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro  
 1310 1315 1320

Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp  
 1325 1330 1335

His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser  
 1340 1345 1350

Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val  
 1355 1360 1365

His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr  
 1370 1375 1380

Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp  
 1385 1390 1395

Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser  
1400 1405

<210> 102  
<211> 697  
<212> PRT  
<213> HOMO SAPIENS

<400> 102

Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys  
1 5 10 15

Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys  
20 25 30

Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly  
35 40 45

Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln  
50 55 60

Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu  
65 70 75 80

Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn  
85 90 95

Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr  
100 105 110

Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu  
115 120 125

His Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn  
130 135 140

Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr  
145 150 155 160

Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser  
165 170 175

Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met  
180 185 190

Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr  
195 200 205

Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe  
210 215 220

Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys  
225 230 235 240

Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr  
245 250 255

Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr  
260 265 270

Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr  
275 280 285

Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His  
290 295 300

Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu  
305 310 315 320

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr  
325 330 335

Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys  
340 345 350

Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr  
355 360 365

Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp  
370 375 380

Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp  
385 390 395 400

Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala  
405 410 415

His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr  
420 425 430

Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn  
435 440 445

Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val  
450 455 460



Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu  
 465 470 475 480

Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser  
 485 490 495

Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp  
 500 505 510

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu  
 515 520 525

Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu  
 530 535 540

Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp  
 545 550 555 560

Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro  
 565 570 575

Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile  
 580 585 590

Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn  
 595 600 605

Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser  
 610 615 620

Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly  
 625 630 635 640

Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val  
 645 650 655

Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro  
 660 665 670

Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile  
 675 680 685

Ile Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser  
 690 695

<210> 103  
 <211> 276  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain  
  
<400> 103  
ctgccggctc cgaagaactt ggtggtgagc cgtgttaccg aagatagcgc acgcctgagc 60  
tggacggcac cggatgcggc gttc gatagc ttctggattc gctat tttga gtttctgggt 120  
agcggtgagg caattgttct gacggtgccg ggctctgaac gctcctacga tttgaccggt 180  
ctgaaaccgg gcaccgagta tgtggtgaac attctgagcg ttaagggcgg tagcatcagc 240  
ccaccgctga gcgcgatctt cacgactggt ggttgc 276

<210> 104  
<211> 267  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain  
  
<400> 104  
ctgccggcac cgaagaacct ggttgtcagc cgtgtgaccg aggatagcgc acgtttgagc 60  
tggaccgctc cggatgcagc ctttgacagc ttctggattc gttactttga atttctgggt 120  
agcggtgagg cgatcgttct gacggtgccg ggctctgaac gcagctatga tttgacgggc 180  
ctgaagccgg gtactgagta cgtggttaac atcatgggcg ttaaggggtg taaaatcagc 240  
ccgccattgt ccgcgatctt taccacg 267

<210> 105  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> линкер

<400> 105  
  
Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 106  
<211> 194  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 106  
  
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 107  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 107

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 108  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 108

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 109  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 109

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 110  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 110

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 111  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 111

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 112

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 112

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 113

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 113

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 114

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> c-Met binding FN3 domain

<400> 114

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 115  
<211> 591  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и с-Met

<400> 115  
atgttgccag cgccgaaga cctggtagtt agcgaggtta ctgaggacag cgcgcgtctg 60  
agctgggacg atccgtgggc gttctacgag agctttctga tccagtatca agagagcgag 120  
aaagtccgtg aagcgattgt gctgaccgtc ccgggctccg agcgttccta cgacctgacc 180  
ggtttgaagc cgggtaccga gtatacggtg agcatctacg gtgttcacaa tgtctataag 240  
gacactaata tccgcggtct gcctctgagc gccattttca ccaccgcacc ggcaccggct 300  
ccggctcctg ccccgctgcc ggctccgaag aacttgggtg tgagccgtgt taccgaagat 360  
agcgcacgcc tgagctggac ggcaccggat gcggcgttcg atagcttctg gattcgctat 420  
tttgagtttc tgggtagcgg tgaggcaatt gttctgacgg tgccgggctc tgaacgctcc 480  
tacgatttga ccggtctgaa accgggcacc gagtatgtgg tgaacattct gagcgttaag 540  
ggcggtagca tcagcccacc gctgagcgcg atcttcacga ctggtggttg c 591

<210> 116  
<211> 582  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и с-Met

<400> 116  
atgctgssag cscstaaga tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcscgctg 60  
agctgggacg acccggtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120  
aaagttagcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgttccta cgatctgacc 180  
ggcctgaaac cgggtacgga gtacacggtg tccatttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240  
gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattttca ccaccgcgcc tgcgccagcg 300  
cctgcaccgg ctccgctgcc ggcaccgaag aacctggttg tcagccgtgt gaccgaggat 360  
agcgcacggt tgagctggac cgctccggat gcagcctttg acagcttctg gattcgttac 420  
tttgaatttc tgggtagcgg tgaggcgatc gttctgacgg tgccgggctc tgaacgcagc 480  
tatgatttga cgggcctgaa gccgggtact gagtacgtgg ttaacatcat gggcgttaag 540  
ggtggtaaaa tcagcccgcc attgtccgcg atctttacca cg 582

<210> 117  
<211> 51  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность



<220>

<223> Альбумин-связывающий домен

<400> 117

Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu  
1 5 10 15

Glu Leu Lys Lys Ala Gly Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile  
20 25 30

Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile  
35 40 45

Leu Lys Ala  
50

<210> 118

<211> 250

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 118

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val  
130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 119  
<211> 250  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 119

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val  
130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 120

<211> 250

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 120

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 121  
<211> 250  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met  
<400> 121

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 122

<211> 95

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 122

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 123  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 123

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 124  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 124

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 125  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 125

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 126  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 126

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 127  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 127

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60



Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 128  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 128

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Phe Asp Ser  
20 25 30

Phe Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn  
35 40 45

Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys  
50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr  
65 70 75 80

Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 129  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 129

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 130  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 130

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val  
65 70 75 80

Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 131  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 131

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 132  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 132

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val  
65 70 75 80

Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 133  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 133

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 134  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 134

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 135  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 135

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 136

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 136

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 137

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 137

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 138

<211> 204

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и с-Met

<400> 138

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr  
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala Ile  
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu  
 165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly  
 180 185 190

Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
 195 200

<210> 139  
 <211> 203  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 139

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
 50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 100 105 110

Gly Ser Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu  
115 120 125

Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser  
130 135 140

Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val  
145 150 155 160

Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys  
165 170 175

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys  
180 185 190

Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200

<210> 140  
<211> 204  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 140

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
100 105 110



Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr  
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile  
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu  
 165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly  
 180 185 190

His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
 195 200

<210> 141  
 <211> 204  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 141

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
 50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr  
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
130 135 140

Ser Phe Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala Ile  
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu  
165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly  
180 185 190

Leu Val Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200

<210> 142  
<211> 204  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 142

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr  
115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile  
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu  
 165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly  
 180 185 190

Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
 195 200

<210> 143  
 <211> 204  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 143

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
 50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr  
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile  
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu  
165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly  
180 185 190

His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
195 200

<210> 144

<211> 204

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 144

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr  
115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp  
130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile  
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu  
 165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly  
 180 185 190

His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
 195 200

<210> 145  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 145

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
 50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 146  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 146

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val  
130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 147

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и с-Met

<400> 147

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 148  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и с-Met

<400> 148

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val  
130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu  
165 170 175



Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 149

<211> 193

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 149

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 150  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 150

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 151  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met  
<400> 151

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser  
130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 152  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 152

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 153  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 153

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 154  
<211> 193

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 154

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 155  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 155

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser  
130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 156

<211> 193

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 156

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 157

<211> 193

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met



<400> 157

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 158

<211> 193

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 158

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 159  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met  
<400> 159

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser  
130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 160

<211> 193

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 160

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 161

<211> 193

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 161

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr

<210> 162

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 162

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45  
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80  
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
 85 90 95  
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
 100 105 110  
 Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
 115 120 125  
 Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val  
 130 135 140  
 Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu  
 165 170 175  
 Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
 180 185 190  
 Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
 195 200 205  
 Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
 245

<210> 163

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 163

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val  
130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 164  
<211> 249  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 164

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205



Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
 210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
 225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
 245

<210> 165  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и с-Met

<400> 165

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu  
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
 50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
 165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 166  
<211> 588  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 166  
ttgccagcgc cgaagaacct ggtagtttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60  
tgggacgatc cgtgggcggt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120  
gtcgggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt 180  
ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac 240  
actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgc attttcacca ccgcaccggc accggctccg 300  
gctcctgccc cgctgccggc tccgaagaac ttggtggtga gccgtgttac cgaagatagc 360  
gcacgcctga gctggacggc accggatgcg gcgttcgata gcttctggat tcgctatttt 420  
gagtttctgg gtagcgggtga ggcaattggt ctgacggtgc cgggctctga acgctoctac 480  
gatttgaccg gtctgaaacc gggcaccgag tatgtggtga acattctgag cgttaagggc 540  
ggtagcatca gccaccgct gagcgcgatc ttcacgactg gtggttgc 588

<210> 167  
<211> 579  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен, связывающийся с EGFR и c-Met

<400> 167  
ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60  
tgggacgacc cgtgggcggt ctatgagtct ttctgatcc agtatcaaga aagcgaaaaa 120

gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgcgc gtcctacga tctgaccggc 180  
ctgaaaccgg gtacggagta cacgggtgtcc atttacgggtg ttcacaatgt gtataaagac 240  
accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca ccgcgcctgc gccagcgcct 300  
gcaccggctc cgctgccggc accgaagaac ctgggtgtca gccgtgtgac cgaggatagc 360  
gcacgtttga gctggaccgc tccggatgca gcctttgaca gcttctggat tcgttacttt 420  
gaatttctgg gtagcgggtga ggcgatcgtt ctgacgggtgc cgggctctga acgcagctat 480  
gatttgacgg gcctgaagcc gggactgag tacgtgggta acatcatggg cgttaagggt 540  
ggtaaaatca gcccgccatt gtccgcgatc tttaccacg 579

<210> 168  
<211> 282  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR, из ЕСВ97

<400> 168  
ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60  
tgggacgatc cgtgggcggt ctaccgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120  
gtcgggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggc 180  
ttgaagccgg gtaccgagta tacgggtgagc atctacgggtg ttcacaatgt ctataaggac 240  
actaatatcc gcggctctgcc tctgagcgcс attttcacca сс 282

<210> 169  
<211> 282  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR, из ЕСВ15

<400> 169  
ctgccagccc стаагаатсг ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60  
tgggacgacc cgtgggcggt ctatgagtct ttctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120  
gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgcgc gtcctacga tctgaccggc 180  
ctgaaaccgg gtacggagta cacgggtgtcc atttacgggtg ttcacaatgt gtataaagac 240  
accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca сс 282

<210> 170  
<211> 195  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 170

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 171

<211> 195

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 171

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 172

<211> 195

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и с-Met

<400> 172

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 173  
<211> 195  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met  
<400> 173

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 174

<211> 195

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 174

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 175  
<211> 195  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 175

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30



Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 176

<211> 195

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и с-Met

<400> 176

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val  
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 177  
<211> 195  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 177

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 178  
<211> 195  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифическая молекула, связывающаяся с EGFR и c-Met

<400> 178

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Cys  
195

<210> 179  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусная петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa может представлять собой Met или Ile

<400> 179

His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Xaa Arg Gly Leu  
1 5 10

<210> 180  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Петля GF домена FN3, связывающегося с EGFR

<400> 180

Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met Leu  
1 5 10

<210> 181  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусная петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (1)..(1)  
<223> Хаа может представлять собой Ala, Thr, Gly или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (2)..(2)  
<223> Хаа может представлять собой Ala, Asp, Tyr или Trp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (3)..(3)  
<223> Хаа может представлять собой Pro, Asp или Asn

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (4)..(4)  
<223> Хаа может представлять собой Leu или отсутствовать

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (5)..(5)  
<223> Хаа может представлять собой Asp, His, Arg, Gly, Tyr или Trp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (6)..(6)  
<223> Хаа может представлять собой Glu, Asp или Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (7)..(7)  
<223> Хаа может представлять собой Ala, Phe, Gly, His или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (8)..(8)  
<223> Хаа может представлять собой Tyr, Phe или Leu

<400> 181

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 182  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусная последовательность домена FN3, связывающегося с EGFR

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (22)..(22)  
<223> Xaa может представлять собой Ala, Thr, Gly или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (23)..(23)  
<223> Xaa может представлять собой Ala, Asp, Tyr или Trp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (24)..(24)  
<223> Xaa может представлять собой Pro, Asp или Asn

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (25)..(25)  
<223> Xaa может представлять собой Leu или отсутствовать

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (26)..(26)  
<223> Xaa может представлять собой Asp, His, Arg, Gly, Tyr или Trp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (27)..(27)  
<223> Xaa может представлять собой Gly, Asp или Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (28)..(28)  
<223> Xaa может представлять собой Ala, Phe, Gly, His или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (29)..(29)  
<223> Xaa может представлять собой Tyr, Phe или Leu

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (84)..(84)  
<223> Xaa может представлять собой Met или Ile

<400> 182

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Xaa Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 183

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность домена FN3, связывающегося с EGFR

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (22)..(22)

<223> Xaa может представлять собой Ala, Thr, Gly или Asp

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (23)..(23)

<223> Xaa может представлять собой Ala, Asp, Tyr или Trp

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (24)..(24)

<223> Xaa может представлять собой Pro, Asp или Asn

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (25)..(25)

<223> Xaa может представлять собой Leu или отсутствовать

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (26)..(26)

<223> Xaa может представлять собой Asp, His, Arg, Gly, Tyr или Trp

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (27)..(27)

<223> Xaa может представлять собой Gly, Asp или Ala

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (28)..(28)

<223> Xaa может представлять собой Ala, Phe, Gly, His или Asp

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (29)..(29)

<223> Xaa может представлять собой Tyr, Phe или Leu

<400> 183

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val  
65 70 75 80

Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 184

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность домена FN3, связывающегося с с-Met, тяжа С и петли CD

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (4)..(4)

<223> Xaa представляет собой Trp, Phe или Val

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (8)..(8)

<223> Xaa представляет собой Asp, Phe или Leu

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (10)..(10)

<223> Xaa представляет собой Val, Phe или Leu

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (11)..(11)

<223> Xaa представляет собой Val, Leu или Thr

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (12)..(12)

<223> Xaa представляет собой Val, Arg, Gly, Leu, Thr или Ser

<220>



<221> ВАРИАНТ  
<222> (13)..(13)  
<223> Xaa представляет собой Gly, Ser, Ala, Thr или Lys

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (15)..(15)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Asp

<400> 184

Asp Ser Phe Xaa Ile Arg Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
1 5 10 15

<210> 185  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусная последовательность домена FN3, связывающегося с с-Met, тѣжа F и петли FG

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa представляет собой Tyr, Trp, Ile, Val, Gly или Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa представляет собой Asn, Thr, Qln или Gly

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa представляет собой Leu, Met, Asn или Ile

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa представляет собой Gly или Ser

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (14)..(14)  
<223> Xaa представляет собой Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His или Lys

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (15)..(15)  
<223> Xaa представляет собой Ile, Val или Leu

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (17)..(17)  
<223> Xaa представляет собой Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr или Leu

<400> 185

Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser  
1 5 10 15

Хаа

<210> 186  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусная последовательность домена FN3, связывающегося с с-Met

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (32)..(32)  
<223> Хаа представляет собой Trp, Phe или Val

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (36)..(36)  
<223> Хаа представляет собой Asp, Phe или Leu

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (38)..(38)  
<223> Хаа представляет собой Val, Phe или Leu

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (39)..(39)  
<223> Хаа представляет собой Val, Leu или Thr

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (40)..(40)  
<223> Хаа представляет собой Val, Arg, Gly, Leu, Thr или Ser

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (41)..(41)  
<223> Хаа представляет собой Gly, Ser, Ala, Thr или Lys

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (43)..(43)  
<223> Хаа представляет собой Glu или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (68)..(68)  
<223> Хаа представляет собой Tyr, Trp, Ile, Val, Gly или Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (70)..(70)  
<223> Хаа представляет собой Asn, Thr, Qln или Gly

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (72)..(72)  
<223> Хаа представляет собой Leu, Met, Asn или Ile

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (73)..(73)  
<223> Xaa представляет собой Gly или Ser

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (78)..(78)  
<223> Xaa представляет собой Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His или Lys

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (79)..(79)  
<223> Xaa представляет собой Ile, Val или Leu

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (81)..(81)  
<223> Xaa представляет собой Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr или Leu

<400> 186

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Xaa  
20 25 30

Ile Arg Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser  
65 70 75 80

Xaa Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr  
85

<210> 187  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусный домен FN3, связывающийся с EGFR, биспецифической к EGFR/c-Met молекулы

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (11)..(11)  
<223> Xaa представляет собой Glu, Asn или Arg

<220>  
<221> ВАРИАНТ

<222> (14)..(14)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Pro

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (17)..(17)  
<223> Xaa представляет собой Leu или Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (25)..(25)  
<223> Xaa представляет собой His или Trp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (29)..(29)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (37)..(37)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Pro

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (46)..(46)  
<223> Xaa представляет собой Asn или Val

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (73)..(73)  
<223> Xaa представляет собой Gly или Tyr

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (83)..(83)  
<223> Xaa is Met или Ile

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (91)..(91)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Ile

<400> 187

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Xaa Val Thr Xaa Asp Ser  
1 5 10 15

Xaa Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Xaa Ala Phe Tyr Xaa Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Xaa Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Xaa Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Xaa Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Xaa Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Xaa Phe Thr Thr  
85 90

<210> 188  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> c-Met consensus FN3 domain of bispecific EGFR/c-Met molecule

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (11)..(11)  
<223> Xaa представляет собой Glu, Asn или Arg

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (14)..(14)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Pro

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (17)..(17)  
<223> Xaa представляет собой Leu или Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (37)..(37)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Pro

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (39)..(39)  
<223> Xaa представляет собой Val или Leu

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (40)..(40)  
<223> Xaa представляет собой Gly или Ser

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (41)..(41)  
<223> Xaa представляет собой Ser или Lys

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (43)..(43)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (46)..(46)  
<223> Xaa представляет собой Asn или Val

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (72)..(72)  
<223> Xaa представляет собой Leu или Met

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (73)..(73)  
<223> Xaa представляет собой Gly или Ser

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (78)..(78)  
<223> Xaa представляет собой Ser или Lys

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (86)..(86)  
<223> Xaa представляет собой Glu или Ile

<400> 188

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Xaa Val Thr Xaa Asp Ser  
1 5 10 15

Xaa Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp  
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Ile Xaa Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Xaa Phe Thr Thr  
85

<210> 189  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 189

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Cys Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50

55

60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 190  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 190

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Cys Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 191  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 191

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Cys Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu

35

40

45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 192  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 192

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Cys Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 193  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 193

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Cys  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe



20

25

30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 194  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 194

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Cys Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 195  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 195

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

1                    5                    10                    15

Ser Ala Arg Leu Cys Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
                  20                                    25                                    30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
          35                                    40                                    45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
      50                                    55                                    60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65                                    70                                    75                                    80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
                  85                                    90                                    95

<210> 196  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 196

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1                    5                                    10                                    15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Cys Phe  
                  20                                    25                                    30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
          35                                    40                                    45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
      50                                    55                                    60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65                                    70                                    75                                    80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
                  85                                    90                                    95

<210> 197  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 197

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Cys Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 198

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 198

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Cys Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 199

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 199

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Cys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 200

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 200

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Cys Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 201  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 201

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Cys Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 202  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 202

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Cys  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 203  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 203

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Cys Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 204  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 204

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Cys Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 205  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 205

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Cys Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 206  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 206

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Cys Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 207  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 207

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Cys Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 208  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 208

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30



Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 209  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 209

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Cys Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 210  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 210

Met Leu Pro Ala Pro Lys Cys Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 211

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 211

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Cys Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 212

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 212

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Cys Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 213  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 213

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Cys Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 214  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 214

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Cys Ile Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 215

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 215

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Cys Phe Thr Thr  
85 90 95

<210> 216

<211> 95  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 216

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Cys Thr  
85 90 95

<210> 217  
<211> 104  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 217

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly

85

90

95

Gly His His His His His His Cys  
100

<210> 218

<211> 250

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 218

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 219

<211> 250

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 219

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser





Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 221  
<211> 250  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 221

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys



Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 223

<211> 250

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 223

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

<210> 224  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met  
  
 <400> 224

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
 20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro  
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
 65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
 165 170 175

Met Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
 180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
 195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245 250

<210> 225

<211> 250

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 225

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
85 90 95

Pro Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile

165

170

175

Met Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
 180 185 190

Thr Thr Ala Pro Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala  
 195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr  
 210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala  
 225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
 245 250

<210> 226

<211> 264

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 226

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp  
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe  
 20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu  
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro  
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys  
 65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala  
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu  
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala  
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu  
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile  
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ile Asp Glu  
195 200 205

Trp Leu Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys  
210 215 220

Ala Gly Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys  
225 230 235 240

Thr Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala Gly  
245 250 255

Gly His His His His His His Cys  
260

<210> 227

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 227

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Cys Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp



65

70

75

80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 228  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 228

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Cys Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 229  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 229

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Cys Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50

55

60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 230  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 230

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Cys Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 231  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 231

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Cys Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35

40

45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 232  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 232

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Cys  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 233  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 233

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Cys Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20

25

30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 234  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 234

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Cys Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 235  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 235

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

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

<210> 236  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 236

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

<210> 237  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 237

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Cys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 238

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 238

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Cys Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 239

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 239

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Cys Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 240

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 240

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Cys Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 241  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 241

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Cys  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 242  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 242

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Cys Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80



Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 243  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 243

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Cys Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 244  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 244

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Cys Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 245  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 245

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Cys Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 246  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 246

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 247  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 247

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Cys  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 248  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 248

Leu Pro Ala Pro Lys Cys Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 249  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 249

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Cys Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 250  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 250

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Cys Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 251

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 251

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Cys Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 252

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 252

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Cys Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 253  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 253

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Cys Phe Thr Thr  
85 90

<210> 254  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 254

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Cys Thr  
85 90

<210> 255

<211> 103

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EGFR-binding FN3 domain

<400> 255

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly  
85 90 95

His His His His His His Cys

<210> 256  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met  
  
 <400> 256  
  
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15  
  
 Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
 20 25 30  
  
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45  
  
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
 50 55 60  
  
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80  
  
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
 85 90 95  
  
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
 100 105 110  
  
 Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
 115 120 125  
  
 Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
 130 135 140  
  
 Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
 145 150 155 160  
  
 Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
 165 170 175  
  
 Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
 180 185 190  
  
 Thr Ala Pro Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
 195 200 205



Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 257

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 257

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met

165

170

175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr Ala Pro Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 258

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 258

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 259

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 259

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85

90

95

Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
 165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
 180 185 190

Thr Ala Pro Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
 195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
 210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
 225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
 245

<210> 260

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 260

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr Ala Pro Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 261  
<211> 249  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 261

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1                    5                    10                    15  
 Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
                   20                    25                    30  
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
                   35                    40                    45  
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly  
                   50                    55                    60  
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
                   65                    70                    75                    80  
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
                   85                    90                    95  
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
                   100                    105                    110  
 Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
                   115                    120                    125  
 Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
                   130                    135                    140  
 Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
                   145                    150                    155                    160  
 Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
                   165                    170                    175  
 Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
                   180                    185                    190  
 Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
                   195                    200                    205  
 Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
                   210                    215                    220  
 Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
                   225                    230                    235                    240  
 Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
                   245

<211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met  
  
 <400> 262

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Cys Pro Gly  
 50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
 165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
 180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
 195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
 210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 263

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 263

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr



180

185

190

Thr Ala Pro Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
245

<210> 264

<211> 263

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифический домен FN3, связывающийся с анти-EGFR и с-Met

<400> 264

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val  
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro  
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly  
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met  
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr  
180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ile Asp Glu Trp  
195 200 205

Leu Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys Ala  
210 215 220

Gly Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr  
225 230 235 240

Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile Leu Lys Ala Gly Gly  
245 250 255

His His His His His His Cys  
260

<210> 265  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Каркас Tencon FN3

<400> 265

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu  
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr  
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser  
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr Gly Gly His His His His His

His Cys

3

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий, по меньшей мере, одну цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 и 93 домена FN3, причем домен FN3 основан на SEQ ID NO: 1.

2. Домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п. 1, в котором цистеиновая замена представляет собой замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 и 93 с SEQ ID NO: 111–114 или 122–137.

3. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 с, по меньшей мере, одной цистеиновой заменой из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, причем упомянутый выделенный домен FN3 с внедренными остатками цистеина специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR.

4. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 с, по меньшей мере, одной цистеиновой заменой из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, причем упомянутый выделенный домен FN3 с внедренными остатками цистеина специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met.

5. Домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п. 1, дополнительно содержащий фрагмент, увеличивающий период полужизни.

6. Домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п. 6, в котором фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой альбумин-связывающую

молекулу, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или, по меньшей мере, участок Fc-области иммуноглобулина.

7. Способ получения домена FN3 с внедренными остатками цистеина, включающий в себя:

(i) мутагенез нуклеотидной последовательности исходного домена FN3 путем замены одного или более нуклеотидных остатков на нуклеотидные остатки, кодирующие остаток аминокислоты цистеина, для кодирования домена FN3 с внедренными остатками цистеина;

(ii) экспрессию домена FN3 с внедренными остатками цистеина; и

(iii) извлечение домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

8. Способ по п. 7, в котором домен FN3 основан на SEQ ID NO: 1 и этап мутагенеза включает в себя выполнение сайт-направленного мутагенеза.

9. Способ по п. 8, включающий в себя экспрессию домена FN3 с внедренными остатками цистеина в *E.coli*.

10. Способ по п. 8, дополнительно включающий в себя после этапа извлечения реагирование домена FN3 с внедренными остатками цистеина с химическим реагентом, реагирующим с тиольной группой, с созданием химически конъюгированного домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

11. Способ по п. 10, дополнительно включающий в себя после этапа реагирования измерение связывания EGFR с химически конъюгированным доменом FN3 с внедренными остатками цистеина.

12. Способ по п. 11, дополнительно включающий в себя после этапа реагирования измерение ингибирования роста клеток опухолевой линии со сверхэкспрессией EGFR после добавления химически конъюгированного домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

13. Способ по п. 11, дополнительно включающий в себя после этапа реагирования измерение связывания с-Met с химически конъюгированным доменом FN3 с внедренными остатками цистеина.

14. Способ по п. 11, дополнительно включающий в себя после этапа реагирования измерение ингибирования роста клеток

опухоловой линии со сверхэкспрессией c-Met после добавления химически конъюгированного домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

15. Способ по п. 11, в котором реагент, реагирующий с тиольными группами, содержит малеимидный фрагмент.

16. Способ по п. 15, в котором реагент, реагирующий с тиольными группами, содержит малеимидный фрагмент, который выбирают из группы, состоящей из NEM, MMAE и MMAF.

17. Способ по п. 16, в котором химически конъюгированный домен FN3 с внедренными остатками цистеина имеет значение IC50 для роста клеток от около  $1,7 \times 10^{-10}$  М до около  $1,3 \times 10^{-9}$  М при измерении в клетках H1573 со сверхэкспрессией EGFR.

18. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189–216 и 227–254.

19. Выделенная биспецифическая молекула FN3 с внедренными остатками цистеина, содержащая первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 содержит цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 и 93 первого домена FN3, специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met.

20. Выделенная биспецифическая молекула FN3 с внедренными остатками цистеина по п. 20, в которой второй домен FN3 содержит цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 и 93 второго домена FN3.

21. Выделенная биспецифическая молекула FN3 с внедренными

остатками цистеина по п. 20, содержащая аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 219–226 и 257–264.

22. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п. 20, причем молекула химически конъюгирована с реагентом, реагирующим с тиольными группами.

23. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п. 22, причем реагент, реагирующий с тиольными группами, представляет собой малеимидный фрагмент.

24. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п. 23, в которой малеимидный фрагмент выбирают из группы, состоящей из NEM, ПЭГ24-малеимида, флуоресцеин-малеимида, MMAE и MMAF.

25. Биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п. 24, в которой первый домен FN3 ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC<sub>50</sub> от около  $0,9 \times 10^{-9}$  М до около  $2,3 \times 10^{-9}$  М при измерении в клетках NCI-H292 с применением 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> от около  $4 \times 10^{-10}$  М до около  $1,3 \times 10^{-9}$  М при измерении в клетках NCI-H292 с применением 100 нг/мл человеческого HGF.

26. Биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п. 25, имеющая значение IC<sub>50</sub> для роста клеток, которое выбирают из группы, состоящей из:

(i) от около  $5,0 \times 10^{-11}$  М до около  $5,8 \times 10^{-10}$  М при измерении в клетках H1573 со сверхэкспрессией EGFR; и

(ii) от около  $7,8 \times 10^{-12}$  М до около  $1,1 \times 10^{-9}$  М при измерении в клетках A731 со сверхэкспрессией EGFR.

27. Биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п. 26, дополнительно содержащая фрагмент, увеличивающий период полужизни.

28. Биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п. 27, в которой фрагмент, увеличивающий период

полужизни, представляет собой альбумин-связывающую молекулу, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или, по меньшей мере, участок Fc-области иммуноглобулина.

29. Способ получения выделенной биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина, включающий в себя:

(i) мутагенез нуклеотидной последовательности исходной биспецифической молекулы путем замены одного или более нуклеотидных остатков на нуклеотидные остатки, кодирующие остаток цистеина, для кодирования биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина;

(ii) экспрессию биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина; и

(iii) извлечение биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

30. Способ по п. 29, в котором этап мутагенеза включает в себя выполнение сайт-направленного мутагенеза.

31. Способ по п. 30, включающий в себя экспрессию биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина в *E.coli*.

32. Способ по п. 30, дополнительно включающий в себя после этапа извлечения реагирование биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина с химическим реагентом, реагирующим с тиольными группами, с созданием химически конъюгированной биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

33. Способ по п. 32, дополнительно включающий в себя этап, который выбирают из группы, состоящей из:

(i) измерения связывания с EGFR химически конъюгированной биспецифической молекулой с внедренными остатками цистеина;

(ii) измерения ингибирования стимулированного EGF фосфорилирования EGFR в клеточной линии химически конъюгированной биспецифической молекулой с внедренными остатками цистеина;

(iii) измерения ингибирования стимулированного HGF фосфорилирования c-Met в клеточной линии химически конъюгированной биспецифической молекулой с внедренными



остатками цистеина; и

(iv) измерения ингибирования роста клеток опухолевой линии со сверхэкспрессией EGFR после добавления химически конъюгированной биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

34. Любое описанное в настоящем документе изобретение.

По доверенности

# ФИГ. 1А

SEQ ID NO:

```

18 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
19 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYD-RDGYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
20 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSDFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
21 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-RGFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
22 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
23 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSDFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
24 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGDHFDSDFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
25 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
27 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
29 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
107 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
108 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
109 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-HAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
110 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
***** * :*****

```

```

18 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT (94)
19 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
20 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
21 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
22 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
23 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
24 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
25 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
27 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAIFTT
29 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
107 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAIFTT
108 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGIPLSAIFTT
109 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGIPLSAIFTT
110 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGIPLSAIFTT
***** . * : ***** ***

```

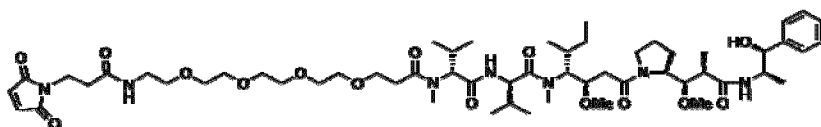
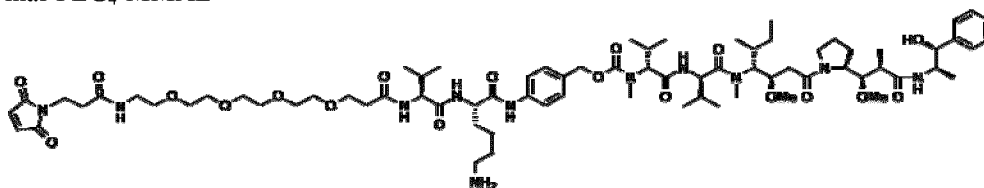
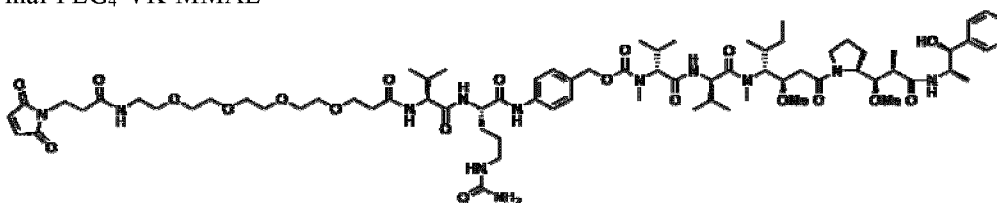
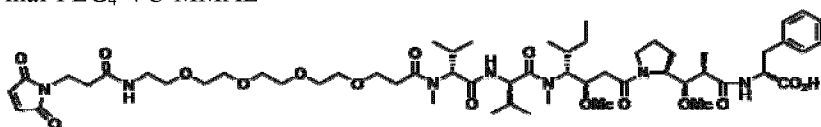
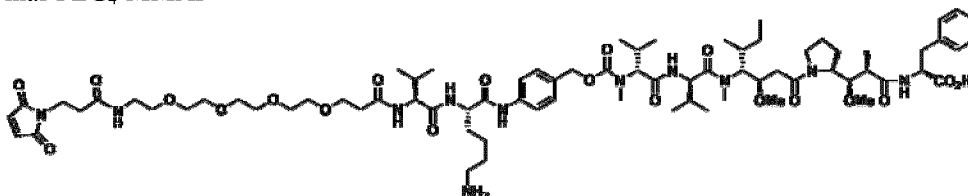
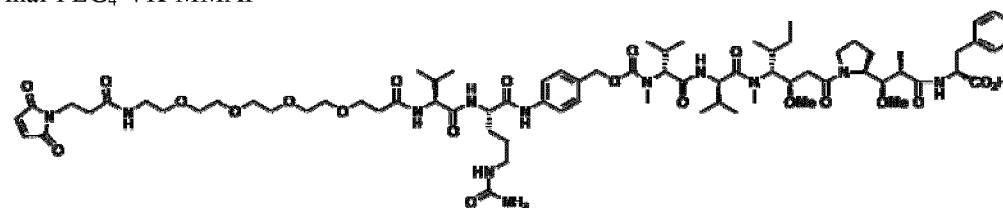
# ФИГ. 1В

SEQ ID  
NO:

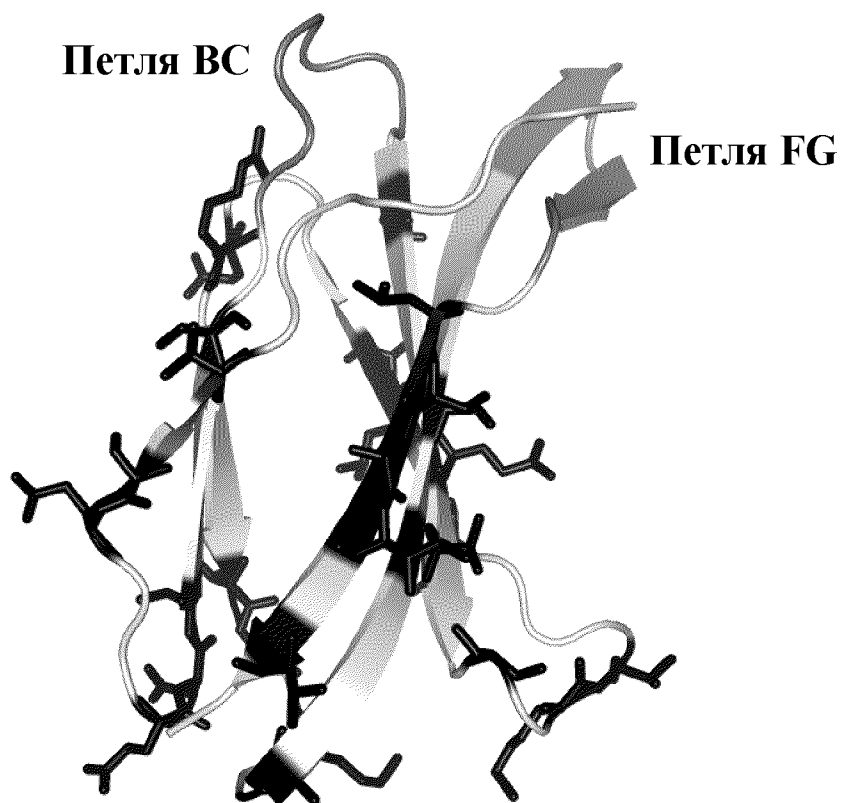
```
26      LPAPKNLVSEVTEDSLRLS WTAP-DAAFDSFLIQQESEKVGAINLTVPGSERSYDLTG      (60)
28      LPAPKNLVSEVTEDSARLS WTAP-DAAFDSFLIQQESEKVGAIVLTVPGSERSYDLTG
***** ************

26      LKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHDVMLPLSAEFTT      (94)
28      LKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
***** **********
```

## ФИГ. 2

mal-PEG<sub>4</sub>-MMAEmal-PEG<sub>4</sub>-VK-MMAEmal-PEG<sub>4</sub>-VC-MMAEmal-PEG<sub>4</sub>-MMAFmal-PEG<sub>4</sub>-VK-MMAFmal-PEG<sub>4</sub>-VC-MMAF

ФИГ. 3



## ФИГ. 4

		A	AB	B	BC	
TENCON27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (30)
TCL14	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (30)
		C	CD	D	DE	E
TENCON27	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVP	GSER	SYDLTG (60)
TCL14	(31)	<u>FXIXYXEXXX</u>	GE	AIVLTVP	GSER	SYDLTG (60)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTVSIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT	(89)
TCL14	(61)	LKPGTEYX	<u>VXIX</u>	<u>GVKGGXXS</u>	<u>XPLSAIFTT</u>	(89)

# ФИГ. 5А

SEQ ID

NO:

32	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG	(60)
33	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFFIRYDEFLLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
34	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
35	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
36	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
37	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
38	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
39	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTD	
40	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
41	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
42	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
43	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
44	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
45	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
46	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
47	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
48	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
49	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
111	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
112	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
113	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTG	
114	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	

\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*

## ФИГ. 5В

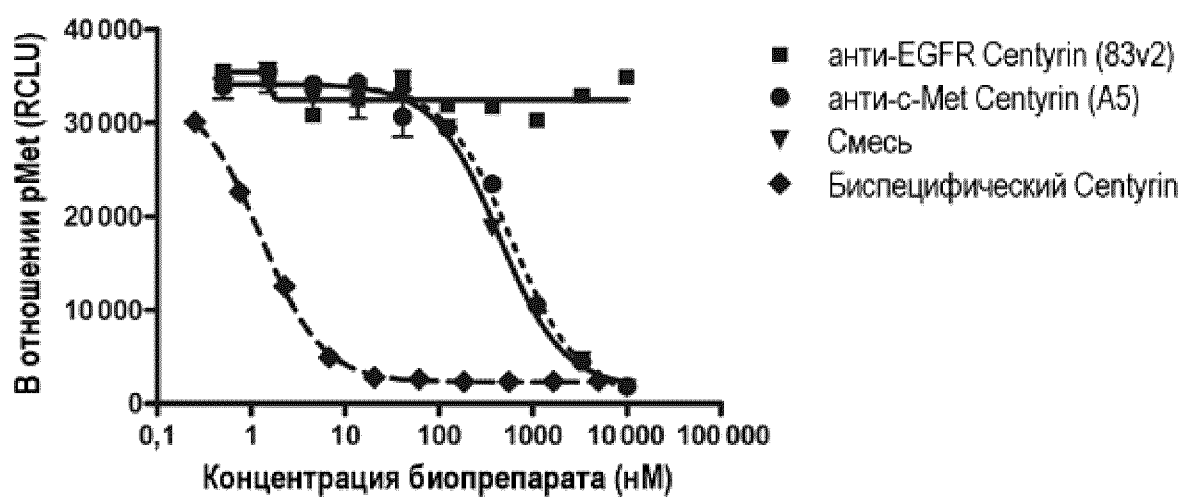
SEQ ID  
NO:

32	LKPGTEYYVNILGVKGGISISVPLSAIFTT
33	LKPGTEYWVTILGVKGLVSTPLSAIFTT
34	LKPGTEYIVNIMGVKGGSISHPLSAIFTT
35	LKPGTEYVVNILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36	LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37	LKPGTEYVVQIMGVKGTVSPPLSAIFTT
38	LKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39	LKPGTEYGVTINGVKGRVSTPLSAIFTT
40	LKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41	LKPGTEYVVNIMGVKGKISPPLSAIFTT
42	LKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
43	LKPGTEYVVQILGVKGGISISVPLSAIFTT
44	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISYPLSAIFTT
45	LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46	LKPGTEYVVQIMGVKGTVSPPLSAIFTT
47	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
48	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
49	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
111	LKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
112	LKPGTEYVVNILGVKGGISPPLSAIFTT
113	LKPGTEYVVNILGVKGGISPPLSAIFTT
114	LKPGTEYVVNILSVKGGISPPLSAIFTT
	***** * * .***** :* *****

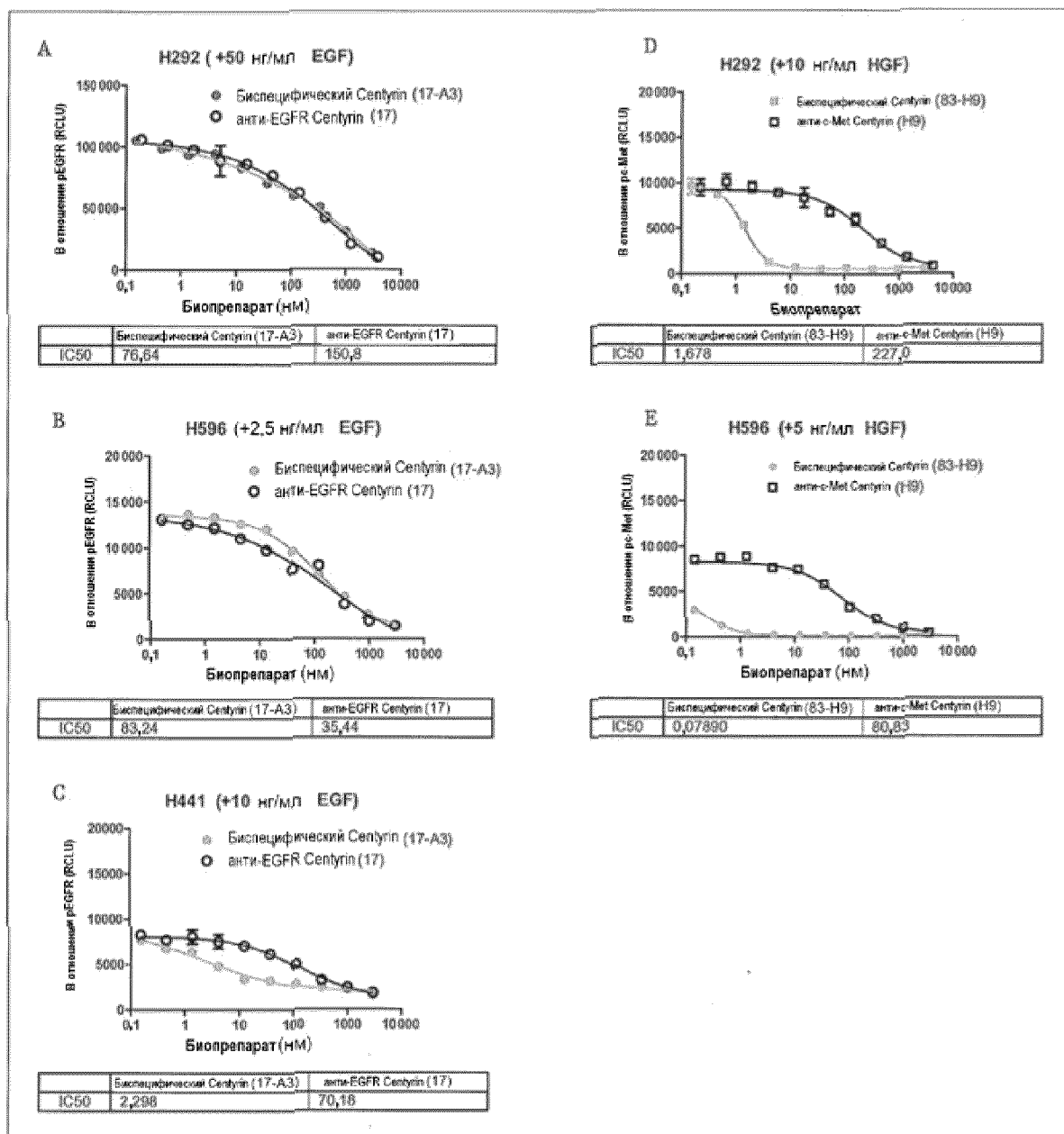
(89)



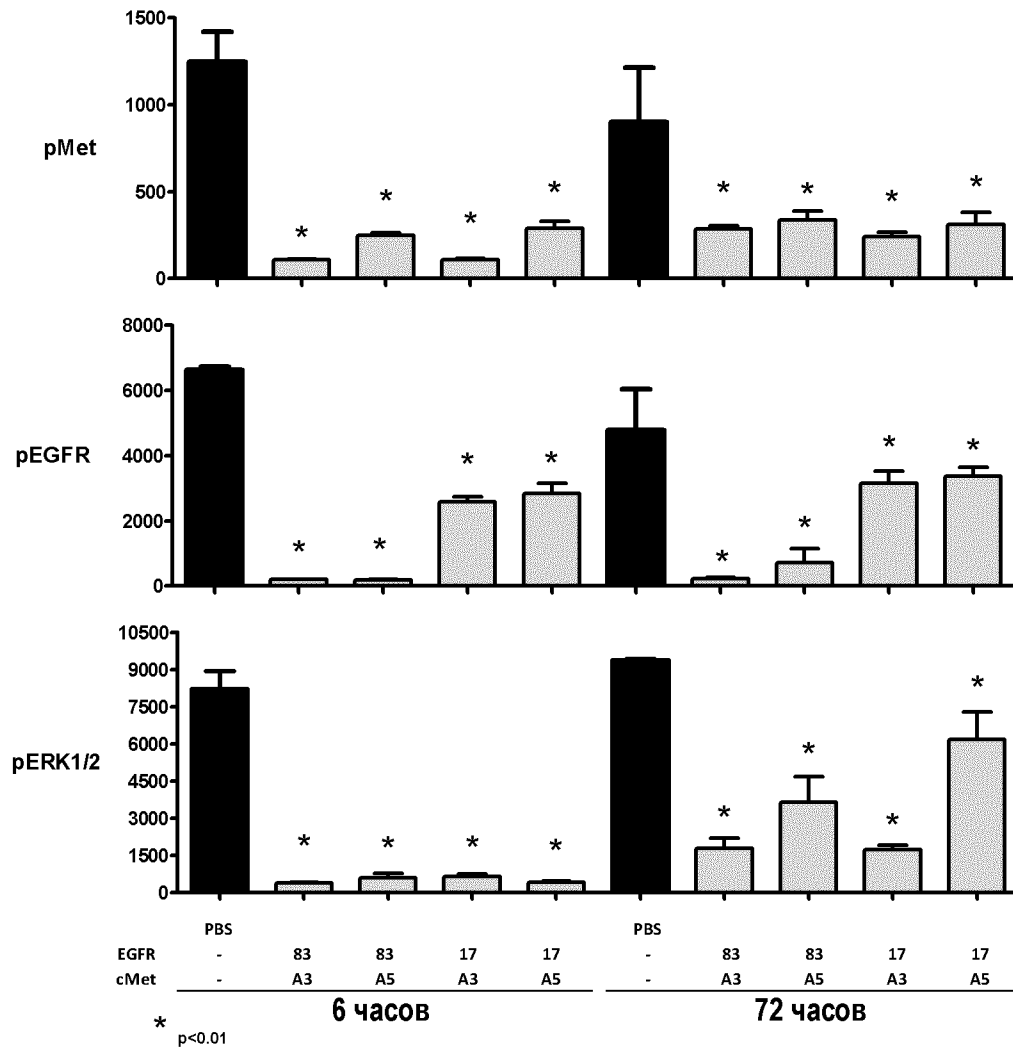
ФИГ. 6



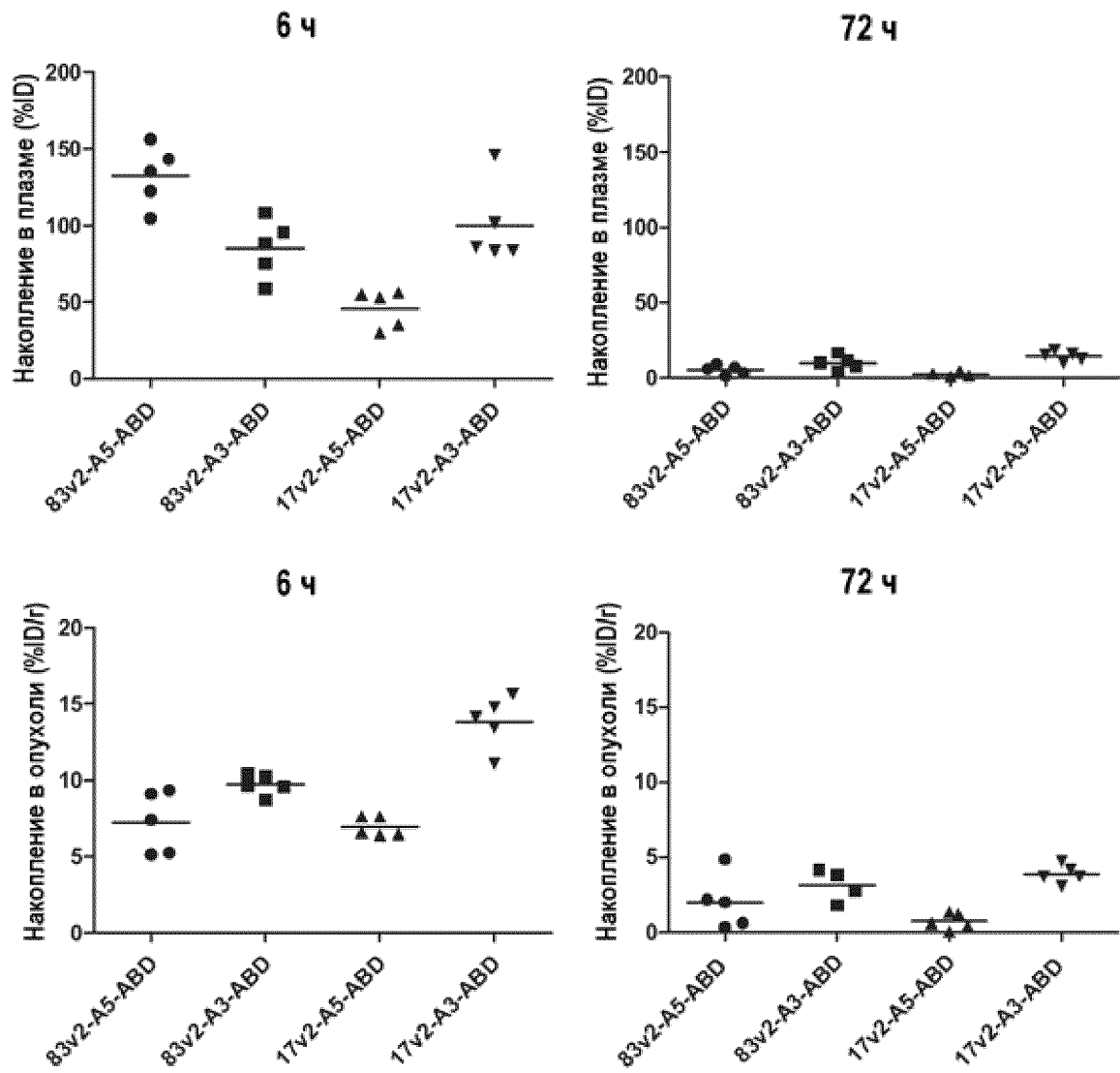
## ФИГ. 7



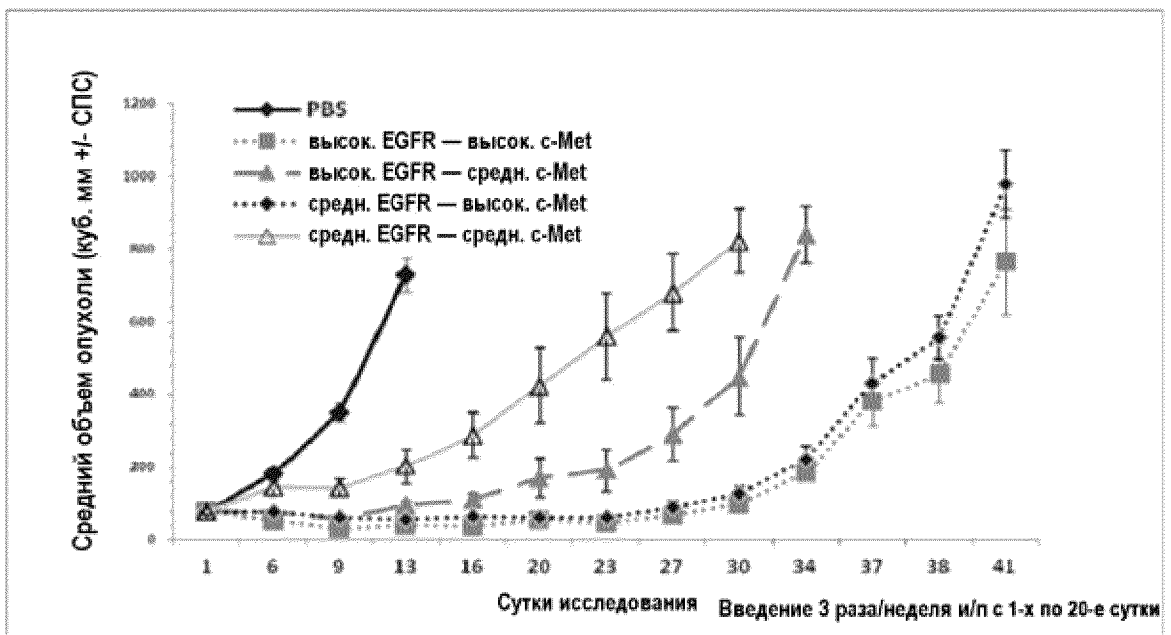
ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10



ФИГ. 11

