

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201791577** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2017.11.30

(51) Int. Cl. *A61K 38/39* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*C07K 14/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2013.11.21

---

(54) **СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С EGFR И c-Met МОЛЕКУЛЫ С ДОМЕНАМИ ФИБРОНЕКТИНА ТИПА III**

---

(31) 61/728,906; 61/728,912; 61/728,914;  
61/782,550; 61/809,541

(32) 2012.11.21; 2012.11.21; 2012.11.21;  
2013.03.14; 2013.04.08

(33) US

(62) 201590998; 2013.11.21

(71) Заявитель:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Андерсон Марк, Агтар Рикардо,  
Дим Майкл, Хиун Лайнус, Джекобс  
Стивен, Кинг Аластэр, Клейн Донна,  
Мурс Шери, О'Нил Карин, Пича  
Кристен (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Описаны моноспецифические и биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR и/или c-Met, выделенные нуклеотиды, кодирующие молекулы, векторы, клетки-хозяева и способы их получения. Данные моноспецифические и биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR и/или c-Met, подходят для создания терапевтических композиций для лечения и диагностики заболеваний и расстройств, включая рак.

**201791577**  
**A1**

**201791577**  
**A1**

**СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С EGFR И С-МЕТ МОЛЕКУЛЫ С ДОМЕНАМИ ФИБРОНЕКТИНА  
ТИПА III**

**ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к моноспецифическим или биспецифическим связывающимся с EGFR и/или с-Met молекулам и способам получения и применения молекул.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1 или HER1) представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 170 кДа, кодируемый протоонкогеном *c-erbB1*. EGFR относится к семейству человеческих рецепторов эпидермальных факторов роста (HER), которые представляют собой рецепторные тирозинкиназы (RTK), включающие HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). EGFR-сигнализация запускается связыванием с лигандом, за которым следует конформационное изменение, гомодимеризация или гетеродимеризация рецептора с другими членами семейства ErbB и трансаутофосфорилирование рецептора (Ferguson *et al.*, *Annu Rev Biophys*, 37: 353-73, 2008), в результате чего запускаются каскады передачи сигналов, которые в конечном счете влияют на широкий спектр клеточных функций, включая пролиферацию и выживаемость клеток. Увеличение экспрессии или киназной активности EGFR соотносят с рядом разновидностей рака у человека, что делает EGFR привлекательной мишенью для терапевтического воздействия (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). Как увеличение количества копий гена EGFR, так и увеличение экспрессии белка связывают с благоприятными ответами на ингибитор тирозинкиназы EGFR, IRESSA™ (гефитиниб) при немелкоклеточном раке легких (Hirsch *et al.*, *Ann Oncol* 18:752-60, 2007).

EGFR-терапия включает использование как малых молекул, так и антител к EGFR, которые одобрены 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 анти-EGFR-терапии может зависеть от типа опухоли и от статуса мутации/амплификации EGFR в опухоли. Побочные эффекты существующих терапевтических средств могут включать 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 терапии 2-й 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 обнаружили, что воздействие канцерогена приводило к появлению конститутивно активного слитного белка TPR-MET (Cooper *et al.*, Nature 311:29-33, 1984). Активация c-Met посредством его лиганда, фактора роста гепатоцитов (HGF), вызывала 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 and. 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 из-за 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 рак 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). Мутации c-Met, локализованные в семафориновом или околочелюстном 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, раке толстой кишки, раке желудка и раке легких определяется амплификация c-Met, часто коррелируя 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 c-Met (Ichimura *et al.*, Jpn J Cancer Res, 87:1063-9, 1996). Более того, почти половина клинических образцов легочных аденокарцином показывала высокие уровни c-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).

Почти в 60% всех опухолей, которые стали резистентны к ингибиторам тирозинкиназы EGFR, увеличена экспрессия c-Met, амплификация c-Met или увеличен уровень его единственного



известного лиганда, HGF (Turke *et al.*, *Cancer Cell*, 17:77-88, 2010), что указывает на наличие компенсаторного пути для EGFR через с-Met. Амплификацию с-Met впервые обнаружили в культивируемых клетках, которые стали резистентны к gefитинибу, ингибитору киназы EGFR, и показывали улучшенную выживаемость через путь Her3 (Engelman *et al.*, *Science*, 316:1039-43, 2007). Это дополнительно подтверждали клиническими образцами, где у девяти из 43 пациентов с приобретенной резистентностью к эрлотинибу или gefитинибу проявилась амплификация с-Met в сравнении лишь с двумя из 62 пациентов без лечения. 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).

Отдельные роли как EGFR, так и с-Met при раке хорошо известны, что делает данные мишени привлекательными для комбинированной терапии. Оба рецептора генерируют сигнал через одни и те же антиапоптозные и обеспечивающие выживаемость пути (ERK и АКТ); таким образом, одновременное ингибирование данной пары может ограничить потенциал активации компенсаторных путей, таким образом повышая общую эффективность. Комбинированные виды терапии, ориентированные на EGFR и с-Met, тестировали в клинических испытаниях Tarceva® (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 анти-EGFR/с-Met молекулы 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 терапевтических средств, антагонистов к сигнальным путям EGFR и/или c-Met, могут быть недостаточно оптимальны из-за возможного недостатка специфичности, потенциальной побочной активности и ограничивающей дозу токсичности, которая может проявляться при использовании низкомолекулярных ингибиторов. Типичные двухвалентные антитела могут приводить к кластеризации мембраносвязанных рецепторов и нежелательной активации расположенных ниже сигнальных путей. Одновалентные антитела (с одной детерминантой) отличаются существенной сложностью и затратны в производстве.

Соответственно, существует потребность в дополнительных моноспецифических или биспецифических ингибиторах EGFR и/или c-Met как для терапевтического, так и для диагностического применения.

#### ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложена выделенная биспецифическая молекула, содержащая домены 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.

В настоящем изобретении также предложена выделенная биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, а второй домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 83% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

В настоящем изобретении также предложены биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR и c-Met, и моноспецифические молекулы, содержащие домены FN3,

связывающиеся с EGFR или с-Met, имеющие определенные последовательности.

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, причем домен FN3 выделен из разработанной на основе Tencon библиотеки с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении также предложен 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.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий молекулу настоящего изобретения. Другой аспект настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен способ получения биспецифической молекулы, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина настоящего изобретения в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии биспецифической молекулы, и очищение биспецифической молекулы.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая молекулу настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения субъекта, больного раком, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, или домена FN3, связывающегося с EGFR или с-Met, нуждающемуся в лечении пациенту в течение времени, достаточного для лечения рака.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1А и 1В. Выравнивание аминокислотной последовательности доменов FN3, связывающихся с EGFR. В прямоугольники заключены петли BC и FG в остатках 22-28 и 75-86

последовательности SEQ ID NO: 18. Некоторые варианты включают повышающие температурную стабильность замены L17A, N46K и E86I (нумерация остатков соответствует последовательности Tencon SEQ ID NO: 1). Соответствующие паратопу P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27) остатки подчеркнуты (D23, F27, Y28, V77, G85 в SEQ ID NO: 27).

Фиг. 2. Выравнивание последовательности каркаса Tencon27 (SEQ ID NO: 99) и библиотеки TCL14 (SEQ ID NO: 100) с рандомизированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG. Остатки петли заключены в прямоугольники. Над последовательностями обозначены петли и тяжи.

Фиг. 3. Выравнивание последовательности доменов FN3, связывающихся с c-Met. Петля C и тяж CD, а также петля F и тяж FG заключены в прямоугольники и охватывают остатки 29-43 и 65-81. Соответствующие паратопу остатки P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41) подчеркнуты (R34S, F38S, M72S и I79S).

Фиг. 4. Показано ингибирование фосфорилирования c-Met в клетках H292, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3, и стимулированных HGF. Наблюдали существенное увеличение эффективности биспецифической EGFR/c-Met молекулы (ECB1) по сравнению с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с c-Met (P114AR5P74-A5, показан на фигуре как элемент A5), используемым отдельно или в комбинации с доменом FN3, связывающимся с EGFR (P54AR4-83v2, показан на фигуре как элемент 83v2).

Фиг. 5. Ингибирование фосфорилирования EGFR и c-Met в клетках, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3. В клеточных линиях с высокими уровнями экспрессии EGFR, NCI-H292 (Фиг. 5A) и H596 (Фиг. 5B) моноспецифические к EGFR или биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, в равной степени эффективно могут уменьшать фосфорилирование EGFR. В клеточных линиях с низким уровнем экспрессии EGFR относительно c-Met, H441 (Фиг. 5C) биспецифические EGFR/c-Met молекулы повышают эффективность ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению с одним моноспецифическим доменом FN3, связывающимся

с EGFR. В клеточных линиях с низким уровнем экспрессии с-Met относительно EGFR, H292 (Фиг. 5D) и H596 (Фиг. 5E) ингибирование фосфорилирования с-Met существенно усиливалось при использовании биспецифической EGFR/с-Met молекулы по сравнению с одним моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с с-Met. В исследовании использовали следующие молекулы: биспецифическая ECB5 (показана на фигуре как элемент 17-A3), моноспецифический домен FN3, связывающийся с EGFR P53A1R5-17, (показан на фигуре как элемент 17), биспецифическая EGFR/с-Met молекула ECB3 (показана на фигуре как элемент 83-H9) и моноспецифический домен FN3, связывающийся с с-Met, P114AR7P93-H9 (показан на фигуре как элемент H9).

Фиг. 6. Фармакодинамическая сигнализация в опухолях, выделенных из мышей, получавших биспецифические EGFR/с-Met молекулы в течение 6 ч или 72 ч. Все молекулы существенно снижали фосфорилирование с-Met, EGFR и ERK как через 6 ч, так и через 72 ч, степень ингибирования зависела от аффинности доменов FN3 к EGFR и/или с-Met. Биспецифические молекулы получали путем соединения домена FN3, связывающегося с EGFR, с высокой (показано на фигуре как элемент 83, p54AR4-83v2) или средней (показано на фигуре как элемент 17v2, P53A1R5-17v2) аффинностью с доменом FN3, связывающимся с с-Met, с высокой (показано на фигуре как элемент A3, P114AR7P94-A3) или средней (показано на фигуре как элемент A5, P114AR5P74-A5) аффинностью.

Фиг. 7. Накопление в плазме (наверху) и в опухоли (внизу) биспецифических EGFR/с-Met молекул с различной аффинностью, связанных с альбумин-связывающим доменом (ABD), показано через 6 ч (слева) и 72 ч (справа) после и/п введения. Через шесть часов после введения накопление в опухоли было максимальным у мышей, получавших биспецифическую молекулу, содержащую домен FN3, связывающийся с EGFR (17v2) со средней аффинностью, или домен, связывающийся с EGFR (83v2) с высокой аффинностью. Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR или с-Met со средней или высокой аффинностью, были следующими: 83v2-A5-ABD (ECB18; высокая/средняя к EGFR/с-Met) 83v2-A3-ABD (ECB38; высокая/высокая) 17v2-A5 (ECB28;

средняя/средняя) 17v2-A3-ABD (ECB39; средняя/высокая). На данной фигуре элемент 83v2 обозначает p54AR4-83v2; 17v2 обозначает p53A1R5-17v2; A3 обозначает p114AR7P94-A3, и A5 обозначает p114AR5P74-A5.

Фиг. 8. Ксенотрансплантаты опухоли H292-HGF имплантировали бежевым мышам SCID. Когда опухоли достигали среднего объема приблизительно 80 мм<sup>3</sup>, мышам три раза в неделю вводили биспецифические 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 c-Met обозначает p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ECB38); высокая EGFR - средняя c-Met обозначает p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ECB18); средняя EGFR - высокая c-Met обозначает p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3 (ECB39); средняя EGFR - средняя c-Met обозначает p53A1R5-17-p114AR5P74-A5 (ECB28)).

Фиг. 9. Ксенотрансплантаты опухоли H292-HGF имплантировали бежевым мышам SCID и проводили разные виды терапии. Показана противоопухолевая активность терапии (биспецифическая EGFR/c-Met молекула обозначает p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3-ABD (ECB38); другие виды терапии представляют собой кризотиниб, эрлотиниб, цетуксимаб и комбинацию кризотиниба и эрлотиниба).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

При применении в настоящем документе термин «домен фибронектина типа III (FN3)» («домен FN3») обозначает домен, часто встречающийся 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 различных доменов FN3, присутствующих в тенасцине-С человека, 15 различных доменов FN3, присутствующих в фибронектине (FN) человека, и синтетические домены неприродного происхождения FN3, 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).

Применяемые в настоящем документе термины «замена», «замещенный», «мутация» или «мутированный» относятся к изменению, делеции или вставке одной или более аминокислот или нуклеотидов в последовательности полипептида или полинуклеотида для создания варианта данной последовательности.

Применяемые в настоящем документе термины «рандомизация», «рандомизированный», «диверсифицированный» или «диверсификация» относятся 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 настоящего изобретения связываться с заданным антигеном с константой диссоциации ( $K_D$ ) приблизительно  $1 \times 10^{-6}M$  или менее, например приблизительно  $1 \times 10^{-7}M$  или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-8}M$  или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-9}M$  или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-10}M$  или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-11}M$  или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-12}M$  или менее или приблизительно  $1 \times 10^{-13}M$  или менее. Как правило, домен FN3 настоящего 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), как измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, оборудования Proteon (BioRad). Таким образом, биспецифическая молекула настоящего изобретения, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, специфически связывается как с EGFR, так и с c-Met с аффинностью связывания ( $K_D$ ) по меньшей мере  $1 \times 10^{-6}M$  или менее, как для EGFR, так и для

c-Met. Однако выделенный домен FN3 настоящего изобретения, который специфически связывается с заданным антигеном, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например с тем же заданным антигеном из другого вида (гомологом).

Применяемый в настоящем документе термин «библиотека» относится к группе вариантов. Библиотека может состоять 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 активностей, 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 человеческому EGFR (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 вариантами природного происхождения. Такие варианты включают хорошо известный EGFRvIII и другие варианты альтернативного сплайсинга (например, определенный под номером P00533-1 в SwissProt (дикий тип, идентичный SEA ID NO: 73 и NP\_005219), P00533-2 (F404L/L405S), P00533-3 (628-705: CTGPGLEGCP...GEAPNQALLR→PGNESLKAML...SVIITASSCH и 706-1210 удаленные), P00533-4 (C628S и 629-1210 удаленные), варианты Q98, R266, K521, I674, G962 и P988 (Livingston *et al.*, NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478), T790M, L858R/T790M и del (E746, A750).

Применяемый в настоящем документе термин «лиганд EGFR» включает все (например, физиологические) лиганды для EGFR, включая EGF, TGF- $\alpha$ , гепарин-связывающий EGF (НВ-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 его вариантами природного происхождения.

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 связывания» относятся к способности доменов FN3 настоящего изобретения биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, блокировать или ингибировать связывание лиганда EGFR, например EGF, с EGFR и/или HGF с с-Met, и включают как частичное, так и полное блокирование/ингибирование. Блокирование/ингибирование лиганда EGFR, например EGF, с EGFR и/или HGF с с-Met, посредством домена FN3 или биспецифической молекулы настоящего изобретения, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, частично или полностью снижает нормальный уровень сигнализации EGFR и/или сигнализации с-Met по сравнению со связыванием лиганда EGFR с EGFR и/или связыванием HGF с с-Met без блокирования или ингибирования. Домен FN3 или биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, «блокирует связывание» лиганда EGFR, например EGF, с EGFR и/или HGF с с-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 методов, например измеряя ингибирование связывания биотинилированного EGF на экспрессирующих EGFR клетках A431, которые подвергали

воздействию домена FN3 или биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, с использованием FACS и с использованием способов, описанных в настоящем документе, или путем измерения связывания биотинилированного HGF с внеклеточным доменом c-Met с использованием хорошо известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Применяемый в настоящем документе термин «сигнализация EGFR» обозначает передачу сигнала, индуцированного связыванием лиганда EGFR с EGFR, что ведет 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 настоящего 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%.

Применяемый в настоящем документе термин «сигнализация c-Met» относится к передаче сигнала, индуцированного связыванием лиганда HGF с c-Met, что ведет к аутофосфорилированию по меньшей мере одного тирозинового остатка в c-Met. Как правило, по меньшей мере один тирозиновый остаток в положениях 1230, 1234, 1235 или 1349 после связывания HGF подвергается аутофосфорилированию.

Применяемый в настоящем документе термин «нейтрализует сигнализацию c-Met» обозначает способность домена FN3 настоящего 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 гиперэкспрессия может быть

вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию EGFR и/или c-Met можно измерить, используя хорошо известные анализы, например ИФА, иммунофлуоресценцию, проточную цитометрию или радиоиммунный анализ на живых или лизированных клетках. Альтернативно, или в качестве дополнения, уровни молекул нуклеиновых кислот, кодирующих EGFR и/или c-Met, можно измерить в клетке, например, используя флуоресцентную гибридизацию *in situ*, Саузерн-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 уровня нормальной клетки.

Применяемый в настоящем документе термин «Tenson» обозначает синтетический домен 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» обозначает раковую, предраковую или преобразованную клетку *in vivo*, *ex vivo* и в культуре клеток, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения, которые не обязательно затрагивают получение нового генетического материала. Хотя преобразование может вызвать инфицирование преобразующим вирусом и встраивание новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощение экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутирование 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 в подходящих животных-хозяевах, 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 в биологической системе или который можно

переместить между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, способствующие удвоению или сохранению данных полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Понятие «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 сахарофосфатный остов или через 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 EGFR/c-Met молекула» или «биспецифическая EGFR/c-Met молекула, содержащая домены FN3» обозначает молекулу, содержащую домен FN3, связывающийся с EGFR, и отдельный домен FN3, связывающийся с c-Met, которые связаны ковалентно или напрямую, или посредством линкера. Пример биспецифической молекулы, связывающейся с EGFR/c-Met, содержит первый домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающийся с c-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 одного, двух, четырех и шести сайтов связывания соответственно, специфичных для антигена.

Применяемый в настоящем документе термин «смесь» относится к образцу или препарату доменов FN3 без ковалентной связи между ними. Смесь может состоять из двух и более идентичных доменов FN3 или разных доменов FN3.

#### Композиции настоящего изобретения

В настоящем изобретении предложены моноспецифические и биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR и/или c-Met. В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие домены FN3 настоящего изобретения, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

#### Моноспецифические молекулы, связывающиеся с EGFR

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 настоящего изобретения, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Домены FN3 настоящего изобретения связываются с EGFR с высокой аффинностью, ингибируя сигнализацию EGFR, и могут оказать 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.

В настоящем изобретении также предложен 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 настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, 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 определением величины флуоресценции от связанного биотинилированного EGF с использованием конъюгата стрептавидин-фикоэритрин при 600 нм в клетках A431, инкубированных с доменами FN3 настоящего изобретения или без них. Примеры доменов FN3 могут блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  от приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, как например, домены FN3, связывающиеся с EGFR, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137. Домены FN3 настоящего 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 настоящего изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Домены FN3 настоящего изобретения, описанные в настоящем изобретении, могут 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 настоящего изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Связывание лиганда, например EGF, с EGFR, стимулирует димеризацию рецептора, аутофосфорилирование, активацию внутреннего цитоплазматического тирозинкиназного домена рецептора и инициирование множества сигнальных путей передачи и транзактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла и 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 хорошо 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 определять хорошо известными способами, такими как анализ ИФА или вестерн-блоттинг, с использованием антитела, специфичного к фосфотирозину. Примеры анализа можно найти в публикациях Panek *et al.*, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997 и Batley *et al.*, Life Sci 62:143-50, 1998, и в анализах, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего 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 использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC<sub>50</sub> от приблизительно  $1,8 \times 10^{-8}$  М до приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках A431 с использованием 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 некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем

документе, домен FN3 настоящего 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), известными специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 настоящего изобретения связывает человеческий EGFR с  $K_D$  от приблизительно  $2 \times 10^{-10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М. Аффинность домена FN3 к EGFR можно определить экспериментально с помощью 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); и описанные в настоящем документе способы). Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре «домен FN3 - антиген» может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) предпочтительно производят с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

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

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3, который специфически связывается с EGFR, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3, который специфически связывается с EGFR, содержит

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ



ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDMVL (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 настоящего изобретения, которые специфически связывают EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, как описано в настоящем документе, могут содержать в качестве структурного элемента петлю FG, которая содержит последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), где X<sub>9</sub> представляет собой M или I. Такие домены FN3 также могут 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 или со значением IC<sub>50</sub> от приблизительно  $1,8 \times 10^{-8}$  M до приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  M при измерении в клетках A431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

Домены FN3 настоящего изобретения, которые специфически связывают EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, как описано в настоящем документе, дополнительно содержат 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>DSFLIQYQESEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNX<sub>9</sub>RGLPLSAEFTT (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>DSFLIQYQESEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGLVLSYVFEHDMVLPLSAEFTT (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.

Домены FN3, связывающиеся с EGFR, описанные в настоящем документе, можно создать и протестировать на их способность ингибировать аутофосфорилирование EGFR с использованием хорошо известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен FN3, который специфически связывается с EGFR, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 или 194-211.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3, связывающийся с EGFR, содержит инициатор-метионин (Met), присоединенный к N-концу, или цистеин (Cys), присоединенный к C-концу конкретного домена FN3, например, для усиления экспрессии и/или для конъюгации с увеличивающими период полужизни молекулами.

В настоящем изобретении также предложен 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 Tencon с последовательностью SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с EGFR и блокирует связывание EGF с EGFR, причем домен FN3 связывается с EGFR при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам D23, F27, Y28, V77 и G85 из P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27).

Аминокислотные остатки, участвующие в связывании домена

FN3 с EGFR, можно идентифицировать с использованием таких способов, как мутагенез и оценка связывания остатков/поверхности по кристаллической структуре. Замены остатков D23, F27, Y28, V77, G85 в домене FN3, связывающемся с EGFR, P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), уменьшали связывание EGFR с доменов FN3 по меньшей мере 100-кратно. Для доменов FN3, связывающихся с EGFR, P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 и P54AR4-83v23, данные остатки являются общими, и можно ожидать, что они будут связываться с EGFR в тех же паратопных остатках, что и P54AR4-83v2. Можно создавать другие домены FN3, связывающиеся с EGFR, сохраняя неизменными положения D23, F27, Y28, V77, G85 и меняя аминокислоты, размещенные в других положениях BC- и FG-петель (положения 24, 25, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 и 86). Данные изменения можно осуществлять путем формирования конкретных аминокислот в конкретных положениях или путем включения данных положений в библиотеку, где данные сайты подвергают случайной замене аминокислот. Разработанные таким образом новые домены FN3 можно использовать для скрининга или выбора оптимизированных свойств, таких как связывание с EGFR, растворимость, стабильность, иммуногенность или период полужизни в сыворотке.

Моноспецифические молекулы, связывающиеся с c-Met

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

Домены FN3 настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, связываются с c-Met с высокой аффинностью, ингибируя сигнализацию c-Met, и могут оказать благоприятный эффект в плане специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами c-Met и иметь

улучшенное проникание в ткани по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител. Домены FN3 настоящего изобретения являются одновалентными, и, следовательно, предотвращается нежелательная кластеризация и активация рецептора, которая возможна при использовании других двухвалентных молекул.

В настоящем изобретении также предложен 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 настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, 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, определяющем ингибирование связывания биотинилированного HGF со слитным белком с-Met-Fc в присутствии доменов FN3 настоящего изобретения. Примеры доменов FN3 могут блокировать связывание HGF с с-Met со значением  $IC_{50}$  от приблизительно  $2 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $6 \times 10^{-8}$  М. Домены FN3 настоящего 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 настоящего изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

Домен FN3 настоящего изобретения, описанный в настоящем документе, 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 настоящего изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

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

внутреннего цитоплазматического тирозинкиназного домена рецептора и иницирование множества сигнальных путей передачи и транзактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла и деления. Ингибирование сигнализации с-Met может приводить к ингибированию одного или более расположенных ниже сигнальных путей 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 хорошо известными способами, например путем измерения аутофосфорилирования рецептора по меньшей мере одного из тирозиновых остатков Y1230, Y1234, Y1235 или Y1349 и/или фосфорилирования природных или синтетических субстратов. Фосфорилирование можно определять, например, при помощи антитела, специфичного к фосфотирозину, способом ИФА или вестерн-блоттингом. Можно применять анализы на тирозинкиназную активность (Panek *et al.*, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997; Batley *et al.*, Life Sci 62:143-50, 1998) и анализы, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по остатку с-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно 1×10<sup>-6</sup> М, менее чем приблизительно 1×10<sup>-7</sup> М, менее чем приблизительно 1×10<sup>-8</sup> М, менее чем приблизительно 1×10<sup>-9</sup> М, менее чем приблизительно 1×10<sup>-10</sup> М, менее чем приблизительно 1×10<sup>-11</sup> М или менее чем приблизительно 1×10<sup>-12</sup> М при измерении в клетках NCI-N441 с использованием 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении Y1349 со значением IC<sub>50</sub> от приблизительно 4×10<sup>-9</sup> М до приблизительно 1×10<sup>-6</sup> М при измерении

в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения связывает человеческий с-Met с константой диссоциации ( $K_D$ ), которая равна или меньше 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 способа Kineха, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 настоящего изобретения связывается с человеческим с-Met с  $K_D$  от приблизительно  $3 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-8}$  М. Аффинность домена FN3 к с-Met можно определить экспериментально с использованием любого подходящего метода. (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); и описанные в настоящем документе способы.) Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре «домен FN3 - антиген» может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) предпочтительно производят с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

Примеры доменов FN3 настоящего изобретения, которые связываются с с-Met, включают домены FN3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32-49, 111-114 или 212-223.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3, который специфически связывается с с-Met, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 83% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3, который специфически связывается с с-Met,

содержит

тяж С 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), причем

- 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 или L.

Домены FN3 настоящего изобретения, которые специфически связываются с с-Met и ингибируют аутофосфорилирование с-Met, как описано в настоящем документе, 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 или L.

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен FN3, который специфически связывается с с-Met, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49 или 111-114.

В настоящем изобретении также предложен 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 Tencon с последовательностью SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с с-Met и блокирует связывание HGF с с-Met, причем домен FN3 связывается с с-Met при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам R34, F38, M72 и I79 из P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

Аминокислотные остатки, участвующие в связывании домена FN3 с с-Met, можно идентифицировать с использованием таких способов, как мутагенез и оценка связывания остатков/поверхности по кристаллической структуре. Замены в остатках R34S, F38S, M72S и I79S домена FN3, связывающегося с с-Met, P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 27), уменьшали связывание с-Met с доменом FN3 по меньшей мере 100-кратно. У молекул с доменами FN3, связывающимися с с-Met, P114AR7P92-F3, P114AR7P95-D3, P114AR7P95-F10 и P114AR7P95-H8, данные остатки являются общими, и можно ожидать, что они будут связываться с с-Met в тех же паратопных остатках, что и P114AR7P95-A3. Можно создавать другие домены FN3, связывающиеся с с-Met, сохраняя неизменными положения R34S, F38S, M72S и I79S и меняя аминокислоты, размещенные в других положениях тяжа C, тяжа F, петли CD и/или петель FG (положения 32, 36, 39, 40, 68, 70, 78 и 81). Данные изменения можно осуществлять путем формирования



конкретных аминокислот в конкретных положениях или путем включения данных положений в библиотеку, где данные сайты подвергают случайной замене аминокислот. Разработанные таким образом новые домены FN3 можно использовать для скрининга и выбора оптимизированных свойств, таких как связывание с с-Met, растворимость, стабильность, иммуногенность или период полужизни в сыворотке.

Выделение доменов FN3, связывающихся с EGFR или с-Met, 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 человеческого тенастина-С (Jacobs *et al.*, Protein Engineering, Design and Selection, 25:107-117, 2012; патентная публикация США № 2010/0216708). В кристаллической структуре соединения Tenson выявляются шесть открытых на поверхности петель, соединяющих семь бета-тяжей, характерных для доменов FN3, где 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). Данные петли или выбранные остатки в пределах каждой петли можно рандомизировать с конструированием библиотеки доменов фибронектина типа III (FN3), которые можно использовать для выбора новых молекул, связывающихся с EGFR или с-Met. В таблице 1 представлены положения и последовательности всех петель и бета-тяжей в соединении Tenson (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, библиотека, сконструированная на основе последовательности Tenson, может иметь рандомизированную петлю FG или рандомизированные петли ВС и FG, как например, описанные ниже библиотеки TCL1 или TCL2. Петля ВС Tenson состоит из 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 FC в Tenson состоит из 7 аминокислот; таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tenson с диверсификацией по петле FC 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 Tenson имеет длину в 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител находится в диапазоне 4-28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия петлю FG можно диверсифицировать в последовательности, а также по длине для соответствия диапазону длины CDR3 антитела в 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 Tenson, также может иметь альтернативные рандомизированные поверхности, образованные сбоку от домена FN3 и содержащие два или более бета-тяжа 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 Tenson, показанной на Фиг. 1, и подробное описание приводится в патентной публикации США № US2013/0226834. Библиотеки, разработанные на основе последовательности Tenson, также включают библиотеки на основе вариантов Tenson, таких как варианты Tenson, имеющие замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1), причем варианты демонстрируют повышенную температурную стабильность. Примеры вариантов Tenson описаны в патентной публикации США № 2011/0274623 и включают Tenson27 (SEQ ID NO: 99), имеющий замены E11R, L17A, N46V и E86I относительно Tenson последовательности SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Домен FN3	Tenson (SEQ ID NO: 1)
Тяж А	1-12
Петля АВ	13-16

Тяж В	17-21
Петля ВС	22-28
Тяж С	29-37
Петля CD	38-43
тяж D	44-50
Петля DE	51-54
Тяж E	55-59
Петля EF	60-64
Тяж F	65-74
Петля FG	75-81
тяж G	82-89

Библиотеки на основе Tenson и другой FN3-последовательности можно рандомизировать по выбранным положениям остатков с использованием случайного или заданного набора аминокислот. Например, варианты библиотеки, имеющей случайные замены, можно создавать с использованием кодонов NNK, которые кодируют все 20 аминокислот, встречающихся в естественных условиях. 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 можно применять кодоны NNS для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов. Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в диверсифицируемых положениях можно синтезировать, например, с использованием технологии Slonomics® (<http://www.sloning.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 желаемой молекулы ДНК. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR или c-Met, как описано в настоящем

документе, можно выделить путем создания FN3-библиотеки, такой как Tenson-библиотека, с использованием дисплея *cis* для лигирования фрагментов ДНК, кодирующих каркасные белки, с фрагментами ДНК, кодирующими *RepA*, для генерации пула комплексов белок-ДНК, формирующихся 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 *c-Met* любым способом, известным специалистам в данной области или описанным в примере. Примеры хорошо известных способов, которые можно применять, представляют собой ИФА, иммуноферментный сэндвич-анализ 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 связывающиеся с EGFR или *c-Met*, по их способности блокировать связывание лиганда EGFR, как например EGF, с EGFR или связывание HGF с *c-Met*, а также по их способности ингибировать сигнализацию EGFR и/или *c-Met* с использованием способов, описанных в настоящем документе.

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR или *c-Met*, можно получить, используя любой домен FN3 в качестве шаблона для генерации библиотеки и поиска в библиотеке молекул, специфически связывающихся с EGFR или *c-Met*, с использованием предложенных способов. Примеры подходящих для использования доменов FN3 включают 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 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR или c-Met, описанные в настоящем документе, можно модифицировать для улучшения их свойств, например улучшения температурной стабильности и обратимости термического свертывания/развертывания. Для повышения очевидной термостабильности белков и ферментов использовали несколько 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 термостабильность может повышать выход экспрессируемого белка, повышать растворимость или активность, снижать иммуногенность и минимизировать необходимость в холодной линии для производства. Остатки, в которые можно ввести замены для повышения термостабильности 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 данным остаткам, можно ввести в домены FN3 или в биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3.

В настоящем изобретении также предложен 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, причем

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).

В настоящем изобретении также предложен 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, причем 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 настоящего изобретения содержат замены, соответствующие заменам L17A, N46V и E86I в Tencon (SEQ ID NO: 1).

Домены FN3, специфически связывающиеся с EGFR, как описано в настоящем документе (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, связывающихся с EGFR, показанных на Фиг. 1A и 1B, кроме домена FN3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, в которой соответствующие остатки представляют собой остатки 11, 14, 17, 38, 74 и 92 вследствие вставки одной аминокислоты в петлю BC.

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен FN3, который специфически связывается с EGFR и блокирует связывание EGF с EGFR, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 или 194-211, необязательно имеющую одну, две или три замены, соответствующие заменам L17A, N46V и E86I в Tencon (SEQ ID NO: 1).

В настоящем изобретении также 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, 111-114

или 212-223, необязательно имеющую одну, две или три замены, соответствующие заменам L17A, N46V и E86I в Tencon (SEQ ID NO: 1).

Измерение стабильности белка и лабильности белка можно рассматривать как один или различные аспекты целостности белка. Белки чувствительны или «лабильны» к денатурации, вызванной нагревом, ультрафиолетовым или ионизирующим облучением, изменением осмолярности окружающей среды и pH при нахождении в жидком растворе, механическим сдвиговым усилием, вызванным фильтрованием через поры малого размера, ультрафиолетовым облучением, ионизирующим облучением, таким как гамма-облучение, химической или термической дегидратацией или любым другим воздействием или силой, которые могут привести к разрушению структуры белка. Стабильность молекулы можно определить с использованием стандартных способов. Например, стабильность молекулы можно определить путем измерения температуры термического плавления (ТМ) – температуры в градусах Цельсия (°C), при которой половина молекул разворачиваются, с использованием стандартных способов. Как правило, чем выше ТМ, тем более стабильной является молекула. Кроме нагрева, способность белка сохранять конкретную трехмерную структуру также можно изменять в зависимости от химического окружения.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домены FN3 настоящего изобретения, которые связываются EGFR или c-Met, показывают 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 тем же доменом до конструирования, что измеряется по повышению ТМ.

Химическую денатурацию аналогичным образом можно измерить различными способами. Химические денатурирующие вещества включают гидрохлорид гуанидиния, тиоцианат гуанидиния, мочевины, ацетон, органические растворители (ДМФА, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия);

восстановители (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитротиобензол, а также гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные моющие средства, кислоты (например, соляную кислоту (HCl), уксусную кислоту (CH<sub>3</sub>COOH), галогензамещенные уксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды) и направленные денатурирующие вещества. 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 некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с EGFR или c-Met, показывает 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 в сравнении с тем же каркасом до конструирования, что измеряется путем применения гидрохлорида гуанидиния в качестве химического денатурирующего вещества. Повышение стабильности можно измерять в зависимости от снижения флуоресценции триптофана при обработке повышающимися концентрациями гидрохлорида гуанидиния с использованием хорошо известных способов.

Домены FN3 настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, можно создать в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, как средство повышения валентности и, таким образом, авидности к связыванию молекулы-мишени или для создания би- или мультиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более различные 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 (GS)<sub>2</sub>, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 224), (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) и A(EAAAK)<sub>5</sub>AAA (SEQ ID NO: 84). Димеры и мультимеры могут соединяться друг с другом в направлении от N-конца к С-концу. Применение встречающихся в естественных условиях, а также 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 молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, могут оказать 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 молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, обеспечивают существенно повышенный синергический ингибиторный эффект по сравнению со смесью доменов FN3, связывающихся с EGFR и с c-Met. Молекулы можно настроить на конкретную аффинность в отношении как EGFR, так и c-Met для максимального повышения проникновения в опухоль и задержания в ней. Биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, обеспечивают более эффективное ингибирование сигнальных путей EGFR и/или c-Met и более эффективное ингибирование роста опухоли, чем цетуксимаб (Erbix®).

В настоящем изобретении также предложена выделенная биспецифическая молекула, содержащая домены 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 с-Met.

Биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, описанные в настоящем документе, можно получить путем ковалентного связывания любого домена FN3, связывающегося с EGFR, и любого домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с с-Met, напрямую или посредством линкера. Следовательно, первый домен FN3 биспецифической молекулы может иметь характеристики, описанные выше применительно к доменам FN3, связывающимся с EGFR, а второй домен FN3 биспецифической молекулы может иметь характеристики, описанные выше применительно к доменам FN3, связывающимся с с-Met.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, первый домен FN3 биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, 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 при измерении в клетках A431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $1,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл человеческого HGF.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, первый домен FN3 биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC<sub>50</sub> от приблизительно  $1,8 \times 10^{-8}$  М до приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках NCI-H292 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> от

приблизительно  $4 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл человеческого HGF.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, первый домен FN3 биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, связывается с человеческим EGFR с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, а второй домен FN3 биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, связывается с человеческим c-Met с  $K_D$  менее чем приблизительно  $5 \times 10^{-8}$  М.

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

Аффинность биспецифической EGFR/c-Met молекулы по отношению к EGFR и c-Met можно определить, как описано в примере 3 и примере 5 для моноспецифических молекул.

Первый домен FN3 в биспецифической EGFR/c-Met молекуле настоящего изобретения может блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  от приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1,5 \times 10^{-7}$  М в анализе с использованием клеток A431 и с определением 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 EGFR/c-Met молекулы настоящего 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 EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения может блокировать связывание HGF с c-Met со значением  $IC_{50}$  от приблизительно  $2 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $6 \times 10^{-8}$  М в анализе, определяющем ингибирование связывания биотинилированного HGF со слитным белком c-Met-Fc в присутствии второго домена FN3. Второй домен FN3 биспецифической 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 EGFR/c-Met молекула настоящего изобретения, описанная в настоящем документе, 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 EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

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

Биспецифические EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, содержащие первый домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающийся с c-Met, обеспечивают существенно более высокое синергичное ингибирование сигнализации EGFR и c-Met и пролиферации опухолевых клеток в сравнении с синергичным ингибированием, наблюдаемым в случае смеси первого и второго домена FN3. Синергичное ингибирование можно оценивать, например, путем измерения ингибирования фосфорилирования ERK посредством биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, и посредством смеси двух моноспецифических молекул, одна из которых связывается с EGFR, а другая - с c-Met. Биспецифические

EGFR/c-Met молекулы настоящего 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 с значением  $IC_{50}$  для смеси двух моноспецифических доменов FN3, что указывает на по меньшей мере 100-кратно более высокую эффективность биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, по сравнению со смесью двух моноспецифических доменов FN3. Примеры биспецифических EGFR/c-Met молекул, содержащих домены FN3, могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением  $IC_{50}$  приблизительно  $5 \times 10^{-9}$  М или менее. Фосфорилирование ERK можно измерять с использованием стандартных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Биспецифическая молекула настоящего изобретения, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, описанная в настоящем документе, 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 NGF. Биспецифическая молекула настоящего изобретения, описанная в настоящем документе, может ингибировать пролиферацию опухолевых клеток со значением  $IC_{50}$ , которое приблизительно в 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или приблизительно в 1000 раз меньше значения  $IC_{50}$  для ингибирования пролиферации опухолевых клеток смесью первого домена FN3 и второго домена FN3. Ингибирование пролиферации опухолевых клеток можно измерять с использованием стандартных способов и способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, связывается с EGFR при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам D23, F27, Y28, V77 и G85 последовательности P54AR4-

83v2 (SEQ ID NO: 27).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, связывается с c-Met при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам R34, F38, M72 и I79 в P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

Паратопные остатки биспецифических молекул можно идентифицировать в исследованиях мутагенеза или по структурам сокристаллизованных домена FN3 и EGFR или c-Met. Исследования мутагенеза можно проводить, например, с использованием аланинового сканирования, а полученные варианты тестировать на их связывание с EGFR или c-Met с помощью стандартных способов. Как правило, паратопные остатки представляют собой те остатки, мутагенез которых приводит к снижению или нарушению связывания с EGFR или c-Met. Домены FN3, связывающиеся с EGFR, с заменами аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям D23, F27, Y28, V77 и G85 последовательности P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), имеют связывание с EGFR, сниженное по меньшей мере в 100 раз по сравнению с последовательностью P54AR4-83v2 дикого типа. Биспецифические молекулы ESB1, ESB2, ESB3, ESB4, ESB5, ESB6, ESB7, ESB15, ESB17, ESB60, ESB37, ESB94, ESB95, ESB96, ESB97, ESB91, ESB18, ESB28, ESB38, ESB39, ESB168 и ESB176 имеют D, F, Y, V и G в положениях остатков, соответствующих остаткам D23, F27, Y28, V77 и G85 последовательности P54AR4-83v2, и ожидается, что они будут связываться с EGFR данными остатками. Домены FN3, связывающиеся с c-Met, с заменами аминокислотных остатков в положениях, соответствующих остаткам R34, F38, M72 и I79 последовательности P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41), имеют нарушенное или сниженное по меньшей мере в 100 раз связывание с c-Met по сравнению с последовательностью P114AR7P95-A3 дикого типа. Биспецифические молекулы ESB2, ESB5, ESB15, ESB60, ESB38 и ESB39 имеют остатки R, F, M и I в положениях, соответствующих остаткам R34, F38, M72 и I79 последовательности P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41), и ожидается, что они будут связываться с c-Met данными остатками.

В настоящем изобретении также предложена биспецифическая

молекула, содержащая домены 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), 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; 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), причем

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 или L.

В некоторых других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, 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>DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNX<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> DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGV LGSYVFEDHVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

где в SEQ ID NO: 182 и 183:

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 некоторых других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула содержит 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 или L.

Примеры биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-178 или 190-193.

Биспецифические EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, имеют некоторые структурные особенности, связанные с их функциональными характеристиками, такими как ингибирование аутофосфорилирования EGFR, например петли FG первого домена FN3, связывающейся с EGFR, которая содержит 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.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3 связывающиеся с EGFR/c-Met,

ингибируют индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $8 \times 10^{-7}$  M при измерении в клетках H292 с использованием 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  $8,4 \times 10^{-7}$  M при измерении в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл человеческого HGF;

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

HGF;

связываются с EGFR с  $K_D$  менее чем приблизительно  $2,0 \times 10^{-8}$  М; или

связываются с c-Met с  $K_D$  менее чем приблизительно  $2,0 \times 10^{-8}$  М; причем  $K_D$  измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, как описано в примерах 3 и 5.

В другом варианте осуществления биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met,

ингибируют индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением  $IC_{50}$  от приблизительно  $4,2 \times 10^{-9}$  М до  $8 \times 10^{-7}$  М при измерении в клетках H292 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF;

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

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

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

связываются с c-Met с  $K_D$  от приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $2,0 \times 10^{-8}$  М, причем  $K_D$  измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, как описано в примерах 3 и 5.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифические EGFR/c-Met молекулы содержат домен FN3, связывающийся с EGFR, с последовательностью

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 HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO:  
182), где

X<sub>1</sub> представляет собой D;

$X_2$  представляет собой D;  
 $X_3$  представляет собой P;  
 $X_4$  отсутствует;  
 $X_5$  представляет собой H или W;  
 $X_6$  представляет собой A;  
 $X_7$  представляет собой F;  
 $X_8$  представляет собой Y; и  
 $X_9$  представляет собой M или I; и  
 домен FN3, связывающийся с c-Met, с последовательностью  
 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

$X_{10}$  представляет собой W;  
 $X_{11}$  представляет собой F;  
 $X_{12}$  представляет собой F;  
 $X_{13}$  представляет собой V или L;  
 $X_{14}$  представляет собой G или S;  
 $X_{15}$  представляет собой S или K;  
 $X_{16}$  представляет собой E или D;  
 $X_{17}$  представляет собой V;  
 $X_{18}$  представляет собой N;  
 $X_{19}$  представляет собой L или M;  
 $X_{20}$  представляет собой G или S;  
 $X_{21}$  представляет собой S или K;  
 $X_{22}$  представляет собой I; и  
 $X_{23}$  представляет собой P.

Примеры биспецифических EGFR/c-Met молекул представляют собой молекулы с последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 57, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 или 190-193.

Биспецифические молекулы настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, 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 Tenson (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 в качестве замен можно использовать другие аминокислоты, например аминокислоты из семейства аминокислот, имеющих родственные боковые цепи, как описано ниже. Полученные варианты можно протестировать на их стабильность и связывание с EGFR и/или с-Met с использованием способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, содержит первый домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающийся с с-Met, причем первый домен FN3 содержит последовательность:

LPAPK<sub>24</sub>NLVVSX<sub>25</sub>VTX<sub>26</sub>DSX<sub>27</sub>RLSWDDPX<sub>28</sub>AFYX<sub>29</sub>SFLIQYQX<sub>30</sub>SEKVG<sub>31</sub>EAI<sub>32</sub>X<sub>33</sub>LTV  
PGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX<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:

LPAPK<sub>34</sub>NLVVSX<sub>35</sub>VTX<sub>36</sub>DSX<sub>37</sub>RLSWTAPDAAFD<sub>38</sub>FWIRYFX<sub>39</sub>FX<sub>40</sub>X<sub>41</sub>GX<sub>42</sub>AI<sub>43</sub>X<sub>44</sub>  
LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV<sub>44</sub>VNIX<sub>45</sub>X<sub>46</sub>VKGGX<sub>47</sub>ISPPLSAX<sub>48</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 некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, содержит первый домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и второй домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

Биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, описанные в настоящем документе, могут быть настроены на конкретную аффинность в отношении EGFR и c-Met для максимального увеличения накопления в опухоли.

В настоящем изобретении также предложена биспецифическая молекула, содержащая домены 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 Tenson SEQ ID NO: 1.

Биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, описанные в

настоящем документе, можно получить путем ковалентного соединения домена FN3, связывающегося с EGFR, и домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с с-Met, с использованием хорошо известных способов. Домены FN3 можно соединить посредством линкера, например линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают (GS)<sub>2</sub>, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 224), (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). Применение встречающихся в естественных условиях, а также 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 EGFR/с-Met молекулы настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, можно присоединить С-концом первого домена FN3 к N-концу второго домена FN3 или С-концом второго домена FN3 к N-концу первого домена FN3. Любой домен FN3, связывающийся с EGFR, можно ковалентно соединять с доменом FN3, связывающимся с с-Met. Примеры доменов FN3, связывающихся с EGFR, представляют собой домены, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 или 194-211, и примеры доменов FN3, связывающихся с с-Met, представляют собой домены, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49, 111-114 или 212-223. Домены FN3, связывающиеся с EGFR, соединенные с биспецифической молекулой, могут дополнительно содержать инициатор-метионин (Met) на своем N-конце.

Варианты биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, описанные в настоящем документе, входят в объем настоящего изобретения. Например, в биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, можно вводить заместители, если полученный вариант будет сохранять аналогичную исходной молекуле

избирательность и эффективность в отношении EGFR и c-Met. Примеры модификаций представляют собой, например, консервативные замены, приводящие к получению вариантов с характеристиками, которые аналогичны характеристикам исходной молекулы. Консервативными являются замены, проводимые внутри семейства аминокислот с родственной структурой боковых цепей. Генетически кодируемые аминокислоты можно разделить на четыре семейства: (1) кислотные (аспартат, глутамат); (2) основные (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) основные (лизин, аргинин, гистидин); (3) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), причем серин и треонин можно необязательно объединить в отдельную группу алифатических гидроксильных аминокислот; (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 молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, неконсервативных замен, т.е. замен 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 отклик аналогично немодифицированному полипептиду или фрагменту с использованием анализов, описанных в настоящем документе. Пептиды, полипептиды или белки с более чем одной заменой также можно легко протестировать аналогичным образом.

Биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, описанные в

настоящем документе, можно получать, например, в виде димеров или мультимеров для увеличения валентности и, таким образом, avidности связывания с молекулой-мишенью. Мультимеры можно получать путем соединения одного или более доменов FN3, связывающихся с EGFR, и одного или более доменов FN3, связывающихся с c-Met, с образованием молекул, содержащих по меньшей мере три индивидуальных домена FN3, которые являются по меньшей мере биспецифичными к EGFR или c-Met, например, посредством включения аминокислотного линкера с использованием хорошо известных способов.

В настоящем изобретении также предложена биспецифическая молекула, содержащая домены 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, 106, 118-121, 138-165, 170-179 или 190-193.

Фрагменты, увеличивающие период полужизни

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, или моноспецифические домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с EGFR или c-Met, как описано в настоящем документе, могут содержать другие субъединицы, присоединенные, например, посредством ковалентной связи. В одном аспекте настоящего изобретения биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, дополнительно содержат фрагмент, увеличивающий период полужизни. Примеры фрагментов, увеличивающих период полужизни, представляют собой альбумин, варианты альбумина, 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, и пример варианта альбумина представлен в SEQ ID NO: 189.



К молекулам настоящего изобретения можно присоединить весь константный участок антитела или его часть для придания им антителоподобных свойств, особенно свойств, связанных с Fc-областью, таких как 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 изменения остатков, которые в Fc отвечают за данные функции (см. обзор в публикации Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20, 685-691, 2009).

В биспецифические молекулы настоящего 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. Данные 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 формируемые рекомбинантным способом молекулы настоящего изобретения можно применять хорошо известные способы химического связывания.

К биспецифическим или моноспецифическим молекулам настоящего 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 настоящего

изобретения, которые, как описано в настоящем документе, включают дополнительные фрагменты, можно сравнить по функциональности с помощью нескольких хорошо 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 использованием растворимых форм рецепторов, таких как рецепторы FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с использованием хорошо известных клеточных анализов для измерения, например, ADCC или CDC, или оценки фармакокинетических свойств молекул настоящего изобретения на моделях *in vivo*.

#### Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева

В настоящем изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие домены FN3, связывающиеся с EGFR или c-Met, или биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, в виде выделенных полинуклеотидов, или в виде частей векторов экспрессии, или в виде частей 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 домены FN3, связывающиеся с EGFR или c-Met, или биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, также входят в объем настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 или 194-211.

В настоящем изобретении также предложен выделенный

полинуклеотид, кодирующий домен FN3, специфически связывающийся с c-Met, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49, 111-114 или 212-223.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическую EGFR/c-Met молекулу, содержащую домены FN3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-179 или 190-193.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 97, 98, 103, 104, 115, 116 или 166-169.

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

Полинуклеотиды настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну некодирующую последовательность, такую как промоторная или энхансерная последовательность, интрон, сигнал полиаденилирования, цис-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 рIX или рIII.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы,

вирусные векторы, бакуловирусные экспрессирующие векторы, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, подходящие для введения полинуклеотидов настоящего изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение каким-либо 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.

В настоящем изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор настоящего изобретения. Моноспецифический домен FN3, связывающийся с EGFR или с-Met, или биспецифическую молекулу настоящего изобретения, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, 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, Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd 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 происходить от млекопитающего, или ее можно выбрать из клеток COS-1, COS-7, HEK293, ВНК21, CHO, BSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых производных,

иммортиализованных или преобразованных клеток для указанных клеток. Альтернативно клетку-хозяина можно выбрать 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 настоящего изобретения представляет собой способ получения выделенного домена FN3 настоящего изобретения, специфически связывающегося с EGFR или с-Met, или выделенной биспецифической молекулы настоящего изобретения, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина настоящего изобретения в таких условиях, чтобы экспрессировался выделенный домен FN3, специфически связывающийся с EGFR или с-Met, или выделенная биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, а также очистку домена или молекулы.

Домен FN3, специфически связывающийся с EGFR или с-Met, или выделенную биспецифическую молекулу настоящего изобретения, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, 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 молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, и доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с EGFR или с-Met

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с с-Met, описанные в настоящем документе, можно использовать 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 настоящего изобретения можно использовать для лечения любого животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают 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 c-Met, включающий контактирование клеток с выделенной биспецифической молекулой, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменом FN3, связывающимся с EGFR, или доменом FN3 настоящего изобретения, связывающимся с c-Met.

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

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения субъекта, больного раком, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенной биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met, нуждающемуся в лечении пациенту в течение времени, достаточного для лечения рака.

Биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, можно использовать 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 молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с с-Met, можно использовать для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Раковые заболевания, поддающиеся лечению биспецифическими молекулами настоящего изобретения, включают раковые заболевания со сверхэкспрессией EGFR и/или с-Met, раковые заболевания с повышенной активностью и/или уровнем экспрессии EGFR (например, с активирующей EGFR мутацией, амплификацией гена EGFR или опосредованной лигандом активацией EGFR) и с повышенной активностью и/или уровнем экспрессии с-Met (например, с активирующей с-Met мутацией, амплификацией гена с-Met или опосредованной лигандом активацией с-Met).

Примеры активирующих EGFR мутаций, которые могут связываться с раком, включают точечные мутации, мутации делеции, мутации вставки, инверсии или амплификации генов, которые приводят к усилению по меньшей мере одной биологической активности EGFR, такой как повышение тирозинкиназной активности, формирование гомодимеров или гетеродимеров рецепторов, улучшение связывания с лигандом и т.п. Мутации могут локализоваться в любой части гена EGFR или регуляторной области, связанной с геном EGFR, и включают мутации в экзоне 18, 19, 20 или 21 или мутации в киназном домене. Примеры активирующих EGFR мутаций представляют собой замены G719A, L861X (X представляет собой любую аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P или T790M, делеция E746-A750, делеция R748-P753, вставка Ala между M766 и A767, вставка SVA (Ser, Val, Ala) между S768 и V769 и вставка NS (Asn, Ser) между P772 и H773. Другие примеры активирующих EGFR

мутаций известны в данной области (см., например, патентную публикацию США № US2005/0272083). Информация о EGFR и других рецепторах ErbB, включая гомо- и гетеродимерные рецепторы, лиганды рецепторов, сайты аутофосфорилирования и сигнальные молекулы, участвующие в опосредованной ErbB-сигнализации, известна в данной области (см., например, Hynes and Lane, Nature Reviews Cancer 5: 341-354, 2005).

Примеры активирующих с-Met мутаций включают точечные мутации, мутации делеции, мутации вставки, инверсии или амплификации генов, которые приводят к усилению по меньшей мере одной биологической активности белка с-Met, такой как повышение тирозинкиназной активности, формирование гомодимеров или гетеродимеров рецепторов, улучшение связывания с лигандом и т.п. Мутации могут локализоваться в любой части гена с-Met или регуляторной области, связанной с геном, например мутации в киназном домене с-Met. Примеры активирующих с-Met мутаций представляют собой мутации по положениям остатков N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 и E168. Способы определения мутаций или амплификаций генов EGFR и с-Met хорошо известны.

Примеры видов рака, поддающихся лечению посредством биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с с-Met, включают виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), легочную аденокарциному, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, 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, тестикулярный рак, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени или спорадическую или наследственную папиллярную почечную карциному (PRCC).

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с с-Met и блокирующие связывание HGF с с-Met,



можно использовать для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды рака, поддающиеся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с c-Met, включают виды, связанные со сверхэкспрессией c-Met. Примеры видов рака, поддающихся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, включают виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, 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, тестикулярный рак, рак желудка и рак тимуса.

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR и блокирующие связывание EGF с EGFR, можно использовать для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды рака, поддающиеся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, включают виды, связанные со сверхэкспрессией EGFR, или их варианты. Примеры видов рака, поддающихся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, включают виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, 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, тестикулярный рак, рак желудка и рак тимуса.

В некоторых способах, описанных в настоящем документе, биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, можно использовать для лечения субъекта с раком, резистентным или с приобретенной резистентностью к лечению одним или более ингибиторами EGFR. Примеры ингибиторов EGFR, к которым рак может развивать резистентность, представляют собой антитела к EGFR цетуксимаб (Erbix®), пантинумумаб (Vectibix®), матузумаб, нимотузумаб, низкомолекулярные ингибиторы EGFR Tarceva®

(эрлотиниб), IRESSA (гефитиниб), ЕКВ-569 (пелитиниб, необратимый ингибитор тирозинкиназы EGFR), ингибиторы пан-ErbB и других рецепторных тирозинкиназ, лапатиниб (ингибитор EGFR и HER2), пелитиниб (ингибитор EGFR и HER2), вандетаниб (ZD6474, ZACTIMA™, EGFR, VEGFR2 и RET TKI), PF00299804 (дакомитиниб, необратимый пан-ErbB тирозинкиназный ингибитор), CI-1033 (необратимый пан-erbB тирозинкиназный ингибитор), афатиниб (BIBW2992, необратимый пан-ErbB тирозинкиназный ингибитор), AV-412 (двойной ингибитор EGFR и ErbB2), EXEL-7647 (ингибитор EGFR, ErbB2, GEVGR и EphB4), CO-1686 (необратимый мутант-селективный ингибитор тирозинкиназы EGFR), AZD9291 (необратимый мутант-селективный тирозинкиназный ингибитор EGFR) и НКI-272 (нератиниб, необратимый ингибитор EGFR/ErbB2). Способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения рака, резистентного или с приобретенной резистентностью к лечению гефитинибом, эрлотинибом, афатинибом, CO-1686, AZD9291 и/или цетуксимабом. Примеры биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменов FN3, связывающихся с EGFR, или доменов FN3, связывающихся с c-Met, которые можно использовать, представляют собой молекулы, описанные в настоящем документе, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137, 194-211, 32-49, 111-114, 212-223, 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-178 или 190-193.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения субъекта, больного раком, включающий введение нуждающемуся в лечении пациенту терапевтически эффективного количества биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, специфически связывающегося с c-Met, или домена FN3, специфически связывающегося с EGFR, в течение времени, достаточного для лечения рака, причем субъект является резистентным или с приобретенной резистентностью к лечению эрлотинибом, гефитинибом, афатинибом, CO-1686 (CAS №: 1374640-70-6), AZD9291 или цетуксимабом.

Для определения того, имеет ли субъект резистентность,

приобретенную резистентность или предрасположенность к приобретению резистентности к лечению ингибитором EGFR, можно использовать различные качественные и/или количественные способы. Симптомы, которые могут быть связаны с резистентностью к ингибитору EGFR, включают, например, ухудшение или отсутствие улучшения состояния здоровья пациента, увеличение размера опухоли, прекращение или замедление торможения роста опухоли и/или распространение раковых клеток в организме из одного места к другим органам, тканям или клеткам. Повторное появление или ухудшение различных симптомов, связанных с раком, также может быть показателем того, что у субъекта развилась резистентность или имеется предрасположенность к развитию резистентности к ингибиторам EGFR, таких как анорексия, когнитивные расстройства, депрессия, одышка, утомляемость, гормональные нарушения, нейтропения, боль, периферическая нейропатия и половые дисфункции. Симптомы, связанные с раком, могут варьироваться в зависимости от типа рака. Например, симптомы, связанные с раком шейки матки, могут включать аномальное кровотечение, нетипично сильные выделения из влагалища, боли в области таза, не связанные с нормальным менструальным циклом, боли в мочевом пузыре или при мочеиспускании и кровотечение в промежутке между нормальными менструальными периодами, после полового сношения, спринцевания или обследования органов таза. Симптомы, связанные с раком легких, могут включать устойчивый кашель, откашливание крови, нехватку дыхания, дыхание с присвистом и болью в груди, потерю аппетита, потерю веса без стремления к похудению и утомляемость. Симптомы рака печени могут включать потерю аппетита и веса, боли в брюшной полости, особенно в верхней правой части живота, которые могут отдавать в спину и плечо, тошноту и рвоту, общую слабость и утомляемость, увеличение печени, вздутие живота (асцит) и желтую окраску кожи и белков глаз (желтуха). Специалист-онколог может легко идентифицировать симптомы, связанные с конкретным типом рака.

Другие способы определения развития резистентности к ингибитору EGFR включают исследование фосфорилирования EGFR,

фосфорилирования ERK1/2 и/или фосфорилирования АКТ в раковых клетках, где повышенное фосфорилирование может быть показателем того, что субъект имеет приобретенную резистентность или предрасположенность к развитию резистентности к ингибитору EGFR. Способы определения фосфорилирования EGFR, ERK1/2 и/или АКТ хорошо известны и описаны в настоящем документе. Идентификация пациента с развившейся резистентностью к ингибитору EGFR может включать определение повышенного уровня экспрессии c-Met или повышенной активности c-Met, например, связанной с повышенным уровнем циркулирующего HGF, активирующей мутацией гена c-Met или амплификацией гена c-Met.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения NSCLC у пациента с опухолью NSCLC или с метастазированием опухоли, имеющего активирующую EGFR мутацию или амплификацию гена EGFR, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met.

Биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, можно использовать для лечения немелкоклеточного рака легких (NSCLC), включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному и крупноклеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления клетки NSCLC имеют эпителиальный фенотип. В некоторых вариантах осуществления NSCLC имеет приобретенную резистентность к лечению с использованием одного или более ингибиторов EGFR.

В NSCLC конкретные мутации гена EGFR связаны с высокой частотой ответа (70-80%) на ингибиторы тирозинкиназы EGFR (EGFR-TKI). С чувствительностью к EGFR-TKI связывается делеция 5 аминокислот в экзоне 19 или точечная мутация L858R в EGFR (Nakata and Gotoh, Expert Opin Ther Targets 16 :771-781, 2012). Такие мутации приводят к лиганд-независимой активации киназной активности EGFR. Активирующие EGFR мутации наблюдаются у 10-30% пациентов с NSCLC, и они значительно более распространены у

восточных азиатов, женщин, никогда не куривших людей и пациентов с гистологией, характерной для аденокарциномы (Janne and Johnson Clin Cancer Res 12(14 Suppl): 4416s-4420s, 2006). Амплификация гена EGFR также сильно коррелирует с ответом на лечение EGFR-TKI (Cappuzzo et al., J Natl Cancer Inst 97:643-55, 2005).

Хотя большинство пациентов с NSCLC с мутациями EGFR изначально отвечают на терапию EGFR-TKI, практически у всех развивается резистентность, предотвращающая устойчивый ответ. У 50-60% пациентов резистентность развивается из-за точечной мутации второй локализации в киназном домене EGFR (T790M). Почти в 60% всех опухолей, ставших резистентными к ингибиторам тирозинкиназы EGFR, увеличивается экспрессия c-Met, амплифицируется ген c-Met или увеличивается уровень единственного известного лиганда, HGF (Turke et al., Cancer Cell, 17:77-88, 2010).

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения пациента с раком, включающий введение нуждающемуся в лечении пациенту терапевтически эффективного количества биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met, в течение времени, достаточного для лечения рака, причем рак связан с активирующей мутацией EGFR, амплификацией гена EGFR, активирующей мутацией c-Met или амплификацией гена c-Met.

В некоторых вариантах осуществления активирующая EGFR мутация представляет собой замену G719A, G719X (X представляет собой любую аминокислоту), L861X (X представляет собой любую аминокислоту), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P или T790M, делецию E746-A750, делецию R748-P753, вставку Ala (A) между M766 и A767, вставку Ser, Val и Ala (SVA) между S768 и V769 и вставку Asn и Ser (NS) между P772 и H773.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения пациента с раком, включающий введение нуждающемуся в лечении пациенту терапевтически

эффективного количества биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met, в течение времени, достаточного для лечения рака, причем рак связан с мутацией EGFR L858R, T790M или делецией остатков E746-A750 (del (E746, A750)), амплификацией EGFR или амплификацией c-Met.

В некоторых вариантах осуществления рак связан с EGFR дикого типа и c-Met дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления рак связан с EGFR дикого типа амплификацией c-Met.

В некоторых вариантах осуществления рак связан с мутациями в EGFR L858R и T790M и c-Met дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления рак связан с делецией в EGFR del (E764, A750) и c-Met дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления рак связан с делецией в EGFR del (E764, A750) и амплификацией c-Met.

В некоторых вариантах осуществления рак связан с делецией в EGFR del (E764, A750), амплификацией EGFR и амплификацией c-Met.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет NSCLC, связанный с мутациями в EGFR L858R и T790M и c-Met дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет NSCLC, связанный с амплификацией EGFR и c-Met дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет NSCLC, связанный с амплификацией EGFR и амплификацией c-Met.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет NSCLC, связанный с делецией в EGFR del (E764, A750) и c-Met дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет NSCLC, связанный с делецией в EGFR del (E764, A750) и амплификацией c-Met. Амплификацию EGFR или c-Met можно оценивать стандартными способами, например путем определения количества копий гена EGFR или c-Met способом Саузерн-блоттинга, флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) или сравнительной геномной гибридизацией (CGH).

Термины «лечить» или «лечение» обозначают как терапевтическое воздействие, так и профилактические или превентивные меры, при которых целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например развития или распространения рака. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желательные клинические результаты включают, без ограничений, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию состояния (т.е. отсутствие ухудшения), задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное улучшение состояния и ремиссию (полную или частичную), как определяемые, так и неопределяемые. «Лечение» также может обозначать продление срока жизни относительно ожидаемого при отсутствии лечения. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают субъектов, уже имеющих состояние или расстройство, а также субъектов, имеющих предрасположенность к состоянию или расстройству, или субъектов, у которых состояние или расстройство необходимо предотвратить.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес пациента, и способности биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met, вызывать у пациента желаемый ответ. Примеры показателей эффективности EGFR/c-Met-терапии, которые могут снижаться или ослабевать при резистентности, включают, например, улучшение состояния здоровья пациента, уменьшение или сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие

метастазирования раковых клеток в другие места в организме.

#### Введение/фармацевтические композиции

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, включающие биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество домена или молекулы в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителям, адъювантам, эксципиентам или носителю, вместе с которыми вводится активное соединение. Такой носитель может быть жидким, таким как, например, 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 использовать 0,4% соляной раствор и 0,3% раствор глицина. Указанные растворы стерильны и по существу не содержат твердых примесей. Стерилизацию проводят с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как агенты, необходимые для контроля и изменения pH, стабилизаторы, загустители, увлажнители и красители и т.п. Концентрация молекул настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно по меньшей мере приблизительно 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 публикации 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, стр. 691-1092, см. особенно стр. 958-989.

Способ введения для терапевтического применения биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменов FN3, связывающихся с EGFR, или доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с c-Met, может представлять собой любой подходящий способ, доставляющий агент к хозяину, такой как парентеральное введение, например внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное или подкожное, легочное; трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), введение с использованием состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, частицы; и введение содержимого в шприце, имплантируемом устройстве, осмотическом насосе, кассете, микронасосе; или другие способы, известные опытным практикам и специалистам в данной области. Специфическое введение в область 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, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Таким образом, фармацевтическую композицию настоящего изобретения для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной воды буфера и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мг, например от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг, или более предпочтительно - от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг домена FN3 настоящего изобретения.

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3,

связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно вводить пациенту любым подходящим способом, например парентерально, путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсным методом, внутримышечно, или подкожно, или интраперитонеально. Внутривенную инфузию можно проводить в течение всего 15 минут, но чаще – в течение 30 минут, 60 минут, 90 минут или даже 2 или 3 часов. Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, также можно вводить непосредственно в область заболевания (например, в саму опухоль). Доза, вводимая пациенту с раком, достаточна для того, чтобы облегчить или по меньшей мере частично затормозить подвергаемое лечению заболевание («терапевтически эффективное количество»), и может иногда составлять от 0,1 до 10 мг/кг веса тела, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Можно обеспечивать фиксированную разовую дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может зависеть от площади поверхности тела пациента, например 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м<sup>2</sup>. Для лечения рака обычно вводят от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить 10, 12, 20 или более доз. Введение биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменов FN3, связывающихся с EGFR, или доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с c-Met, можно повторять через сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или больший срок. Также возможны повторные курсы лечения в виде хронического применения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе.

Например, фармацевтическую композицию биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменов FN3, связывающихся с EGFR, или доменов FN3 настоящего

изобретения, связывающихся с c-Met, для внутривенной инфузии можно получить таким образом, чтобы она содержала приблизительно 200 мг стерильного раствора Рингера и от приблизительно 8 мг до приблизительно 2400 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 1600 мг или от приблизительно 400 мг до приблизительно 800 мг биспецифического EGFR/c-Met антитела для введения пациенту весом 80 кг. Способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

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

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно вводить пациенту одной дозой, или же введения могут повторяться, например, через одни сутки, двое суток, трое суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца или три месяца. Повторное введение можно проводить 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 молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом одновременно, последовательно или отдельно. Второй терапевтический агент может представлять собой

химиотерапевтический агент, противоангиогенный агент или цитотоксическое лекарственное средство. При использовании для лечения рака биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно использовать в комбинации с традиционными средствами лечения рака, такими как хирургия, радиотерапия, химиотерапия или их комбинации. Примеры агентов, которые можно использовать в комбинации с доменами FN3 настоящего изобретения, представляют собой антагонисты HER2, HER3, HER4, VEGF и белковые ингибиторы тирозинкиназ, такие как Iressa® (гефитиниб) и Tarceva (эрлотиниб).

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно вводить вместе с любым одним или более химиотерапевтическими лекарственными средствами или другими противораковыми средствами, известными специалистам в данной области. Химиотерапевтические средства представляют собой химические соединения, подходящие для лечения рака, и включают ингибиторы роста или другие цитотоксические агенты и включают алкилирующие средства, антиметаболические средства, ингибиторы микротрубочек, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, ингибиторы роста сосудов и т.п. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бисульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохион, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамин и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамин, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие

как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицины, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, куэламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболические средства, такие как метотрексат и 5-FU; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антиадренергические средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихион; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазихион; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиротепа; члены семейства таксоида или таксана, такие как паклитаксел (TAXOL®docetaxel (TAXOTERE®)) и его аналоги; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкрестин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутерин; кселода;

ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; ингибиторы рецепторных тирозинкиназ и/или ангиогенеза, такие как сорафениб (NEXAVAR®), сунитиниб (SUTENT®), пазопаниб (VOTRIENT™), тоцераниб (PALLADIA™), вандетаниб (ZACTIMA™), цедираниб (RECENTIN®), регорафениб (BAY 73-4506), акситиниб (AG013736), лестауртиниб (CEP-701), эрлотиниб (TARCEVA®), гефитиниб (IRESSA™), BIBW 2992 (TOVOK™), лапатиниб (TYKERB®), нератиниб (HKI-272) и т.п., и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых указанных выше соединений. Также данное определение включает антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют воздействие гормонов на опухоль, такие как антиэстрогеновые вещества, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); а также антиандрогенные средства, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любых указанных выше соединений. Другие традиционные химические соединения цитотоксического действия, описанные в публикации Wiemann et al., 1985, in Medical Oncology (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, также применимы к способам настоящего изобретения.

Примеры агентов, которые можно использовать в комбинации с биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменами FN3, связывающимися с EGFR, или доменами FN3, связывающимися с c-Met, включают ингибиторы тирозинкиназ, целенаправленные противораковые средства, такие как Iressa® (гефитиниб) и

Tarceva (эрлотиниб), и другие антагонисты HER2, HER3, HER4 или VEGF. Примеры антагонистов HER2 включают CP-724-714, HERCEPTIN™ (трастузумаб), OMNITARG™ (пертузумаб), TAK-165, лапатиниб (ингибитор EGFR и HER2) и GW-282974. Примеры антагонистов HER3 включают антитела к Her3 (см., например, патентную публикацию США № US2004/0197332). Примеры

антагонистов HER4 включают миРНК к HER4 (см., например, Maatta et al., Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006). Пример антагониста VEGF представляет собой бевацизумаб (Avastin™).

Когда низкомолекулярное соединение используется в комбинации с биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменами FN3, связывающимися с EGFR, или доменами FN3 настоящего изобретения, связывающимися с c-Met, его, как правило, вводят более часто, предпочтительно один раз в сутки, но также возможно 2, 3, 4 или более раз в сутки, а также раз в двое суток, раз в неделю или с каким-либо иным интервалом. Низкомолекулярные лекарственные средства часто вводят перорально, но также возможно парентеральное введение, например в/в инфузия, болюсный метод, подкожное или внутримышечное введение. Дозы низкомолекулярных лекарственных средств, как правило, могут составлять от 10 до 1000 мг или приблизительно 100, 150, 200 или 250 мг.

При введении биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменов FN3, связывающихся с EGFR, или доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с c-Met, в комбинации со вторым терапевтическим средством комбинацию можно использовать в течение любого удобного периода времени. Например, биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, и второй терапевтический агент можно вводить пациенту в те же сутки и даже в той же внутривенной инфузии. Однако биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, и второй терапевтический агент также можно вводить по чередующимся суткам или чередующимся неделям, двухнедельным периодам или месяцам и т.п. В некоторых способах биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, и второй терапевтический агент вводят достаточно близко друг к другу по времени, так что они

одновременно присутствуют (например, в сыворотке) в определенном количестве у получающего лечение пациента. В некоторых способах весь курс лечения биспецифической молекулой, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменом FN3, связывающимся с EGFR, или доменом FN3 настоящего изобретения, связывающимся с c-Met, состоит из введения нескольких доз в течение некоторого периода времени, за которым следует или которому предшествует курс лечения вторым терапевтическим агентом, также состоящий из введения нескольких доз. В некоторых способах лечение биспецифической молекулой, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменом FN3, связывающимся с EGFR, или доменом FN3 настоящего изобретения, связывающимся с c-Met, которые вводят во вторую очередь, начинают, если пациент имеет резистентность или у него выработалась резистентность ко второму терапевтическому агенту, вводимому изначально. Пациент может получить только один курс или множество курсов лечения биспецифической молекулой, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменом FN3, связывающимся с EGFR, или доменом FN3 настоящего изобретения, связывающимся с c-Met, и/или вторым терапевтическим агентом. Между введением биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met, и второго терапевтического агента можно использовать период восстановления длительностью 1, 2 или несколько суток или недель. Если подходящий режим лечения вторым терапевтическим агентом уже определен, данный режим можно использовать в комбинации с биспецифической молекулой, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменом FN3, связывающимся с EGFR, или доменом FN3 настоящего изобретения, связывающимся с c-Met. Например, препарат Tarceva® (эрлотиниб) принимают в виде пилюль 100 мг или 150 мг один раз в сутки, а Iressa® (гефитиниб) принимают в виде таблетки 250 мг один раз в сутки.

Биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR,



или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, необязательно в комбинации со вторым терапевтическим средством можно вводить вместе с любой формой радиационной терапии, включая внешнее облучение, радиационную терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), и любой формой радиохирургии, включая Gamma Knife, Cyberknife, Linac и внутритканевое облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон Gliasite), и/или с хирургическим лечением. Комбинация с радиационной терапией особенно уместна для рака головы и шеи и опухолей мозга.

Хотя настоящее изобретение описано в общем виде, варианты осуществления настоящего изобретения более подробно описаны в следующих примерах, которые, как подразумевается, не ограничивают объем формулы изобретения.

#### ПРИМЕР 1. Создание библиотек Tencon

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

Tencon:

Lpapknlvvsevtedsrlrlswtapdaafdsfliqqyqesekvgeainltvpgsersydl  
tglkpgt eytvsiygvkghrsnplsaftt (SEQ ID NO 1):

Создание библиотеки TCL1

Библиотека, разработанная с рандомизацией только петли FG в Tencon (SEQ ID NO: 1), TCL1, создавалась для применения с *cis*-дисплейной системой (Jacobs *et al.*, Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012). В данной системе создается одноцепочечная ДНК, содержащая последовательности для

промотора Tac, кодовую последовательность библиотеки Tencon, кодовую 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), как описано ниже.

Создание библиотеки TCL1 для использования с *cis*-дисплеем достигается путем последовательных циклов ПЦР с получением конечных линейных двухцепочечных молекул ДНК из двух половин; 5'-фрагмент содержит промотор и последовательности Tencon, тогда как 3'-фрагмент содержит ген *repA* и элементы *cis* и *ori*. Данные половины соединяют рестриктазным фрагментом с получением единого конструкта. Библиотека TCL1 была разработана для включения случайных аминокислот только в петлю FG в Tencon, KGGHRSN (SEQ ID NO: 86). При создании данной библиотеки использовали NNS-кодоны, что позволило встраивать 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 увеличения 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
		XXXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXXXXXXXX
TCL2	#####	#####S##

---

\*TAPDAAFD: остатки 22-28 последовательности SEQ ID NO: 1;

\*\*KGGHRSN: SEQ ID NO: 86

X обозначает вырожденные аминокислоты, кодированные 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 FG и введения необходимых рестрикционных сайтов для конечной сборки. Во-первых, в две стадии сформировали последовательность ДНК, содержащую промоторную последовательность и последовательность 5'-фрагмента петли FG Tenson. В качестве матрицы для ПЦР использовали ДНК, соответствующую полной последовательности гена Tenson, с праймерами POP2220 (SEQ ID NO: 2) и TC5'toFG (SEQ ID NO: 3). Полученный при данной 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 Tenson. Затем диверсифицировали петлю FG путем амплификации ДНК-продукта, полученного на первой стадии, 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 N NO: 10) или TCF12 (SEQ ID NO: 11), содержащими вырожденные нуклеотиды. Выполнили по меньшей мере по восемь ПЦР-реакций в объеме 100 мкл для каждой подбиблиотеки, чтобы минимизировать число циклов ПЦР и максимально увеличить разнообразие библиотеки. По меньшей мере 5 мкг данного ПЦР-продукта очистили из геля и использовали на следующей стадии с праймерами POP2222 (SEQ ID NO: 5) и POP2234 (SEQ ID NO: 12), выполнив в результате прикрепление 6xHis-тега и рестрикционного сайта NotI к 3'-концу последовательности Tenson. Данную реакцию ПЦР проводили с использованием всего пятнадцати циклов ПЦР и по меньшей мере 500 нг ДНК-матрицы. Полученный ПЦР-продукт очистили из геля, расщепили рестрикционным ферментом NotI и очистили на колонке

Qiagen.

3'-фрагмент библиотеки представляет собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая рестрикционный сайт PspOMI, кодирующую область *repA* и элементы *cis* и *ori*. ПЦР проводили с использованием плазмиды (pCR4Blunt) (Invitrogen), содержащей данный ДНК-фрагмент, с праймерами M13 Forward (прямой) и M13 Reverse (обратный). Полученные ПЦР-продукты расщепляли PspOMI в течение ночи и очищали из геля. Для лигирования 5'-части 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 разделили на двенадцать ПЦР-амплификаций и провели 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 составлял 32-34 мкг.

Для оценки качества библиотеки небольшую часть рабочей библиотеки амплифицировали с праймерами Tcon5new2 (SEQ ID NO: 15) и Tcon6 (SEQ ID NO: 16) и клонировали в модифицированном векторе pET с использованием безлигазного клонирования. Плазмидную ДНК трансформировали в компетентные клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) и 96 случайно выбранных колоний секвенировали с использованием праймера к промотору T7. Дублирующиеся последовательности не были обнаружены. В целом 70-85% клонов содержали полный промотор и кодирующую последовательность Tenson без мутации сдвига рамки считывания. Доля функционального секвенирования, с исключением клонов со стоп-кодонами, составила 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 преследовало две цели. Во-первых, библиотека была ориентирована на остатки, которые по прогнозу являются структурно значимыми для сворачивания и стабильности Tenson на основании анализа кристаллической структуры Tenson и/или гомологического моделирования. Например, положение 29 предназначалось только для набора гидрофобных аминокислот, поскольку данный остаток погружен в гидрофильную сердцевину свернутого Tenson. Вторым уровнем разработки была ориентация на распределение аминокислот на остатки, которые предпочтительно обнаруживаются в тяжелой цепи HCDR3 антител, для эффективного создания 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 обозначает следующее распределение: 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-кодона.

Таблица 3

Положение остатка*	Остатки дикого типа	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), которую химически синтезировали в виде библиотечного пула (Sloning Biotechnology). Данный пул ДНК содержал по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  разных элементов. В конец фрагмента был включен рестрикционный сайт BsaI для лигирования с *RepA*.

3'-фрагмент библиотеки представлял собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая 6xHis-тег, кодирующую область *repA* и *cis*-элемент. ДНК получили в ПЦР-реакции с использованием имеющейся 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 тем же ферментом. После лигирования в течение ночи ДНК очищали на колонке Qiagen и проводили количественную оценку ДНК путем измерения поглощения при длине волны 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 выполнили 72 реакции, в каждой из которых в качестве матрицы использовали 50 нг лигированных ДНК-продуктов. Общий выход рабочей библиотеки ДНК TCL2 составил приблизительно 100 мкг. Небольшую часть рабочей библиотеки подвергли субклонированию и секвенированию, как описано выше применительно к библиотеке TCL1. Дублирующие последовательности не были обнаружены. Приблизительно 80% последовательностей содержали полный промотор и кодирующую последовательность Tenson 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 домена FN3. Альтернативные поверхности, находящиеся с двух «сторон» доменов FN3 и имеющие другие формы, чем поверхности, образованные за счет одних петель, образованы с одной стороны домена FN3 двумя антипараллельными бета-тяжами, С и F бета-тяжами и петлями CD и FG, и в настоящем документе именуется поверхностью С-CD-F-FG.

Была создана библиотека, рандомизирующая альтернативную поверхность Tenson путем рандомизации выбранных открытых на поверхности остатков, относящихся к тяжам С и F, а также к частям петель CD и FG, как показано на Фиг. 1. Для получения библиотеки использовали вариант Tenson, Tenson27 (SEQ ID NO: 99), имеющий следующие замены по сравнению с Tenson (SEQ ID NO: 1): E11R L17A, N46V, E86I. Полное описание способов создания библиотеки приводится в патентной публикации США № US2013/0226834.

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

## Скрининг библиотеки

Для выбора доменов, связывающихся с EGFR, из библиотек TCL1 и TCL2 использовали *cis*-дисплей. Рекombинантный человеческий внеклеточный домен EGFR, слитый с IgG1 Fc (R&D Systems), биотинилировали стандартными способами и использовали для пэннинга (остатки 25-645 полноразмерного EGFR с последовательностью 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 1-кратного 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 мишеней EGFR-Fc в каждом цикле от 200 нМ до 50 нМ и увеличения 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 использованием олигонуклеотидов Tcon5new2 (SEQ ID NO: 15) и Tcon6 (SEQ ID NO: 16), субклонировали в вектор pET, модифицировали путем включения сайта безлигазного клонирования и трансформировали в клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) для экспрессии растворимого продукта в *E. coli* с использованием стандартных методик молекулярной биологии. К каждому домену FN3 добавляли генную последовательность, кодирующую С-концевой полигистидиновый тег, для обеспечения возможности очистки и определения. Культуры выращивали до достижения оптической плотности 0,6-0,8 в среде 2YT с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина в 96-луночных блоках с объемом 1 мл при 37°C, затем добавляли IPTG до концентрации 1 мМ и в данный 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 стутка 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 каталогу CRL-1555) обладают сверхэкспрессией EGFR  $\sim 2 \times 10^6$  рецепторов на клетку. Клетки высевали по 5000 на лунку на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давали им прикрепиться в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажной атмосфере с 5% содержанием  $\text{CO}_2$ . 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 повторах. Лизаты убирали и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл на лунку. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку конъюгированных антител к пентагистидину anti-penta His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза 150 мкл на лунку буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с использованием сканера 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 отобрали посредством скрининга 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 выявленных клонов домена FN3 связываться с EGFR в конкуренции с EGF с использованием клеток A431 параллельно со скрининговым анализом на связывание с A431. Клетки A431 высевали по 5000 на лунку на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку разбавленного 1:1000 лизата бактерий в течение 1 часа при комнатной температуре в трех повторях. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по каталогу E-3477) добавляли в каждую лунку до конечной концентрации 30 нг/мл и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл на лунку. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку 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 150 мкл на лунку буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 600 нм с использованием сканера Asimen eX3.

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

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 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 использованием планшетов PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare).

Анализ методом эксклюзионной хроматографии

Для оценки состояния агрегации доменов FN3, связывающихся с EGFR, использовали эксклюзионную хроматографию (SEC). Аликвоты (10 мкл) каждого очищенного домена FN3 вводили посредством шприца в колонку Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) со скоростью потока 0,3 мл/мин в подвижной фазе PBS pH 7,4. Элюирование с колонки отслеживали по поглощению на 280 нм. Домены FN3, показывающие высокий уровень агрегации в соответствии с данными SEC, исключали из дополнительного анализа.

Скорость диссоциации доменов FN3, связывающихся с EGFR, от EGFR-Fc

Для выбранных доменов FN3, связывающихся с EGFR, проводили скрининг для идентификации доменов с низкими константами скорости 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 протока 30 мкл/мин в PBS, содержащем 0,005% Tween-20. Плотности иммобилизации в среднем составляли приблизительно 1500 отвечающих единиц (RU) с менее чем 5% разбросом между разными каналами. Комплекс EGFR-Fc захватывался поверхностью с антителами к человеческому Fc IgG с плотностью приблизительно 600 RU в вертикальной ориентации лиганда. Все протестированные домены FN3 нормализовали к концентрации 1 мкМ и тестировали на связывание в горизонтальной ориентации. Для доменов FN3 использовали все 6 каналов для анализа, чтобы максимально увеличить производительность скрининга. Фазу диссоциации отслеживали в течение 10 минут при скорости протока 100 мкл/мин. В качестве отслеживания неспецифического связывания между анализатами и поверхностью с иммобилизованными IgG использовали сигналы связывания между пятнами и данные сигналы вычитали из всех сигналов связывания. Обработанные данные связывания локально аппроксимировали простой 1:1 моделью

связывания Ленгмюра для получения  $K_{off}$  по каждому домену FN3, связывающемуся с захваченными EGFR-Fc.

#### Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR

Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR, тестировали на их способность ингибировать стимулированное EGF фосфорилирование EGFR в клетках A431 в единственной концентрации. Фосфорилирование EGFR отслеживали с помощью набора EGFR phospho(Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Клетки высевали по 20 000 на лунку 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 давали им прикрепиться на ночь при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в течение ночи в условиях голодания в 100 мкл на лунку среды без FBS при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки обрабатывали по 100 мкл/лунку предварительно нагретой (37°C) средой без питательных веществ, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR, в концентрации 2 мкМ в течение 1 часа при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Контрольные клетки обрабатывали только средой без питательных веществ. Клетки стимулировали путем добавления и осторожного перемешивания 100 мкл на лунку подогретой (37°C) среды без питательных веществ, содержащей 100 нг/мл рекомбинантного человеческого EGF (R&D Systems, № по каталогу 236-EG) с конечной концентрацией 50 нг/мл EGF, а также 1 мкМ домена FN3, связывающегося с EGFR, и инкубирования при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 15 минут. Один набор контрольных лунок оставили без стимуляции в качестве отрицательного контроля. Среду полностью удаляли и клетки лизировали при помощи 100 мкл на лунку 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 прилагаемым блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1,5-2 часов. Затем планшеты промывали 4 раза, используя 200 мкл на лунку 1-кратного Tris Wash Buffer (Meso Scale Discovery). Аликвоты клеточных лизатов (30 мкл на лунку) 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 на лунку Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли по 25 мкл ледяного раствора антител для определения (Meso Scale Discovery), стараясь избежать появления пузырей. Планшеты инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа, затем промывали 4 раза по 200 мкл на лунку Tris Wash Buffer. Сигналы определяли путем добавления по 150 мкл на лунку буфера считывания (Meso Scale Discovery) и считывали на приборе SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с использованием заданных производителем по умолчанию параметров для данного анализа. Процентное ингибирование стимулированного EGF контрольного сигнала вычисляли для каждого домена FN3, связывающегося с EGFR.

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR измерили для 232 идентифицированных клонов из библиотек TCL1 и TCL2. 22 из данных 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 дополнительного определения биологических характеристик. Последовательности петель BC и FG данных клонов представлены в таблице 4. Восемь из девяти выбранных клонов имели общую последовательность в петле FG (HNVYKDTNMRGL; SEQ ID NO: 95), и между несколькими клонами наблюдали существенное сходство в последовательностях петель BC.

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	HNKYKDTNMRGL	95
P54AR4-17	19	TYDRDGYD	88	HNKYKDTNMRGL	95
P54AR4-47	20	WDPFSFYD	89	HNKYKDTNMRGL	95
P54AR4-48	21	DDPRGFYE	90	HNKYKDTNMRGL	95
P54AR4-73	22	TWPYADLD	91	HNKYKDTNMRGL	95
P54AR4-74	23	GYNGDHFD	92	HNKYKDTNMRGL	95
P54AR4-81	24	DYDLGVYD	93	HNKYKDTNMRGL	95
P54AR4-83	25	DDPWDFYE	94	HNKYKDTNMRGL	95
P54CR4-31	26	TAPDAAFD	85	LGSYVFEHDVM	96

ПРИМЕР 3. Определение характеристик доменов FN3, связывающихся с EGFR, которые ингибируют связывание EGF

Крупномасштабная экспрессия, очистка и удаление эндотоксина

Домены FN3, представленные в таблице 4, подвергли крупномасштабной экспрессии, чтобы получить больше материала для подробного определения характеристик. Культивируемую в течение ночи культуру, содержащую каждый из вариантов доменов FN3, связывающихся с EGFR, 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 длине волны 600 нм, культуру индуцировали путем добавления IPTG с конечной концентрацией 1 мМ и температуру снижали до 30°C. Через 4 часа клетки собирали путем центрифугирования и сгусток клеток хранили при -80°C столько, сколько необходимо.

Для лизирования клеток оттаявший сгусток повторно суспендировали в растворе 1X BugBuster® с добавлением 25 Е/мл Benzonase® (Sigma-Aldrich) и 1 тыс. Е/мл rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) в соотношении 5 мл BugBuster® на грамм сгустка. Лизирование проводили в течение 1 ч 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-мл колонку HisTrap FF, доведенную предварительно до равновесного состояния при помощи буфера А (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) с использованием хроматографической системы GE Healthcare ÄKTAexplorer 100s. Колонку промывали буфером А объемом 20 объемов колонки и дополнительно промывали 16% буфером В (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ NaCl, 250 мМ имидазола), 6 объемов колонки. Домены FN3 элюировали 50% буфером В, 10 объемов колонки, и затем градиентом 50-100% буфера В, 6 объемов колонки. Фракции, содержащие белок домена FN3, объединяли, концентрировали в концентраторе Millipore 10K MWC0 и фильтровали, после чего наносили на колонку HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare), доведенную до равновесия 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 обрабатывали 1 N 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 в соответствии с данными анализа индикаторной бумагой. 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 использованием кассет EndoSafe®-PTS™ и анализировали на сканере 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 ≤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 доменов FN3, связывающихся с EGFR, с EGFR-Fc (аффинность к EGFR-Fc)

Аффинность связывания выбранных доменов FN3, связывающихся с EGFR, с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR дополнительно характеризовали методами поверхностного плазмонного резонанса использованием прибора Proteon (BioRad). Схема анализа (подготовка чипа, захват EGFR-Fc) была аналогична описанной выше схеме применительно к анализу скорости диссоциации. Выбранные домены FN3, связывающиеся с EGFR, 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 домена FN3, связывающегося с EGFR, 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 ответных данных вычитали два набора данных фона: 1) сигналы между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между доменом FN3, связывающимся с EGFR, и поверхностью с иммобилизованными IgG; 2) сигналы буферных каналов для коррекции сдвига базовой линии из-за диссоциации захваченных комплексов EGFR-Fc со временем. Обработанные данные связывания для всех концентраций и каждого домена FN3 глобально аппроксимировали простой 1:1 моделью связывания Ленгмюра для получения кинетических констант ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и константы аффинности ( $K_D$ ). В таблице 5 представлены кинетические константы для каждого из конструктов с аффинностью от 200 пМ до 9,6 нМ.

Связывание выбранных доменов FN3, связывающихся с EGFR, с EGFR на клетках («анализ связывания с клетками A431»)

Клетки A431 высевали по 5000 на лунку на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давая им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR, (от 1,5 нМ до 30



мкМ) добавляли к клеткам (в объеме 50 мкл) в течение 1 часа при комнатной температуре в трех повторах. Супернатант убирали и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл на лунку. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку конъюгированных антител к пентагистидину anti-penta His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза 150 мкл на лунку буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с использованием сканера Acumen eX3. Построили 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>. В таблице 5 представлены значения EC<sub>50</sub> для каждого из конструктов в диапазоне от 2,2 нМ до >20 мкМ.

Ингибирование связывания EGF с EGFR на клетках с использованием отобранных доменов FN3, связывающихся с EGFR (анализ конкуренции с EGF на клетках A431)

Клетки A431 высевали по 5000 на лунку на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давая им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR, (от 1,5 нМ до 30 мкМ) добавляли к клеткам (50 мкл на лунку) в течение 1 часа при комнатной температуре в трех повторах. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по каталогу 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, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл на лунку. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку 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 150 мкл на лунку буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам



			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	н/о	н/о
P54AR4-47	20	2,51	8,6	7,1	295	44	39
P54AR4-48	21	7,78	12	9,8	170	н/о	н/о
P54AR4-73	22	0,197	9,4	4,6	141	83	73
P54AR4-74	23	н/о	77	н/о	н/о	н/о	н/о
P54AR4-81	24	н/о	84	121	н/о	н/о	н/о
P54AR4-83	25	0,255	2,2	1,8	18	5,9	9,2
P54CR4-31	26	0,383	> 20 000	55	179	1150	>3073

воздействием доменов FN3, связывающихся с EGFR. Клетки высевали по 500 на лунку (NCI-H292) или по 1000 на лунку (NCI-H322) на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (Nunc), в объем 100 мкл на лунку среды RPMI (Gibco), содержащей GlutaMAX™ и 10 мМ HEPES, с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco), давали клеткам прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали 5 мкл на лунку фосфатно-буферным соляным раствором (PBS), содержащим разные концентрации доменов FN3, связывающихся с EGFR. Контрольные клетки обрабатывали 5 мкл на лунку 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 определяли путем добавления 75 мкл на лунку 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 сканировали на сканере для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices) в режиме люминесценции с временем регистрации 0,5 секунды на лунку в сравнении с пустой средой. Построили график зависимости процента роста обработанных PBS клеток от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> в диапазоне от 5,9 нМ до 1,15 мкМ и от 9,2 нМ до >3,1 мкМ при использовании клеток NCI-H292 и NCI-H322 соответственно. В таблице 5 представлена сводная информация по биологическим свойствам доменов FN3, связывающихся с EGFR, для каждого анализа.

ПРИМЕР 4. Инженерная модификация доменов FN3, связывающихся с EGFR

Разработали подгруппу доменов FN3, связывающихся с EGFR, для увеличения конформационной стабильности каждой молекулы. Мутации L17A, N46V и E86I, для которых показано улучшение стабильности домена FN3 (описаны в патентной публикации США № US2011/0274623), вводили в клоны P54AR4-83, P54CR4-31 и P54AR4-37 путем синтеза ДНК. Новые мутанты, P54AR5-83v2, P54CR431-v2 и P54AR4-37v2, экспрессировали и очищали, как описано выше. Для оценки стабильности каждого из мутантов для сравнения с соответствующей исходной молекулой использовали дифференциальную сканирующую калориметрию в PBS. В таблице 6 представлено, что молекулу каждого варианта существенно стабилизировали со средним увеличением T<sub>m</sub>=18,5°C.

Таблица 6

Клон домена FN3	SEQ ID NO:	T <sub>m</sub> (°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. Выбор доменов фибронектина типа III (FN3), связывающихся с c-Met и ингибирующих связывание HGF

Пэннинг на человеческом c-Met

Проводили скрининг библиотеки TCL14 по отношению к биотинилированному внеклеточному домену человеческого c-Met (bt-c-Met) для идентификации доменов FN3, способных к

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

Выполняли дополнительные циклы селекции для идентификации доменов FN3 с улучшенной аффинностью. Вкратце, результат 5-го цикла получили, как описано выше, и подвергли дополнительным итеративным циклам выбора со следующими изменениями: инкубацию с bt-с-Met уменьшили с 1 часа до 15 минут, продолжительность захвата на гранулы снизили с 20 минут до 15 минут, концентрацию bt-с-Met уменьшили до 25 нМ (циклы 6 и 7) или 2,5 нМ (циклы 8 и 9) и провели дополнительную промывку в избытке небiotинилированного с-Met в течение 1 часа. Цель данных изменений заключалась в одновременном выборе соединений связывания с потенциально более высокой скоростью ассоциации и более низкой скоростью диссоциации, что позволяет получить по существу меньшее значение  $K_D$ .

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

использованием стандартных протоколов. Клетки собирали путем центрифугирования и затем лизировали с помощью Bugbuster NT (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 доменов FN3, ингибирующих связывание HGF с с-Met

Домены FN3, присутствующие в лизатах *E. coli*, подвергли скрининговому выбору по их способности ингибировать связывание HGF с очищенным внеклеточным доменом с-Met в биохимическом формате. Рекомбинантный человеческий химерный белок с-Met Fc (0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл на лунку) наносили на 96-луночные планшеты White Maxisorp Plates (Nunc) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты дважды промывали, используя 300 мкл на лунку трис-соляного буфера с 0,05% Tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich) в приборе для промывки планшетов Biotek. Планшеты для анализа блокировали раствором StartingBlock T20 (200 мкл на лунку, Thermo Fisher Scientific, г. Рокленд, штат Иллинойс) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) при встряхивании и снова дважды промывали 300 мкл TBS-T. Лизаты с доменами FN3 разбавляли в растворе StartingBlock T20 (от 1:10 до 1:100 000) с помощью роботизированной системы Hamilton STARplus. Лизаты (50 мкл на лунку) инкубировали на планшетах для анализа в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Без промывки планшетов добавили bt-HGF (1 мкг/мл в StartingBlock T20, 50 мкл на лунку, биотинилированный) на 30 минут при комнатной температуре при встряхивании. В контрольные лунки, содержащие лизаты Tencon27, добавляли раствор Starting Block T20 или разбавленный bt-HGF. Затем планшеты промывали четыре раза 300 мкл на лунку TBS-T и инкубировали с 100 мкл на лунку Streptavidin-HRP (1:2000 в TBS-T, Jackson ImmunoResearch, г. Вест Броув, штат Пенсильвания) в течение 30-40 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты снова промывали TBS-T четыре раза. Для формирования сигнала на планшет добавили хемилюминесцентный субстрат, POD

Chemiluminescence Substrate (50 мкл на лунку, Roche Diagnostics, г. Индианаполис, штат Индиана), полученный в соответствии с инструкциями производителя, и в течение приблизительно 3 минут зарегистрировали хемилюминесценцию на приборе Molecular Devices M5 с использованием SoftMax Pro. Процентное ингибирование определяли следующим способом:  $100 - ((RLU_{\text{образец}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}}) / (\text{среднее } RLU_{\text{контроль bt-HGF}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}})) * 100$ ). Значения процентного ингибирования 50% и 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 использованием планшетов PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare).

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

Выбранные домены FN3 дополнительно охарактеризовали в анализе на конкуренцию с HGF. Построили кривые «доза - ответ» для очищенных доменов FN3 с использованием описанного выше анализа (начальная концентрация 5 мкМ). Вычислили значения процентного ингибирования. Построили график зависимости % ингибирования от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определили 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 разбавлении 1:10 со значением IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,5 до 1500 нМ. В цикле 7 получили 39 уникальных последовательностей с активностью при разбавлении 1:100 и значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,16 до 2,9 нМ. В цикле 9 идентифицировали 66 уникальных последовательностей, где удачными считались варианты, проявлявшие активность при разбавлении 1:1000. В цикле 9 (таблица 8) наблюдали значения IC<sub>50</sub> всего 0,2 нМ.

Определение аффинности доменов FN3, связывающихся с c-Met,

с с-Met-Fc (аффинность к с-Met-Fc)

Для выбора доменов FN3, связывающихся с с-Met, определяли аффинности в соответствии с протоколом, описанным применительно к аффинностям доменов FN3, связывающихся с EGFR, из примера 3, за исключением того, что в экспериментах использовали слитный белок с-Met-Fc.

ПРИМЕР 6. Определение характеристик доменов FN3, связывающихся с с-Met и ингибирующих связывание HGF

Домены FN3 экспрессировали и очищали, как описано выше в примере 2. Эксклюзионную хроматографию и кинетический анализ проводили, как описано выше в примерах 1 и 2 соответственно. В таблице 7 представлены последовательности тяжа С, петли CD, тяжа F и петли FG, а также полная аминокислотная последовательность SEQ ID NO: для каждого домена.

Таблица 7

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



P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
---------------	----	------------	--------	------------	---------

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

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

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

Остатки петли FG соответствуют остаткам 75-81 указанной последовательности SEQ ID NO:

Связывание выбранных доменов FN3, связывающихся с с-Met, с с-Met на клетках («анализ связывания с клетками H441»)

Клетки NCI-H441 (№ по каталогу НТВ-174, Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния) высевали по 20 000 на лунку на покрытые поли-D-лизином черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, штат Калифорния) и давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Очищенные домены FN3 (50 мкл на лунку; 0-1000 нМ) добавляли к клеткам на 1 час при 4°C в двух повторах. Удаляли супернатанты и клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл на лунку, BD Biosciences, № по каталогу 554657). Клетки инкубировали с биотинилированными антителами к HIS (с разбавлением 1:160 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл на лунку, R&D Systems, № по каталогу BAF050) в течение 30 минут при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл на лунку), после чего инкубировали с конъюгированными антителами против мышей IgG1-Alexa 488 (с разбавлением 1:80 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл на лунку, Life Technologies, № по каталогу A21121) в течение 30 минут при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл на лунку) и оставляли в буфере для окрашивания при FACS (50 мкл на лунку). Определяли полную флуоресценцию на сканере Acumen eX3. Построили 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  $EC_{50}$ . Выявили, что домены FN3 показывают диапазон активностей связывания со значениями  $EC_{50}$  от 1,4 нМ до 22,0 нМ, как представлено в таблице 8.

Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования c-Met

Очищенные домены FN3 тестировали на способность ингибировать стимулированное HGF фосфорилирование c-Met в NCI-N441 с использованием набора c-Met phospho(Tyr1349) производства Meso Scale Discovery (г. Геттисберг, штат Мэриленд). Клетки высевали по 20 000 на лунку на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани, в среду RPMI 100 мкл на лунку (содержащую GlutaMax и HEPES, Life Technologies), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Life Technologies) и давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5%  $CO_2$ . Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в условиях голодания в бессывороточной среде RPMI (100 мкл на лунку) при 37°C, 5%  $CO_2$ . Затем к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI (100 мкл на лунку), содержащую домены FN3 в концентрации 20 мкМ и ниже, на 1 час при 37°C, 5%  $CO_2$ . Контрольные клетки обрабатывали только средой. Клетки стимулировали 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF (100 мкл на лунку, R&D Systems, № по каталогу 294-HGN) и инкубировали при 37°C, 5%  $CO_2$ , в течение 15 минут. Один набор контрольных лунок оставили без стимуляции в качестве отрицательного контроля. Среду полностью удаляли и лизировали клетки полным лизирующим буфером Complete Lysis Buffer (50 мкл на лунку, 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 прилагаемым блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты трижды промывали Tris Wash Buffer (200 мкл на лунку, Meso Scale Discovery). Клеточные лизаты (30 мкл

на лунку) 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 антител для определения (25 мкл на лунку, Meso Scale Discovery) на 1 час при комнатной температуре со встряхиванием. Планшеты снова четырехкратно промывали Tris Wash Buffer. Сигналы определяли путем добавления буфера считывания 150 (150 мкл на лунку, Meso Scale Discovery) и считывания на приборе SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с использованием заданных производителем по умолчанию параметров для данного анализа. Построили график зависимости сигнала электрохемилюминесценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определили значения IC<sub>50</sub> путем аппроксимации данных сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. Выявили, что домены FN3 ингибировали фосфорилирование c-Met со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 4,6 нМ до 1415 нМ, как представлено в таблице 8.

#### Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток

Ингибирование c-Met-зависимого роста клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток U87-MG (Американская коллекция типовых культур, № по каталогу HTB-14) после воздействия доменов FN3, связывающихся с c-Met. Клетки высевали по 8000 на лунку на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл на лунку с добавлением 10% FBS и давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через двадцать четыре часа среду отсасывали и к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI.

Таблица 8

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:					
P114AR5P74-A5	32	10,1	5,2	18,7	1078	464,4
P114AR5P75-E9	33	45,8	51,9	н/о	1415	1193,9
P114AR7P92-F3	34	0,4	0,2	1,5	8,3	2,7
P114AR7P92-F6	35	3,1	2,2	4,9	165,3	350,5
P114AR7P92-G8	36	1,0	1,6	5,9	155,3	123,9
P114AR7P92-H5	37	11,6	н/о	22,0	766,4	672,3
P114AR7P93-D11	38	н/о	н/о	2,3	16	14,4
P114AR7P93-G8	39	6,9	1	3,8	459,5	103,5
P114AR7P93-H9	40	3,3	2,9	12,9	288,2	269,9
P114AR7P94-A3	41	0,4	0,2	1,4	5	9,3
P114AR7P94-E5	42	4,2	0,7	3,4	124,3	195,6
P114AR7P95-B9	43	0,5	0,3	н/о	9,8	17,4
P114AR7P95-D3	44	0,3	0,2	1,5	4,6	1,7
P114AR7P95-D4	45	0,4	н/о	1,4	19,5	19,4
P114AR7P95-E3	46	1,5	н/о	3,2	204,6	209,2
P114AR7P95-F10	47	4,2	1,4	4,4	187,6	129,7
P114AR7P95-G7	48	20,0	н/о	11,3	659,3	692
P114AR7P95-H8	49	3,7	н/о	4,1	209,8	280,7

Через двадцать четыре часа после бессывороточной среды клетки обрабатывали бессывороточной средой, содержащей домены FN3, связывающиеся с с-Met (30 мкл/лунка). Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в течение 72 часов. Жизнеспособные клетки определяли путем добавления 100 мкл на лунку реагента CellTiter-Glo® reagent (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 10 минут. Планшеты сканировали на сканере для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices), настроенном на режим люминесценции с временем считывания 0,5 секунды на лунку. Построили 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 8 представлены значения IC<sub>50</sub> в диапазоне от 1 нМ до >1000 нМ.

Характеристики доменов FN3, связывающихся с с-Met, обобщены в таблице 8.

Термостабильность доменов FN3, связывающихся с с-Met

Для оценки стабильности каждого домена FN3 использовали дифференциальную сканирующую калориметрию в PBS. Результаты эксперимента представлены в таблице 9.

Таблица 9

Клон		Термостабильность (T <sub>m</sub> , °C)
Название	SEQ ID NO:	
P114AR5P74-A5	32	74,1
P114AR5P75-E9	33	н/о
P114AR7P92-F3	34	81,5
P114AR7P92-F6	35	76,8
P114AR7P92-G8	36	90,9
P114AR7P92-H5	37	87
P114AR7P93-D11	38	н/о
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 7. Получение и определение характеристик биспецифических EGFR/c-Met молекул

Получение биспецифических EGFR/c-Met молекул

Многочисленные комбинации доменов FN3, связывающихся с EGFR и c-Met, описанных в примерах 1-6, соединяли в биспецифические молекулы, способные связываться как с EGFR, так и с c-Met. Кроме того, были созданы и соединены в биспецифические молекулы домены FN3, связывающиеся с EGFR, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107-110, и домены FN3, связывающиеся с c-Met, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 111-114. Были созданы синтетические гены, кодирующие аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121 или 190-193 (таблица 10), с соблюдением следующего формата: домен FN3, связывающийся с EGFR, затем пептидный линкер, затем домен FN3, связывающийся с c-Met. Для обеспечения возможности очистки на С-конце поместили полигистидиновый тег. Помимо данных молекул, описанных в таблице 10, линкер между двумя доменами FN3 варьировали по длине, композиции последовательности и структуре в соответствии с тем, что представлено в таблице 11. Предусмотрена возможность использования ряда других линкеров для соединения таких доменов FN3. Биспецифические EGFR/c-Met молекулы экспрессировали и очищали из *E. coli*, как описано применительно к моноспецифическим EGFR или c-Met доменам FN3, с использованием стадий ИМАС и гельпроникающей хроматографии. Специалистам

очевидно, что биспецифические EGFR/c-Met молекулы могут содержать или не содержать иницирующий метионин. Примеры молекул с иницирующим метионином представляют собой молекулы с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ IN NO: 106, 118-121, 138-165, 190 и 192, и примеры молекул без иницирующего метионина представлены в SEQ ID NO: 50-72, 191 и 193. Присутствие иницирующего метионина в доменах FN3, связывающихся с EGFR, обеспечивает надлежащую активность; иницирующий метионин оказывает меньшее влияние на домены FN3, связывающиеся с c-Met.

Таблица 10

Биспецифическая EGFR/c-Met молекула		Домен FN3, связывающийся с EGFR		Домен FN3, связывающийся с c-Met		Линкер	
Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
ЕСВ1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ЕСВ2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ЕСВ3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ЕСВ4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ЕСВ5	54	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ЕСВ6	55	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ЕСВ7	56	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ЕСВ15	57	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ27	58	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ60	59	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ37	60	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ94	61	P54AR4-83v22	108	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ95	62	P54AR4-83v22	108	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ96	63	P54AR4-83v22	108	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ97	64	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ЕСВ106	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>	81
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>	81
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
ECB168	190	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95- C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB176	192	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P95- C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81

Таблица 11

Линкер	SEQ ID NO:	Длина линкера в аминокислотах	Структура
GS	78	2	Неупорядоченная
GGGGS	105	5	Неупорядоченная
(GGGGS) <sub>2</sub>	224	10	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 (EAAAК) <sub>5</sub> AAA	84	29	$\alpha$ -спиральная

Биспецифические EGFR/c-Met молекулы увеличивают эффективность в сравнении с моноспецифическими молекулами,



используемыми по отдельности, что указывает на авидность

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 авидностью (P54AR4-83v2), моноспецифического к c-Met домена FN3 с низкой авидностью (P114AR5P74-A5), смеси двух моноспецифических EGFR и к c-Met доменов FN3 или биспецифических EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3 с низкой авидностью к c-Met, соединенный с доменом FN3 с высокой авидностью 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 использованием соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

Домен FN3 с низкой авидностью к c-Met ингибировал фосфорилирование c-Met со значением IC<sub>50</sub>=610 нМ (Фиг. 4). Как и ожидалось, домен FN3, связывающийся с EGFR, не был способен ингибировать фосфорилирование c-Met, а смесь моноспецифических молекул выглядела идентично одному домену FN3, связывающемуся с c-Met. Однако биспецифическая EGFR/c-Met молекула ингибировала фосфорилирование c-Met со значением IC<sub>50</sub>=1 нМ (Фиг. 4), т.е. с улучшением эффективности более чем на 2 порядка относительно одной моноспецифической c-Met молекулы.

Потенциал биспецифической EGFR/c-Met молекулы в отношении увеличения ингибирования фосфорилирования c-Met и/или EGFR посредством эффекта авидности оценивали на множестве типов клеток с разными плотностями и соотношениями c-Met и EGFR (Фиг. 5). 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 домена FN3, связывающегося с EGFR, моноспецифического домена FN3, связывающегося с c-Met, или биспецифической EGFR/c-Met молекулы (ЕСВ5, состоит из P53A1R5-17v2 и P114AR7P94-A3). 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 использованием соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

На Фиг. 5 (А-С) показано ингибирование EGFR с помощью моноспецифического домена FN3, связывающегося с EGFR, в сравнении с биспецифической EGFR/c-Met молекулой в трех разных клеточных линиях. Для оценки avidности в анализе на фосфорилирование EGFR сравнили домен FN3, связывающийся с EGFR со средней аффинностью (1,9 нМ) (P53A1R5-17v2) с биспецифической EGFR/c-Met молекулой, содержащей тот же домен FN3, связывающийся с EGFR, соединенный с доменом FN3, связывающимся с c-Met с высокой аффинностью (0,4 нМ) (P114AR7P94-A3). В клетках H292 и H596 ингибирование фосфорилирования EGFR моноспецифическими и биспецифическими молекулами было сопоставимым (Фиг. 5А и 5В), вероятно, вследствие того, что данные клеточные линии имели высокое соотношение рецепторов EGFR к c-Met. Для проверки данной теории оценили ингибирование фосфорилирования EGFR в клетках NCI-H441, содержащих больше рецепторов c-Met, чем EGFR. Обработка клеток NCI-H441 биспецифической EGFR/c-Met молекулой снижала значение IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с EGFR, в 30 раз (Фиг. 5С).

Потенциал увеличения эффективности в случае биспецифической EGFR/c-Met молекулы оценивали в анализе фосфорилирования c-Met с использованием 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 с-Met биспецифической молекулой было увеличено по сравнению с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с с-Met, в 134 и 1012 раз соответственно (Фиг. 3D и 3E).

Было подтверждено, что увеличенная эффективность ингибирования фосфорилирования EGFR и с-Met биспецифическими EGFR/с-Met молекулами отражается в увеличенном ингибировании сигнализации и пролиферации. В данных экспериментах смесь доменов FN3, связывающихся с EGFR, и доменов FN3, связывающихся с с-Met, сравнивали с биспецифической EGFR/с-Met молекулой. Как описано в таблицах 12 и 13, значения  $IC_{50}$  для фосфорилирования ERK (таблица 12) и пролиферации клеток H292 (таблица 13) были снижены при обработке клеток биспецифической EGFR/с-Met молекулой в сравнении с моноспецифическими соединениями связывания. Значение  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования ERK биспецифической молекулой EGFR/с-Met было в 143 раза ниже, чем в случае смеси двух моноспецифических EGFR и с-Met доменов FN3, что демонстрирует влияние avidности на эффективность молекул в данном анализе. В таблице 12 моноспецифические домены FN3, связывающиеся с EGFR или с-Met, не полностью ингибируют активность, и, следовательно, показанные значения  $IC_{50}$  следует считать нижними пределами. Анализ пролиферации выполняли с использованием разных комбинаций доменов FN3, связывающихся с EGFR и с-Met, либо в виде смеси, либо соединенных в биспецифическую молекулу. Значение  $IC_{50}$  для ингибирования пролиферации при использовании биспецифической EGFR/с-Met молекулы было в 34-236 раз ниже, чем при использовании смеси моноспецифических исходных доменов FN3, связывающихся с EGFR и с-Met. Это подтверждает, что эффект avidности, наблюдавшийся на уровне рецепторов (Фиг. 4 и Фиг. 5), преобразуется в усиление ингибирования сигнализации в клетках (таблица 12) и пролиферации (таблица 13).

Таблица 12

Специфичность молекулы, содержащей домены FN3	Клон №	Тип	IC <sub>50</sub> (нМ) (фосфорилирование ERK)
EGFR	P54AR4-83v2	моноспецифическая молекула	>10 000
c-Met	P114AR5P74-A5	моноспецифическая молекула	2366
EGFR или c-Met	P54AR4-83v2+P114AR5P74-A5	смесь моноспецифических молекул	798,4
EGFR и c-Met	ECB1	биспецифическая молекула	5,6

Таблица 13

Домен FN3, связывающийся с EGFR (аффинность)	Домен FN3, связывающийся с c-Met (аффинность)	IC <sub>50</sub> для смеси моноспецифических молекул (нМ)	IC <sub>50</sub> для биспецифических молекул (нМ)	Кратность увеличения IC <sub>50</sub> для биспецифических молекул/смеси моноспецифических молекул
P54AR4-83v2 (0,26 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*: PK/PD

Для определения эффективности моноспецифических и биспецифических молекул, содержащих домены FN3, *in vivo*, создали опухолевые клетки, секретирующие человеческий HGF (мышинный HGF не связывается с человеческим c-Met). Человеческий HGF стабильно экспрессировался в клетках NCI-H292 при использовании инфицирования лентивирусом (лентивирусный ДНК-вектор, экспрессирующий человеческий HGF (№ по каталогу X16322), и набор для лентивирусной упаковки производства

Genescoroeia). После инфицирования экспрессирующие HGF-клетки выбирали, используя 4 мкг/мл пурамицина (Invitrogen). Человеческий белок HGF определяли в кондиционированной среде объединенных клеток с использованием 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. Измерение опухоли проводили дважды в неделю, пока объем опухоли не составил 150-250 мм<sup>3</sup>. Затем мышам вводили и/п одну дозу биспецифических EGFR/c-Met молекул (соединенных 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. Собирали образцы крови из сердца, помещая в 3,8% цитрат с ингибиторами протеаз. Сразу после сбора образцы крови центрифугировали и полученную плазму переносили в пробирки для образцов и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Опухоли взвешивали, разрезали на мелкие части и лизировали в пробирках Lysing Matrix A (LMA), содержащих буфер RIPA с ингибиторами протеаз/фосфатаз HALT (Pierce), 50 мМ фторида натрия (Sigma), 2 мМ активированного ортованадата натрия (Sigma) и 1 мМ PMSF (MesoScale Discovery). Лизаты извлекали из матрицы LMA и центрифугировали для удаления нерастворимого белка. Растворимый белок опухоли количественно определяли в анализе на BCA и разбавляли до эквивалентного содержания белка лизирующим буфером для опухоли. Фосфорилированные c-Met, EGFR и ERK измеряли при помощи планшета для анализа MesoScale Discovery (в соответствии с протоколом производителя и приведенным выше описанием).

На Фиг. 6 показаны результаты экспериментов. Каждая биспецифическая EGFR/c-Met молекула существенно снижала уровни фосфорилирования c-Met, EGFR и ERK как через 6 ч, так и через 72 ч. Данные, представленные на Фиг. 6, показывают важность одновременного ингибирования как c-Met, так и EGFR и то, как аффинность биспецифической EGFR/c-Met молекулы к каждому

рецептору влияет на ингибирование расположенной ниже ERK. Молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR с высокой аффинностью (P54AR4-83v2; показан на фигуре как элемент 8,  $K_D=0,26$  нМ), ингибировали фосфорилирование EGFR в большей степени, чем молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR со средней аффинностью (P53A1R5-17v2; показан на фигуре как элемент 17,  $K_D=1,9$  нМ), как через 6 ч, так и через 72 ч. Все четыре протестированные биспецифические молекулы полностью ингибировали фосфорилирование ERK через 6 часов, независимо от аффинности. Через 72 часа молекулы, содержащие домен, связывающийся с c-Met с высокой аффинностью (P114AR7P94-A3; показан на фигуре как элемент A3,  $K_D=0,4$  нМ), существенно ингибировали фосфорилирование ERK по сравнению с доменом FN3, связывающимся с c-Met со средней аффинностью (P114AR5P74-A5; показан на фигуре как элемент A5;  $K_D=10,1$  нМ; Фиг. 6).

Концентрацию каждой биспецифической EGFR/c-Met молекулы измеряли через 6 и 72 часа после введения в крови и в опухоли (Фиг. 7). Неожиданно было обнаружено, что биспецифическая молекула с доменом, связывающимся с EGFR со средней аффинностью (P53A1R5-17v2;  $K_D=1,9$  нМ), но с доменом FN3, связывающимся с c-Met с высокой аффинностью (P114AR7P94-A3;  $K_D=0,4$  нМ), достоверно больше других молекул накапливалась в опухоли через 6 часов, хотя отличие сходило к минимуму к 72 часам. Можно предположить, что клетки за пределами опухоли имеют на поверхности более низкий уровень экспрессии как EGFR, так и c-Met, и, следовательно, молекула со средней аффинностью к EGFR не связывается с нормальной тканью так прочно, как домен FN3, связывающийся с EGFR с высокой аффинностью. Следовательно, для связывания с опухолью остается больше свободного домена FN3, связывающегося с EGFR со средней аффинностью. Следовательно, определение соответствующих аффинностей к каждому рецептору может позволить найти терапевтическое средство со сниженной системной токсичностью и увеличенным накоплением в опухоли.

Исследования эффективности биспецифических EGFR/c-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 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 разными аффинностями к c-Met и EGFR. На Фиг. 8 показан благоприятный эффект ингибирования как c-Met, так и EGFR, поскольку наблюдали задержку роста опухоли у мышей, получавших домен FN3, связывающийся с EGFR с высокой аффинностью, по сравнению с доменом FN3, связывающимся с EGFR со средней аффинностью, когда домен FN3, связывающийся с c-Met, имел среднюю аффинность (незаштрихованные и заштрихованные треугольники, P54AR4-83v2-P114AR5P74-A5 в сравнении с P53A1R5-17v2-P114AR5P74-A5). Кроме того, данные показывают важность наличия домена FN3, связывающегося с c-Met с высокой аффинностью, поскольку биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR со средней или высокой аффинностью, но домен FN3, связывающийся с c-Met 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 EGFR/c-Met молекулы (ECB38) и низкомолекулярных ингибиторов кризотиниба (ингибитор c-Met) и эрлотиниба (ингибитор EGFR), цетуксимаба (антитела к EGFR), каждый по отдельности, а также комбинации кризотиниба и эрлотиниба оценивали в модели подкожной ксенотрансплантации клеток человеческого рака легких H292-HGF мышам SCID/Beige.

Клетки H292-HGF культивировали *in vitro* в среде RPMI1640 с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (10% об./об.) и L-глутамина (2 мМ) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки

регулярно пересеивали дважды в неделю с обработкой трипсином-ЭДТА. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для проведения инокуляции опухоли.

Таблица 14

Группа	N	Лечение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Плановый график	Реальный график
1	10	Контроль с носителем	0	и/п	QD×3 недели	QD×3 недели
2	10	биспецифическая 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
6	10	Цетуксимаб	1 мг/мышь	и/п	Q4d * 6	Q4d * 6

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

QD: один раз в сутки; Q4d: один раз в четверо суток; интервал для комбинации кризотиниба и эрлотиниба составлял 0,5 часа; объем введения корректировался с учетом веса тела (10 л/г); а: дозу не давали на 14-е сутки после разбиения на группы.

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). Лечение начинали, когда средний размер опухоли достигал 139 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемого образца и количества животных в каждой экспериментальной группе представлены в следующей таблице схемы эксперимента. Дату инокуляции опухолевыми клетками обозначали как сутки 0. В таблице 14 приведены экспериментальные группы.

Перед началом лечения всех животных взвесили и измерили объемы опухолей. Поскольку объем опухоли может влиять на эффективность любого заданного лечения, мышей распределяли по



группам по схеме рандомизированных блоков на основе объема опухолей. Это гарантирует, что все группы в исходном состоянии будут сопоставимы. Схему рандомизированных блоков применяли для распределения экспериментальных животных по группам. Во-первых, экспериментальных животных делили на однородные блоки в соответствии с исходным размером опухолей. Во-вторых, в пределах каждого блока проводили рандомизацию экспериментальных животных по типам лечения. Распределение экспериментальных животных с использованием схемы рандомизированных блоков гарантирует, что у всех животных имеется равная вероятность получения заданного типа лечения и, следовательно, уменьшается систематическая ошибка.

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

Конечный критерий оценки – можно ли замедлить рост опухоли или излечить мышей-носителей опухоли. Размер опухоли измеряли дважды в неделю в двух направлениях с использованием штангенциркуля и объем выражали в  $\text{мм}^3$  с использованием формулы:  $V=0,5 \cdot a \cdot b^2$ , где  $a$  и  $b$  представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли соответственно. Затем размер опухоли использовали для расчета 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, получавшей лечение, достигла значения  $1000 \text{ мм}^3$ , а  $C$  – время (в сутках), необходимое для того, чтобы опухоль среднего размера в контрольной группе достигла того же значения. Значение  $T/C$  (в процентах) представляло собой показатель противоопухолевой эффективности;  $T$  и  $C$  представляли собой средний объем опухоли в группе, получавшей лечение, и контрольной группе соответственно в заданные сутки. Полную регрессию опухоли (CR) определяли как уменьшение опухолей до размера, который не обнаруживается при

пальпации (62,5 мм<sup>3</sup>). 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 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 мм<sup>3</sup>, усыпляли. Исследование завершали спустя две недели наблюдения после введения конечной дозы.

В таблице 15 представлена сводная статистика, включающая среднее значение и стандартную погрешность среднего (СПС) в каждой группе и в каждой временной точке. Статистические анализы различий объемов опухоли между группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим индивидуальным сравнением с помощью тестов Геймса - Хоуэлла (не предполагающим равные дисперсии). Все данные анализировали с использованием пакета SPSS 18.0. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

Таблица 15

Сутки	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) а					
	Носитель	Биспецифическая EGFR/c-Met молекула 25 мг/кг	Кризотиниб 50 мг/кг	Эрлотиниб 50 мг/кг	Кризотиниб; Эрлотиниб 50 мг/кг; 50 мг/кг	Цетуксимаб 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 у группы, получавшей носитель (группа 1), достиг 1758 мм<sup>3</sup> на 23-и сутки после инокуляции опухоли. Лечение биспецифической EGFR/c-Met молекулой в дозе 25 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 мм<sup>3</sup>, значение Т/С=1%,  $p=0,004$  в сравнении с группой, получавшей носитель, на 23-и сутки).

Лечение кризотинибом в виде единственного агента в дозе 50 мг/кг (группа 3) не показало противоопухолевой активности; средний размер опухоли составил 2102 мм<sup>3</sup> на 23-и сутки (значение Т/С=120%,  $p=0,944$  по сравнению с группой, получавшей носитель).

Лечение эрлотинибом в качестве единственного агента в дозе 50 мг/кг (группа 4) показало небольшую противоопухолевую активность, но существенных отличий от группы, получавшей носитель, не было выявлено; средний размер опухоли составил 1122 мм<sup>3</sup> на 23-и сутки (значение Т/С=64%,  $p=0,429$  по сравнению с группой, получавшей носитель) с замедлением на 4 суток роста опухоли при 1000 мм<sup>3</sup> по сравнению с группой, получавшей носитель.

Комбинация кризотиниба (50 мг/кг, группа 5) и эрлотиниба (50 мг/кг, группа 5) показала существенную противоопухолевую активность; средний размер опухоли составил 265 мм<sup>3</sup> на 23-и сутки (Т/С=15%;  $p=0,008$ ) с замедлением на 17 суток роста опухоли при 1000 мм<sup>3</sup> по сравнению с группой, получавшей носитель.

Цетуксимаб в дозе 1 мг/мышь в качестве единственного агента (группа 6) показал существенную противоопухолевую активность; средний размер опухоли составил 485 мм<sup>3</sup> на 23-и сутки (Т/С=28%;  $p=0,018$ ) с замедлением на 17 суток роста опухоли при 1000 мм<sup>3</sup> по сравнению с группой, получавшей носитель. На Фиг. 9 и в таблице 16 представлена противоопухолевая активность различных терапевтических средств.

Таблица 16

Лечение	Размер опухоли (мм <sup>3</sup> ) на 23-и сутки	Т/С (%)	Т-С (сутки) при 1000 мм <sup>3</sup>	Значение Р

Носитель	1758±259	--	--	--
биспецифическая 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

В группе, получавшей носитель, наблюдали потерю веса от средней до высокой тяжести, что может быть связано с увеличением влияния опухоли; 3 мыши погибли, и 1 мышь усыпили при потере веса >20% к 23-м суткам. В группе 2 наблюдали небольшую токсичность биспецифической EGFR/c-Met молекулы; 3 мыши усыпили при потере веса >20% в период лечения; вес тела постепенно восстановился после отмены лечения в течение 2-недельного периода наблюдения. Более сильную потерю веса наблюдали в группе монотерапии кризотинибом или эрлотинибом по сравнению с группой, получавшей носитель, что указывает на связанную с лечением токсичность. Комбинация кризотиниба и эрлотиниба по существу переносилась на фазе введения, но к концу исследования наблюдали сильную потерю веса, что может быть связано с возобновлением быстрого роста опухоли при отсутствии лечения. Монотерапия цетуксимабом в настоящем исследовании хорошо переносилась; потерю веса наблюдали только к концу исследования из-за продолжения опухолевого роста.

Таким образом, биспецифическая EGFR/c-Met молекула в дозе 25 мг/кг (3 раза в неделю × 3 недели) обеспечивала устойчивый ответ в модели ксенотрансплантации клеток человеческого рака легких H292-HGF мышам SCID/Beige. Лечение перенесли 7 из 10 мышей, и сильную потерю веса наблюдали у 3 из 10 мышей. На Фиг. 9 показано влияние различных терапевтических средств на размер опухоли в моменты времени после лечения.

Пример 8. Период полужизни биспецифических EGFR/c-Met

молекул

Описано много 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 EGFR/c-Met молекулы модифицировали ПЭГ для увеличения гидродинамического радиуса путем присоединения свободного цистеина к С-концу молекулы. Чаще всего свободная тиольная группа цистеинового остатка используется для присоединения молекул ПЭГ, в которые ввели функциональные группы малеимида или йодацетимида с использованием стандартных способов. Для модификации белка можно использовать различные формы ПЭГ, включая линейные ПЭГ массой 1000, 2000, 5000, 10 000, 20 000 или 40 000 кДа. Разветвленные молекулы ПЭГ такой же молекулярной массы также можно использовать для модификации. Группы ПЭГ в некоторых случаях также можно присоединять при помощи первичных аминов в биспецифических EGFR/c-Met молекулах.

Помимо пегилирования период полужизни биспецифических EGFR/c-Met молекул продлевали путем формирования данных белков в виде слитных молекул с природным 3-спиральным связывающимся с сывороточным альбумин-связывающим доменом (ABD) или консенсусным альбумин-связывающим доменом (ABDCon). Данные белковые домены присоединяли к С-концу домена FN3, связывающегося с c-Met, посредством любого из линкеров, описанных в таблице 12. Домен ABD или ABDCon также можно помещать в первичную последовательность между доменом FN3, связывающимся с EGFR, и доменом FN3, связывающимся с c-Met. В некоторых случаях альбумин или вариант альбумина (SEQ ID NO: 189) присоединяли к биспецифической EGFR/c-Met молекуле, к С-концу домена FN3, связывающегося с c-Met.

Пример 9. Определение характеристик биспецифических EGFR/c-Met молекул

Выбранные биспецифические EGFR/c-Met молекулы охарактеризовали по аффинности как к EGFR, так и к c-Met по способности ингибировать аутофосфорилирование EGFR и c-Met и по влиянию на пролиферацию клеток HGF. Аффинность связывания биспецифических EGFR/c-Met молекул с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR и/или c-Met дополнительно охарактеризовали методами поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Proteon (BioRad) в соответствии с протоколом, описанным в примере 3. Результаты определения характеристик представлены в таблице 17.

Таблица 17

Молекула	KD (EGFR, нМ)	KD (c-Met, нМ)	Ингибирование pMet в клетках H441 (IC50, нМ)	Ингибирование pEGFR в клетках H292 (IC50, нМ)	H292-HGF Ингибирование пролиферации в индуцированных HGF клетках H292 (IC50, 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	11 372
ЕСВ109	17,3	2,1	26	432	573,6
ЕСВ168	0,4	0,32			3,1
ЕСВ158*	0,9	0,58			10,8

\*ЕСВ158 представляет собой молекулу ЕСВ168, конъюгированную с вариантом человеческого сывороточного альбумина С34S посредством линкера (GGGG<sub>2</sub>), последовательность SEQ ID NO: 224

Пример 10. Паратопы доменов FN3, связывающихся с EGFR и c-Met

Серию мутаций ввели в молекулу P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27) для определения остатков, наиболее важных для связывания с внеклеточным доменом EGFR. Для данного анализа в каждое положение аминокислоты в петлях BC и FG вводили мутацию в виде аланина по одной мутации за раз с получением 18 новых молекул.

Определяли аффинность связывания данных мутантов с EGFR методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью прибора Proteon. Результаты представлены в таблице 18. Мутации в 10 положениях приводили к падению аффинности связывания более чем в 10 раз, и это показывает, что данные положения способствуют связыванию с EGFR. Кратность изменения обозначает кратность изменения значения  $K_D$  варианта относительно исходной молекулы P54AR4-83v2. Комбинация остатков в петлях BC и FG образует поверхность связывания. Для 10 положений показано ослабление связывания с EGFR более чем в 10 раз, а для 5 положений показано ослабление связывания с EGFR более чем в 100 раз (D23, F27, Y28, V77, G85). Помимо P54AR4-83v2 связывающиеся с EGFR молекулы P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 и P54AR4-83v23 (SEQ ID NO: 21, 25, 107, 108 и 109 соответственно) имеют идентичные остатки в паратопных положениях, мутации в которых ослабляют связывание с EGFR более чем в 100 раз. Несколько полученных биспецифических EGFR/c-Met молекул содержат P54AR4-83v2, P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 или P54AR4-83v2 в качестве домена FN3, связывающегося с EGFR, как представлено в таблице 10.

Таблица 18

Молекула	SEQ ID NO:	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (нМ)	Кратность изменения
P54AR4-83v2	27	3,54E+05	4,98E-05	0,14	1
83v2 D22A	194	2,15E+05	3,01E-05	0,14	1
83v2 D23A	195	1,32E+05	4,20E-03	31,8	227
83v2 P24A	196	7,81E+04	2,19E-04	2,8	20
83v2 W25A	197	1,10E+05	1,69E-04	1,5	11
83v2 F27A	198	2,32E+04	5,56E-04	24	171
83v2 Y28A	199	4,36E+04	3,86E-03	88,5	632
83v2 H75A	200	1,67E+05	6,55E-04	3,9	28
83v2 N76A	201	2,08E+05	7,43E-05	0,36	3
83v2 V77A	202	7,88E+04	8,55E-03	108	771
83v2 Y78A	203	1,82E+05	5,14E-04	2,8	20
83v2 K79A	204	6,81E+05	2,83E-05	0,04	0
83v2 D80A	205	1,23E+05	5,46E-05	0,45	3

83v2 M83A	206	1,77E+05	2,74E-04	1,5	11
83v2 R84A	207	2,34E+05	1,37E-04	0,59	4
83v2 G85A	208	7,30E+04	2,20E-03	30,1	215
83v2 L86A	209	3,09E+05	1,17E-04	0,38	3
83v2 T81A	210	2,28E+05	8,38E-05	0,37	3
83v2 N82A	211	1,94E+05	9,67E-05	0,5	4

Аналогично серию мутаций внесли в предполагаемую поверхность взаимодействия с с-Met молекулы P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41), чтобы определить положения, критичные для связывания с мишенью. Данный анализ проводили в контексте биспецифической молекулы ECB15 (SEQ ID NO: 145) и вместо вышеописанного аланина использовали серин. Серин выбрали для уменьшения гидрофобности полученных мутантов. В таблице 19 описаны результаты SPR-анализа, где нумерация каждого положения мутаций дается относительно молекулы A3 (SEQ ID NO: 41). Показаны 7 положений, где связывание с с-Met ослабляется более чем в 10 раз. У мутантов M72S, R34S и I79S связывание не регистрировалось. Мутация F38S уменьшала связывание с с-Met более чем в 100 раз. Настоящие данные показывают, что положения, участвующие в связывании с с-Met, распределены по тяжу C, тяжу F, петле CD и петле FG. Кратность изменения обозначает кратность изменения значения  $K_D$  варианта относительно исходной молекулы P114AR7P95-A3. Помимо P114AR7P94-A3 молекулы, связывающиеся с с-Met, P114AR7P92-F3, P114AR7P95-D3, P114AR7P95-F10 и P114AR7P95-H8 (SEQ ID NO: 34, 44, 47 и 49 соответственно) имеют идентичные остатки в паратопных положениях, мутации в которых ослабляют связывание с с-Met более чем в 100 раз.

Таблица 19

Образец	SEQ ID NO:	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (нМ)	Кратность изменения
ECB15	145	3,51E+05	1,33E-04	0,4	1
A3 K78S	212	4,40E+05	1,50E-04	0,3	0,75
A3 G40S	213	1,85E+05	3,20E-04	1,7	4,25
A3 L39S	214	4,75E+05	1,27E-03	2,7	6,75
A3 V68S	215	3,29E+05	1,20E-03	3,6	9



A3 N70S	216	4,25E+05	2,49E-03	5,9	14,75
A3 P81S	217	3,21E+05	5,36E-04	1,7	4,25
A3 F36S	218	1,88E+05	5,12E-03	27,2	68
A3 W32S	219	2,89E+05	8,60E-03	29,8	74,5
A3 M72S	220	-	-	-	
A3 R34S	221	-	-	-	
A3 F38S	222	4,51E+04	3,23E-02	717	1792,5
A3 I79S	223	-	-	-	

Пример 11. Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток биспецифическими EGFR/c-Met молекулами

Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток оценивали на стандартной прикрепленной культуре, как описано в примерах 3 и 6, или в условиях слабого прикрепления. Для оценки выживаемости в условиях слабого прикрепления клетки высевали на 96-луночные планшеты со сверхнизким прикреплением (Corning Costar) в 50 мкл на лунку среды RPMI (Invitrogen), содержащей GlutaMAX и 25 мМ HEPES, с добавлением 1 мМ пирувата натрия (Gibco), 0,1 мМ NEAA (Gibco) и 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco), после чего давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали различными концентрациями антител (конечная концентрация 0,035–700 нМ), а также HGF (7,5 нг/мл, R&D Systems № по каталогу 294-HGN), затем инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в течение 72 часов. Некоторые лунки оставляли без обработки HGF или антителами в качестве контролей. Жизнеспособные клетки определяли с использованием реагента CellTiter-Glo® (Promega) и данные анализировали, как описано выше в разделе «Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток (анализ роста клеток NCI-H292 и NCI-H322)» в примере 3, за исключением того что лизаты переносили в непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (PerkinElmer), перед регистрацией люминесценции.

Клеточную линию классифицировали как хорошо отвечающую на биспецифическую EGFR/c-Met молекулу, если максимальное ингибирование роста клеток составляло >40%, а относительное

значение  $IC_{50} < 5$  мМ.

Ингибирующую активность ЕСВ15 оценивали на множестве клеточных линий: с EGFR дикого типа, амплифицированным или мутантным и с-Met дикого типа или амплифицированным. Молекула ЕСВ15 ингибировала рост опухолевых клеток клеточной линии, как представлено в таблице 20. ЕСВ15 также ингибировала рост клеточной линии NCI-H1975 с мутацией T790M, для которой показана резистентность к TKI, таким как эрлотиниб.

Таблица 20

Клеточная линия	Гистология	EGFR	c-Met
NCI-H1650	Бронхо-альвеолярная аденокарцинома	Del (E746, A750)	WT
SKMES-1	Плоскоклеточная	WT	WT
NCI-H1563	Аденокарцинома		
GLC-82	Аденокарцинома		
Calu-3	Аденокарцинома		
NCI-H1573	Аденокарцинома	AMP	AMP
NCI-H1435	NSCLC		
NCI-H1975	NSCLC	L858R; T790M	WT
NCI-H1666	Бронхо-альвеолярная аденокарцинома		
HCC2935	NSCLC	Del (E746-T751), S752I	
HCC4006	Аденокарцинома	Del (L747-E749), A750P	
H292	Мукоэпидермоидная	WT	WT
H322	Аденокарцинома	WT	WT
HCC827	Аденокарцинома	Del (E746, A750); AMP	WT
H596	Адено-плоскоклеточная смешанная	WT	Делеция в экзоне 14
H1869	Плоскоклеточная	WT	WT

WT: дикий тип

AMP: амплифицированный

Del: делеция

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Искусственная	Tencon	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAINLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	ДНК	Искусственная	POP2220	GGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT TTCTGAAGTTACC
3	ДНК	Искусственная	TC5'toFG	AACACCGTAGATAGAAACGGT
4	ДНК	Искусственная	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCC TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGGATCTACCATGCTG
5	ДНК	Искусственная	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	ДНК	Искусственная	TCF7	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	ДНК	Искусственная	TCF8	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
8	ДНК	Искусственная	TCF9	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	ДНК	Искусственная	TCF10	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
10	ДНК	Искусственная	TCF11	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
11	ДНК	Искусственная	TCF12	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT

12	ДНК	Искусственная	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATCCGCAGACAG
13	ДНК	Искусственная	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	ДНК	Искусственная	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	ДНК	Искусственная	Tcon5new 2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAAATGGTGATGGTGATGGT GACCACCGGTGGTGAATCCGCAGACAG
16	ДНК	Искусственная	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC
17	ДНК	Искусственная	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCATCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCCAAC TGATCTTACCAAAC
18	PRT	Искусственная	P53A1R5-17 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
19	PRT	Искусственная	P54AR4-17 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	Искусственная	P54AR4-47 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNBDHFDSDFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT

21	PRT	Искусственная	P54AR4-48 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	Искусственная	P54AR4-37 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	Искусственная	54AR4-74 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Искусственная	P54AR4-81 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQE SEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHN VYKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Искусственная	P54AR4-83 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Искусственная	P54CR4-31 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSY VFEHDVMLPLSAEFTT
27	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	Искусственная	P54CR4-31v2 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSY VFEHDVMLPLSAIFTT

29	PRT	Искусственная	P54AR4-73v2 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
30	ДНК	Искусственная	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC GAA AAA C
31	ДНК	Искусственная	TCON5 E861 short	GAG CCG CCG CCA CCG GTT TAA TGG TGA TGG TGA TGG TGA CCA CCG GTG GTG AAG ATC GCA GAC AG
32	PRT	Искусственная	P114AR5P74-A5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV VVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGG SISVPLSAIFTT
33	PRT	Искусственная	P114AR5P75-E9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFL RSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGG VSTPLSAIFTT
34	PRT	Искусственная	P114AR7P92-F3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVNIMGVKGGSI SHPLSAIFTT

35	PRT	Искусственная	P114AR7P9 2-F6	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGGL SVPLSAIFTT
36	PRT	Искусственная	P114AR7P9 2-G8	LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFVIRYFEFLG SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQILGVKGGYISI PLSAIFTT

37	PRT	Искусственная	P114AR7P9 2-H5	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLL GGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIMGVKGGTVS PPLSAIFTT
38	PRT	Искусственная	P114AR7P9 3- D11	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWGINGVKGGYI SYPLSAIFTT
39	PRT	Искусственная	P114AR7P9 3-G8	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTDLKPGTEYGVTINGVKGGRV STPLSAIFTT
40	PRT	Искусственная	P114AR7P9 3-H9	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
41	PRT	Искусственная	P114AR7P9 4-A3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
42	PRT	Искусственная	P114AR7P9 4-E5	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVNIMGVKGGRV SVPLSAIFTT
43	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-B9	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQILGVKGGSI SVPLSAIFTT
44	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-D3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGSI SYPLSAIFTT

45	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-D4	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQILGVKGGYI SIPLSAIFTT
46	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-E3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIMGVKGTTV SPPLSAIFTT
47	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5- F10	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTT AGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGSIS PPLSAIFTT
48	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-G7	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLS TGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGSIS PPLSAIFTT

49	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-H8	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV SKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGSIS SPPLSAIFTT
50	PRT	Искусственная	ECB1	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEW VGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGSSIS VPLSAIFTT



51	PRT	Искусственная	ECB2	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL PAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLG SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGKIS PPLSAIFTT
52	PRT	Искусственная	ECB3	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
53	PRT	Искусственная	ECB4	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLR SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGLVS TPLSAIFTT
54	PRT	Искусственная	ECB5	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGKI SPPLSAIFTT

55	PRT	Искусственная	ECB6	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
56	PRT	Искусственная	ECB7	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
57	PRT	Искусственная	ECB15	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNIMGVKGKISPPLSAIFTT
58	PRT	Искусственная	ECB27	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVWGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGISVPLSAIFTT

59	PRT	Искусственная	ECB60	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPKNLWSRV EDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
60	PRT	Искусственная	ECB37	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVWGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGKISVPLSAIFTT
61	PRT	Искусственная	ECB94	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
62	PRT	Искусственная	ECB95	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKISPPLSAIFTT

63	PRT	Искусственная	ECB96	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGISISPPLSAIFTT
64	PRT	Искусственная	ECB97	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILSVKGGISISPPLSAIFTT

65	PRT	Искусственная	ECB106	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
66	PRT	Искусственная	ECB107	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGEAIIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGISISPPLSAIFTT

67	PRT	Искусственная	ECB108	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSPPLSAIFTT
68	PRT	Искусственная	ECB109	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILSVKGGSPPLSAIFTT
69	PRT	Искусственная	ECB118	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKISPLSAIFTT
70	PRT	Искусственная	ECB119	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSPPLSAIFTT

71	PRT	Искусственная	ECB120	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGISPPPLSAIFTT
72	PRT	Искусственная	ECB121	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILSVKGGISPPPLSAIFTT

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

1 mrpsgtagaa llallaalcp asraleekkv cqgtsnkltq lgtfedhfls lqrmfnncev  
61 vlgngleityv qrnyslflk tiqevagyvl ialntverip lenlqiirgn myyensyala  
121 vlsnydankt glkelpmrnl qeilhgavrf snnpalcnve siqwrdivss dflsnmsmdf  
181 qnhlgscqkc dpscpngscw gageencqkl tkiicaqqcs grcrgkspsd cchnqcaagc  
241 tgpresdclv crkfrdeatc kdtcpplmly npttyqmdvn pegkysfgat cvkkcprnyv  
301 vtdhgscvra cgadsyemee dgvrkckkce gpcrkvcngi gigefkdsls inatnikhfk  
361 nctsisgdlh ilpvafrgds fthtppldpq eldilkvtke itgflliqaw penrtdlhaf  
421 enleiirgrt kqhggfslav vslnitslgl rslkeisdgd viisgnknlc yantinwkk1  
481 fgtsgqtki isnrgensck atgqvchalc spegcwgpep rdcvscrnvs rgrecvdkcn  
541 llegeprefv enseciqchp eclpqamnit ctgrgpnci qcahyidgph cvktcpagvm  
601 genntlvwky adaghvchlc hpnctygctg pglegcptng pkipsiatgm vgalllllv  
661 algiglfmrr rhivrkrtr rllqerelve pltpsgeapn qallrilket ekkikvlgs

721 gafgtvykgl wipegekvki pvaikelrea tspkankeil deayvmasvd nphvcrligi  
 781 cltstvqlit qlmpfgclld yvrehkdniq sqyllnwcvg iakgmnyled rrlvhrdlaa  
 841 rnlvktqgh vkitdfglak llgaekeyh aeggkvpikw malesilhri ythqsdvwsy  
 901 gvtvwelmtf gskpydgipa seissilekg erlpqppict idvymimvkc wmidadsrpk  
 961 freliiefsk mardpqrylv iggdermhlp sptdsnfyra lmdeedmddv vdadeylipq  
 1021 qgffsspsts rtpllsslsa tsnnstvaci 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, тенаццин-С

1 mgamtqllag vflaflalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf nhvyniklpv  
 61 gsqcsvdles asgekdlapp sepsesfgeh tvdgenqivf thriniprra cgcaaapdvk  
 121 ellsrleele nlvsslreqc tagagcclqp atgrldtrpf csgrgnfste ggcvccepww  
 181 kgpncsepec pgnchlrgrc idgqcicddg ftgedcsqia cpsdcndqgk cvngvcicfe  
 241 gyagadcsre icpvpcseeh gtcvdglcvc hdgfagddcn kplclnncyn rgrcvenecv  
 301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq  
 361 cvcdegfagv dcsekrpad chnrgrcvdg rceddghtg adcgelkcpn gcsghgrcvn  
 421 gqcvdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsmnc pndchqgrc  
 481 vngmrvddg ytgedcrdrq cprdcnrgl cvdgqcvced gftgpdcael scpndchggg  
 541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgg grcvdgqvic hegftgldeg qhscpsdcnn

601 lgqcvsgrci cnegysgedc sevppkdlv vtevteetvn lawdnemrvt eylvvytpth  
661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapeglkf  
721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifrnmn kedegaitks lrrpetsyrq tglapggeye  
781 islhivknnt rgpglkrvtt trldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgieltygik  
841 dvpqdrttid ltedenqysi gnlkpdteye vsllisrrgdm ssnpaketft tgldaprnlr  
901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt tltglrpgte  
961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpla kfdryrllys  
1021 lptgqwvgvq lprnttsyvl rglepgqeyn vlltaekgrh kskparvkas teqapelenl  
1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiiqvqe ankveaarnl tvpgslravd ipglkaatpy  
1141 tvsiygviiq yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwa lklnwtapeg ayeyffiqvq  
1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitirgvtq dfsttplsve vlteevpdmg  
1261 nltvtevsd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs meipglragt  
1321 pyvtlhgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dglrlnwtaa dnayehfviq  
1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls aeastakepe  
1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrllt tveynisgae rtahisglpp  
1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm asenafdsfl  
1561 vtvvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp lraeivteae  
1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvfdnf vlkirdtkkq sepleitlla pertrditgl  
1681 reateyeiel ygiskgrrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw raptaqvesf  
1741 rityvpitgg tpsmvtvdgt ktqtrlvkli pgveylvsii amkgfeesep vsgsfttald  
1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekvpe itrtrvsgntv eyaltdlepa  
1861 teytlrifae kgpqksstit akfttdldsp rdlstatevqs etalltwrpp rasvtgyllv



1921 yesvdgtvke vivgpdttsty sladlspsth ytakiqalng plrsnmiqti fttigllypf  
 1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaeal evfcdmtsdg ggvivflrrk ngrenfyqnw  
 2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaqqgy elrvdlrdhg etafavydkf svgdaktryk  
 2101 lkvegysgta gdsamayhngr sfstfdktd saitncalsy kgafwyrnch rvnlmgrygd  
 2161 nnhsqgvnwf hwkghehsiq faemklrpsn frnlegrrkr a

76	PRT	Искусственная	Fibcon	Ldaptdlqvtntvtdtsitvswtppsattityritytspngpgekelt vppsstsv titgltpgvewyslyalkdnqesppplvgtqtt
77	PRT	Искусственная	10-й домен FN3 фибронектина (FN10)	VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	Искусственная	Линкер	GSGS
79	PRT	Искусственная	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
80	PRT	Искусственная	Линкер	APAP
81	PRT	Искусственная	Линкер	APAPAPAPAP
82	PRT	Искусственная	Линкер	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	Искусственная	Линкер	AP

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	P54AR4-83 Петля BC	DDPWDFYE
95	PRT	Искусственная	FG loops of EGFR	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	Искусственная	FG loops of EGFR	LGSYVFEHDVM

97	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB97; P54AR4- 83v22	Atggttgccagcgccgaagaacctggttagttagcgaggttactgaggac agcgcgctctgagctgggacgatccgtgggcttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttctacgacctgaccggttgaagccgggt accgagtatacggtagcatctacggtgttcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccacc
98	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB15; P54AR4- 83v2	Atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgagga cagcgcctgagctgggacgaccgctgggcttctatgagtctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgg gtacggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagac accaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
99	PRT	Искусственная	tencon 27	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	Искусственная	библиотека TCL14	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXXGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

> SEQ ID NO: 101

PRT

Homo sapiens

c-Met

1 mkapavlapg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvmk yqlpnftaet piqnvilheh

61 hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdpcfpcqd csskanlsgg vwkdinmal  
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 rhfqscsqcl sappfvqcgw  
541 chdkcvrsee clsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf rrrnkfdlkk  
601 trvllgnesc tltlsestmn tlkctvgpam nkhnmsiii snghgttqys tfsyvdpvit  
661 sispkygpma ggtlltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk svnsilecy tpaqtistef  
721 avklkidlan retsifsyre dpivyehpt ksfistwwke plnivsflfc fasggstitg  
781 vgknlnsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsenseicct tpslqqlnlq lpktkaffm  
841 ldgilskyfd liyvhnvfk pfekevpmism gnenvleikg ndidpeavkg evlkgvgnksc  
901 enihlhseav lctvpndllk lnsehniewk qaisstvlqk vivqpdqnft gliagvvsis  
961 talllllgff lwlkkrkqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt temvsnesvd  
1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi sspllqntvh idlsalnpel  
1081 vqavqhvzig psslivhfne vigrghfgcv yhgtilldndg kkihcaavksl nritdigevs  
1141 qfltegiimk dfshpnvlsl lgiclrsegs plvvlpymkh gdlnfirne thnptvkdli  
1201 gfglqvakgm kylaskkfvh rdlaarnclm dekftvkvad fgldarmydk eyysvhnktg  
1261 aklpvkmal eslqtqkftt ksdvwsfgvl lwelmtrgap pypdvntfdi tvyllqgrrl  
1321 lqpeycpdpl yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrifaifs tfigehyvvh natyvvnkcv  
1381 apypslsse dnaddevdtr pasfwets

102	PRT	Homo sapiens	HGF	<p>QRKRNTIIEFKKSAKTTLIKIDPALKIK</p> <p>TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMS</p> <p>SGVKKEFGHEFDLYE</p> <p>NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSrTKSGLKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG</p> <p>KDLQENYCRNP</p> <p>RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTCTNGESYRGLMDH</p> <p>TESGKICQRWDHQTP</p> <p>HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIK</p> <p>TCADNTMNDTDVPL</p> <p>ETTECIQGQEGYRGTVNTWVNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKC</p> <p>KDLRENYCRNPDGS</p> <p>ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQT</p> <p>RSGLTCSMWDKNME</p> <p>DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPIS</p> <p>RCEGDTTPTIVNL</p> <p>DHPVISC AKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESW</p> <p>VLTA RQCFPSRD</p> <p>LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLAR</p> <p>PAVLDDFVSTDLP</p> <p>NYGCTIPEKTS CSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRG</p> <p>KVTLNESEICAG</p> <p>AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQH KMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFV</p> <p>RVAYYAKWIHKII</p> <p>LTYKVPQS</p>
-----	-----	--------------	-----	--

103	ДНК	Искусственная	> с-МЕТ-часть ECB97 P114AR7P95-C5v2	Ctgccggctccgaagaacttgggtggtgagccgtgttaccgaagatagc gcacgcctgagctggacggcaccggatgcgggcgttcgatagcttctgg attcgtatTTTTgagtttctgggtagcggtagaggcaattgttctgacggtgcc gggctctgaacgctcctacgatttgaccggctctgaaaccgggcaccga gtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggtagcatcagcccaccg ctgagcgcgatcttcacgactgggtggttc
104	ДНК	Искусственная	> с-МЕТ-часть ECB15 P114AR7P94-A3	Ctgccggcaccgaagaacctgggtgtcagccgtgtgaccgaggatag cgcacgtttgagctggaccgctccggatgcagcctttgacagcttctgga ttcgttactttgaatttctgggtagcggtagaggcagatcgttctgacggtgccg ggctctgaacgcagctatgatttgacgggcctgaagccgggtactgagt acgtggttaacatcatgggcgttaagggtggtaaaatcagcccgcatt gtccgcgatctttaccag
105	PRT	Искусственная	Линкер	GGGGS
106	PRT	Искусственная	ECB91	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltgkpgteyvtviygvhnvykdtnirglpIsaifttapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGISISPPLSAIFTT
107	PRT	Искусственная	P53A1R5-I7v2	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtviygvhnvykdtnmrglplsaiftt
108	PRT	Искусственная	P54AR4-83v22	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydltgkpgteyvtviygvhnvykdtnirglplsaiftt

109	PRT	Искусственная	P54AR4-83v23	Ipapknlwsevtedsarlswwdphafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglplsaiftt
110	PRT	Искусственная	P53A1R5-I7v22	Ipapknlwsevtedsarlswwdphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglplsaiftt
111	PRT	Искусственная	P114AR7P94- A3v22	Ipapknlwsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfevlgsgeaivltvpgsersyd Itglkpgteywnilgvkkggkispplsaiftt
112	PRT	Искусственная	P114AR9P121- A6v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGISISPPLSAIFTT
113	PRT	Искусственная	P114AR9P122- A7v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGISISPPLSAIFTT
114	PRT	Искусственная	P114AR7P95-C5v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGISISPPLSAIFTT
115	ДНК	Искусственная	ECB97	atggtgccagcgccgaagaacctggttagttagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtggcgcttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcagaaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttctctacgacctgaccggtttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccaccgcaccggc accggctccggctcctgccccgctgcccggctccgaagaacttgggtggtg agccgtggtaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccgga tgcggcggttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctgggtagcgggtga ggcaattgttctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccg gtctgaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcggttaaggg cggtagcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc

116	ДНК	Искусственная	ЕСВ15	<p>atgctgccagcccctaagaatctggctcgtgagcgaagtaaccgaggac  agcgcgccgctgagctgggacgaccgctgggcttctatgagtctttcct  gattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgac  cgtcccgggtagcgcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccggg  tacggagtacacgggtgtccatttacgggtgtcacaatgtgtataaagaca  ccaacatgctggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgctgc  gccagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgt  cagccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccgga  tgcagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggg  aggcgatcgttctgacgggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacg  ggcctgaagccgggtactgagtagctgggtaacatcatgggcgттаagg  gtggtaaaatcagcccgccattgtccgcgatctttaccacg</p>
117	PRT	Искусственная	Альбумин- связывающий домен	<p>tidewllkeakekaieelkkagitsdydflinkaktvegvnalkdeilka</p>
118	PRT	Искусственная	ЕСВ18	<p>mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltv  pgsersydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa  paplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt  vpgsersydltgkpgteyyvnilgvkgsisvplsaifttapapapapapl  aeakvlanreldkygvsdyknlinnaktvegkalldeilaalp</p>



119	PRT	Искусственная	ECB28	mlpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqygesekvgeaivltv pgsersydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydltgkpgteyyvnilgvkkggsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
120	PRT	Искусственная	ECB38	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqygesekvgeaivltv pgsersydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltv pgsersydltgkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
121	PRT	Искусственная	ECB39	mlpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqygesekvgeaivltv pgsersydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltv pgsersydltgkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
122	PRT	Искусственная	P53A1R5-17 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	Искусственная	P54AR4-17 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	Искусственная	P54AR4-47 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

125	PRT	Искусственная	P54AR4-48 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
126	PRT	Искусственная	P54AR4-73 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
127	PRT	Искусственная	54AR4-74 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWGYNQDHFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
128	PRT	Искусственная	P54AR4-81 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQY YQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSI YGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
129	PRT	Искусственная	P54AR4-83 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
130	PRT	Искусственная	P54CR4-31 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT
131	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2 с Met	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT

132	PRT	Искусственная	P54CR4-31v2 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
133	PRT	Искусственная	P54AR4-73v2 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
134	PRT	Искусственная	P53A1R5-I7v2 c Met	mlpapknlwsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytsiygvhnykdtnmrglplsaiftt
135	PRT	Искусственная	P54AR4-83v22 c Met	mlpapknlwsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytsiygvhnykdtnirglplsaiftt
136	PRT	Искусственная	P54AR4-83v23 c Met	mlpapknlwsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytsiygvhnykdtnirglplsaiftt
137	PRT	Искусственная	P53A1R5-I7v22 c Met	mlpapknlwsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytsiygvhnykdtnirglplsaiftt
138	PRT	Искусственная	ECB1 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYDEVWGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYYVNILGVKGGISVPLSAI FTT

139	PRT	Искусственная	ECB2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAF SFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
140	PRT	Искусственная	ECB3 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
141	PRT	Искусственная	ECB4 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFFIRYDEFLLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWVTILGVKGLVSTPLSAIFTT

142	PRT	Искусственная	ECB5 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWNIMGVKGKISPPLSAI FTT
143	PRT	Искусственная	ECB6 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWQIIGVKGGHISLPLSAI FTT
144	PRT	Искусственная	ECB7 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWQI I GVKGGHI SLPLSAI FTT
145	PRT	Искусственная	ECB15 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGKISPPLSAI FTT

146	PRT	Искусственная	ECB27 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVWGG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSI SVPLSAIFTT
147	PRT	Искусственная	ECB60 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPK NLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGS GEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGK KISPPLSAIFTT
148	PRT	Искусственная	ECB37 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVWGG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSI SVPLSAIFTT

149	PRT	Искусственная	ECB94 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWFAYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
150	PRT	Искусственная	ECB95 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWFAYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGS EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
151	PRT	Искусственная	ECB96 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWFAYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGG SIS PPLSAIFTT
152	PRT	Искусственная	ECB97 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWFAYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGG SIS PLSAIFTT

153	PRT	Искусственная	ECB106 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
154	PRT	Искусственная	ECB107 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGS EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	Искусственная	ECB108 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGG SIS PPLSAIFTT
156	PRT	Искусственная	ECB109 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGG SIS PLSAIFTT



157	PRT	Искусственная	ECB118 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	Искусственная	ECB119 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGS EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	Искусственная	ECB120 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGG SIS PPLSAIFTT
160	PRT	Искусственная	ECB121 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGG SIS PLSAIFTT

161	PRT	Искусственная	ECB91 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnirglpIsaifftapapapapLPAPK NLVVSrvTedsARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGsISPPLSAIFTT
162	PRT	Искусственная	ECB18 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltv pgsersydlgtglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
163	PRT	Искусственная	ECB28 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpg sersydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltvp gsersydlgtglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
164	PRT	Искусственная	ECB38 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvp gsersydlgtglkpgteyyvnmimgvkggkispplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp

165	PRT	Искусственная	ECB39 без Met	<p>Ipapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg  sersydltglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa  plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpg  sersydltglkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapaplae  akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp</p>
166	ДНК	Искусственная	ECB97 без Met	<p>ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc  gcgcgctctgagctgggacgatccgtgggcttctacgagagctttctgat  ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt  cccgggctccgagcgcttcctacgacctgaccggttgaagccgggtacc  gagtatacggtagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa  tatccgcggtctgcctctgagcgccatcttcaccaccgcaccggcaccg  gctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtagtgagcc  gtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccggatgcg  gcgttcgatagcttctggattcgctatcttgagtttctggtagcggtagggc  aattggtctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggctct  gaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgtaagggcggt  agcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtaggtg</p>

167	ДНК	Искусственная	ECB15 без Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgccccgctgagctgggacgaccctggtggcgttctatgagcttttctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacgggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcggtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgctgcg cagcgctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgta gccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccggatg cagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggtag gcatcgttctgacgggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacggg cctgaagccgggtagctgagtagctggttaacatcatgggcgtaagggtg gtaaaatcagcccgcattgtccgcatctttaccacg
168	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB97; P54AR4-83v22 Без Met	ttgccagcgcgaagaacctggtagttagcaggttactgaggacagc gcgctctgagctgggacgatccgtggcggttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccacc
169	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB15; P54AR4-83v2 Без Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgccccgctgagctgggacgaccctggtggcgttctatgagcttttctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacgggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcggtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc

170	PRT	Искусственная	ECB94 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKI SPPLSAIFFTTC
171	PRT	Искусственная	ECB95 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAIFFTTC
172	PRT	Искусственная	ECB96 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAIFFTTC
173	PRT	Искусственная	ECB97 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGSI PPLSAIFFTTC

174	PRT	Искусственная	ЕСВ106 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
175	PRT	Искусственная	ЕСВ107 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
176	PRT	Искусственная	ЕСВ108 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
177	PRT	Искусственная	ЕСВ109 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGSI PPLSAIFTTC

178	PRT	Искусственная	ЕСВ91 с С- концевым цистеином	mlpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglpIsaifttapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGKPGTEYWNILSVKGGISPPPLSAIFTTC
-----	-----	---------------	-------------------------------------	--

> SEQ ID NO: 179

PRT

Искусственная

Петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR  
HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL;

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

> SEQ ID NO: 180

PRT

Искусственная

Петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR  
LGSYVFENHDVML (SEQ ID NO: 180),

> SEQ ID NO: 181

PRT

Искусственная

Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR  
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

Домен FN3, связывающийся с EGFR

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX<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>DSFLIQYQSEKVGGEAINLTVP  
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX<sub>9</sub>RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

где



$X_1$  представляет собой A, T, G или D;  
 $X_2$  представляет собой A, D, Y или W;  
 $X_3$  представляет собой P, D или N;  
 $X_4$  представляет собой L или отсутствует;  
 $X_5$  представляет собой D, H, R, G, Y или W;  
 $X_6$  представляет собой G, D или A;  
 $X_7$  представляет собой A, F, G, H или D;  
 $X_8$  представляет собой Y, F или L; и  
 $X_9$  представляет собой M или I.

> SEQ ID NO: 183

PRT

Искусственная

Домен FN3, связывающийся с EGFR

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  
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

где

$X_1$  представляет собой A, T, G или D;  
 $X_2$  представляет собой A, D, Y или W;  
 $X_3$  представляет собой P, D или N;  
 $X_4$  представляет собой L или отсутствует;  
 $X_5$  представляет собой D, H, R, G, Y или W;  
 $X_6$  представляет собой G, D или A;  
 $X_7$  представляет собой A, F, G, H или D; и  
 $X_8$  представляет собой Y, F или L.

> SEQ ID NO: 184

PRT

Искусственная

Последовательность тяжа C и петли CD домена FN3,  
 связывающегося с c-Met

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

$X_{10}$  представляет собой W, F или V;  
 $X_{11}$  представляет собой D, F или L;  
 $X_{12}$  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

Последовательность тяжа F и петли FG домена FN3,  
 связывающегося с c-Met

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), причем

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 или L.

> SEQ ID NO: 186

PRT

Искусственная

Домен FN3, связывающийся с c-Met

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 или L.

> SEQ ID NO: 187

PRT

Искусственная

Домен FN3, связывающийся с EGFR, биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met

LPAPK<sub>1</sub>NLVVSX<sub>24</sub>VTX<sub>25</sub>DSX<sub>26</sub>RLSWDDPX<sub>27</sub>AFYX<sub>28</sub>SFLIQYQX<sub>29</sub>SEKVG<sub>30</sub>EAIIX<sub>30</sub>LTV  
PGSERSYDLTGLKPGTEYTVS<sub>31</sub>IYX<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, связывающийся с c-Met, биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met

LPAPK<sub>1</sub>NLVVSX<sub>34</sub>VTX<sub>35</sub>DSX<sub>36</sub>RLSWTAPDAAFD<sub>37</sub>FWIRYFX<sub>37</sub>FX<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>GX<sub>41</sub>AIX<sub>42</sub>  
LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV<sub>43</sub>VNIX<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.

> SEQ ID NO: 189

HSA-вариант C34S

DAHKSEVAHRFKDLGEEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES  
 AENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVD  
 VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDE  
 LRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH  
 GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV  
 ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV  
 FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK  
 CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP  
 KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD  
 DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

> SEQ ID NO: 190

ECB168

MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVG EAIVLTVPGSERSYD  
 LTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDTNIRGLPLSAI FT TAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTEDS  
 ARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILSVKGGSI  
 SPPLSAIFTT

> SEQ ID NO: 191

ECB168 без Met

LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVG EAIVLTVPGSERSYDL  
 TGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDTNIRGLPLSAI FT TAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSA  
 RLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILSVKGGSI  
 PPLSAIFTT

> 192

ЕСВ без имени, последняя в списке 17v2-C5v2

mLpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapaapapapap  
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP  
 GTEYVVNILSVKGGISISPPLSAIFTT

> 193

ЕСВ без имени, без met, последняя в списке 17v2-C5v2

Lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapaapapapap  
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP  
 GTEYVVNILSVKGGISISPPLSAIFTT

> SEQ ID NO: 194

83v2 D22A

Lpapknlvvsevtedsarlswadpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 195

> 83v2 D23A

Lpapknlvvsevtedsarlswdapwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 196

> 83v2 P24A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdawafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 197

> 83v2 W25A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpaafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 198

> 83v2 F27A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwaaesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 199

> 83v2 Y28A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafaesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 200

> 83v2 H75A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsygvnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 201

> 83v2 N76A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsygvhavykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 202

> 83v2 V77a

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsygvhnaykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 203

> 83v2 Y78A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsygvhnvakdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 204

> 83v2 K79A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsygvhnvyadtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 205

> 83v2 D80A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl

tglkpgteyvtvsiygvhnvykatnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 206

> 83v2 M83A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 207

> 83v2 R84A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 208

> 83v2 G85A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 209

> 83v2 L86A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 210

> 83v2 T81A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdanmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 211

> 83v2 N82A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtamrglplsaiftt

SEQ ID NO: 212

> K78S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggSispplsaiftt

SEQ ID NO: 213

> G40S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflSsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 214

> L39S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfefSgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 215

> V68S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 216

> N70S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvsimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 217

> P81S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkisSpplsaiftt

SEQ ID NO: 218

> F36S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirySeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 219

> W32S



lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfSiryfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 220

> M72S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnISgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 221

> R34S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiSyfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 222

> F38S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeSlgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 223

> I79S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl  
tglkpgteyvvnimgvkggkSspplsaiftt

SEQ ID NO: 224

PRT

Искусственная

Линкер

GGGSGGGGS

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Anderson, Mark  
 Attar, Ricardo  
 Diem, Michael  
 Hyun, Linus  
 Jacobs, Steven  
 King, Alastair  
 Klein, Donna  
 Moores, Sheri  
 O'Neil, Karyn  
 Picha, Kristen

<120> Связывающиеся с EGFR и c-Met молекулы с доменами фибронектина типа III

<130> JBI5014WOPCT

<140> Переуступка прав  
 <141> 2013-11-20

<150> 61/728,906  
 <151> 2012-11-21

<150> 61/728,914  
 <151> 2012-11-21

<150> 61/728,912  
 <151> 2012-11-21

<150> 61/782,550  
 <151> 2013-03-14

<150> 61/809,541  
 <151> 2013-04-08

<160> 224

<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  
ggaaacagga tctaccatgc tgccggcgcc gaaaaacctg gttgtttctg aagttacc 58

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

<220>  
<223> праймер

<400> 3  
aacaccgtag atagaaacgg t 21

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

<220>  
<223> праймер

<400> 4  
cggcggttag aacgcggcta caattaatac ataaccscat cccctgttg acaattaatc 60

atcggctcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataaaca tttcacacag gaaacaggat 120

ctaccatgct g 131

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

<220>  
<223> праймер

<400> 5  
cggcggttag aacgcggcta c 21

<210> 6  
<211> 66  
<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

<400> 6  
ggtagtggaat tccgacagaca 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 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

<400> 7  
gggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns 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 а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (38)..(39)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (41)..(42)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (44)..(45)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (47)..(48)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (50)..(51)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<400> 8

gggtggtgaat tccgcagaca gcgggsnnsnn 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 а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (29)..(30)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (32)..(33)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> прочие приложения

<222> (35)..(36)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<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

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (47)..(48)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (50)..(51)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (53)..(54)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<400> 9  
gggtggtgaat tccgcagaca gcgggsnnsnn 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 а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (31)..(32)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (34)..(35)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (37)..(38)  
<223> n представляет собой а, с, г 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 cagcggsnns 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  
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn 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

ggtggtgaat tccgcagaca g 81

<210> 13  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 13  
 cggcgggttag aacgcgggcta caattaatac 30

<210> 14  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 14  
 catgattacg csaagctcag aa 22

<210> 15  
 <211> 65  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 15  
 gagccgccgc caccggttta atggtgatgg tgatgggtgac caccggtggt gaattccgca 60  
 gasag 65

<210> 16  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 16  
 aagaaggaga accggtatgc tgccggcgcc gaaaaac 37

<210> 17  
 <211> 89  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 17  
 tttgggaagc ttctaggtct cggcgggtcac catcaccatc accatggcag cggttctagt 60  
 ctacgggcc caactgatct tcaccaaac 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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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

<210> 43  
 <211> 89  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Домен FN3, связывающийся с с-Met  
 <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> Домен FN3, связывающийся с с-Met  
 <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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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 с-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 c-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 с-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 c-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 с-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 c-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  
 785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn  
 805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg  
 820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro  
 835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala  
 850 855 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp  
 865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp  
 885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser  
 900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu  
 915 920 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr  
 930 935 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys  
 945 950 955 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln  
 965 970 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro  
 980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp  
995 1000 1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe  
1010 1015 1020

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu  
1025 1030 1035

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn  
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg  
1055 1060 1065

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp  
1070 1075 1080

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro  
1085 1090 1095

Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln  
1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro  
1115 1120 1125

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln  
1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala  
1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln  
1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys  
1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln  
1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala  
1205 1210

<210> 74

<211> 53

<212> PRT  
<213> 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  
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  
1 5 10 15

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> Петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR  
  
<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> Петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR  
<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

atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgaggтта ctgaggacag cgcgcgtctg

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 ccacc 285

<210> 98  
<211> 285  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, Связывающийся с EGFR, из ECB15; P54AR4-83V2

<400> 98  
atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcgccctg 60  
agctgggacg acccgtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120  
aaagttggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgcctcta cgatctgacc 180  
ggcctgaaac cgggtaccga 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> Xaa представляет собой любую аминокислоту

<220>  
<221> прочие приложения  
<222> (81)..(81)  
<223> Xaa 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 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  
 545 550 555 560 565

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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 103  
ctgccggctc cgaagaactt ggtggtgagc cgtggtaccg aagatagcgc acgcctgagc 60  
tggacggcac cggatgcggc gttcgatagc ttctggattc gctatdddga gtttctgggt 120  
agcggtgagg caattgttct gacggtgccg ggctctgaac gctcctacga tttgaccggt 180  
ctgaaaccgg gcaccgagta tgtggtgaac attctgagcg ttaagggcgg tagcatcagc 240  
ccaccgctga gcgcgatctt cagcactggt ggttgc 276

<210> 104  
<211> 267  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 104  
ctgccggcac cgaagaacct ggttgctcagc cgtgtgaccg aggatagcgc acgtdtgagc 60  
tggaccgctc cggatgcagc ctttgacagc ttctggattc gttacttdga attdctgggt 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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<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 cgccgaagaa cctggtagtt agcgaggtta ctgaggacag cgcgctctg 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  
atgctgccag ccctaagaa tctggctcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcgccctg 60  
agctgggacg acccggtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120  
aaagtggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgttccta cgatctgacc 180  
ggcctgaaac cgggtaccga gtacacggtg tccatttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240  
gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattttca ccaccgcgcc tgcgccagcg 300  
cctgcaccgg ctccgctgcc ggcaccgaag aacctggttg tcagccgtgt gaccgaggat 360

agcgcacggtt 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 с-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 c-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 c-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 с-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 с-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 с-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 c-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 ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60  
 tgggacgatc cgtgggcggt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120  
 gtcggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt 180  
 ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac 240  
 actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgcc attttcacca cgcaccggc accggctccg 300  
 gtcctgccc cgctgccggc tccgaagaac ttggtggtga gccgtgttac cgaagatagc 360  
 gcacgcctga gctggacggc accggatgcg gcgttcgata gcttctggat tcgctatatt 420  
 gagtttctgg gtagcgggta ggcaattggt ctgacggtgc cgggctctga acgctcctac 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 с-Met

<400> 167

ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60  
tgggacgacc cgtgggcggt ctatgagtct ttctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120  
gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcagc gtcctacga tctgaccggc 180  
ctgaaaccgg gtaccgagta cacgggtgtcc atttacgggtg ttcacaatgt gtataaagac 240  
accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca ccgcgcctgc gccagcgcct 300  
gcaccggctc cgctgccggc accgaagaac ctggttgtca gccgtgtgac cgaggatagc 360  
gcacgtttga gctggaccgc tccggatgca gcctttgaca gcttctggat tcgttacttt 420  
gaatttctgg gtagcgggtga ggcgatcgtt ctgacgggtc cgggctctga acgcagctat 480  
gatttgacgg gcctgaagcc gggactagc tacgtgggta acatcatggg cgttaagggg 540  
ggtaaaatca gcccgccatt gtccgcgac tttaccacg 579

<210> 168  
<211> 282  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR, из ECV97

<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 tctgagcgc attttcacca cc 282

<210> 169  
<211> 282  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR, из ECV15

<400> 169

ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60  
tgggacgacc cgtgggcggt ctatgagtct ttctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120

gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccc ggtagcgcgc gctcctacga tctgaccggc 180  
 ctgaaaccgg gtacggagta cacgggtgtcc atttacgggtg ttcacaatgt gtataaagac 240  
 accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca cc 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 c-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 c-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> Хаа может представлять собой Met или Ile  
  
<400> 179

His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Хаа 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 ВС 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> Хаа может представлять собой Ala, Thr, Gly или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (23)..(23)  
<223> Хаа может представлять собой Ala, Asp, Tyr или Trp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (24)..(24)  
<223> Хаа может представлять собой Pro, Asp или Asn

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (25)..(25)  
<223> Хаа может представлять собой Leu или отсутствовать

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (26)..(26)  
<223> Хаа может представлять собой Asp, His, Arg, Gly, Tyr или Trp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (27)..(27)  
<223> Хаа может представлять собой Gly, Asp or Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (28)..(28)  
<223> Хаа может представлять собой Ala, Phe, Gly, His или Asp

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (29)..(29)  
<223> Хаа 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 or 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, тиа 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> Хаа представляет собой Ile, Val или Leu

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (17)..(17)  
<223> Хаа 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> Xaa представляет собой Tyr, Trp, Ile, Val, Gly или Ala

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (70)..(70)  
<223> Xaa представляет собой Asn, Thr, Qln или Gly

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (72)..(72)  
<223> Xaa 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 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 представляет собой 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> Консенсусный домен FN3, связывающийся с с-Met, биспецифической EGFR/с-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> (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 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> 585  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> ВАРИАНТ

<222> (34)..(34)

<223> C34S

<400> 189

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu  
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln  
20 25 30

Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu  
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys  
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu  
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro  
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu  
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His  
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg  
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg  
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala  
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser  
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu  
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro  
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys  
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp  
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser  
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His  
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser  
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
580 585

<210> 190

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая EGFR/c-Met молекула

<400> 190

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> 191  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Биспецифическая EGFR/c-Met молекула

<400> 191

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> 192

<211> 194

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая EGFR/c-Met молекула

<400> 192

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

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe  
180 185 190

Thr Thr

<210> 193

<211> 193

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Биспецифическая EGFR/c-Met молекула

<400> 193

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 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> 194  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 194

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 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> 195  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 195

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 Ala 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> 196

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 196

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 Ala 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> 197

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 197

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 Ala 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> 198  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 198

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 Ala 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> 199  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 199

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 Ala 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> 200

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 200

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 Ala 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> 201

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

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

<400> 201

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 Ala 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> 202  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 202

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 Ala Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr



<210> 203  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 203

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 Ala Lys Asp  
 65 70 75 80

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

<210> 204  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 204

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 Ala Asp

65

70

75

80

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

<210> 205

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 205

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 Ala  
65 70 75 80

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

<210> 206

<211> 94

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с EGFR

<400> 206

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 Ala Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 207  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 207

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 Ala Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 208  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 208

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 Ala Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 209  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 209

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 Ala Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

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

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

<400> 210

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

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

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

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

<400> 211

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 Ala Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85 90

<210> 212  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с c-Met

<400> 212

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
                  85

<210> 213  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 213

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 Ser 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> 214  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 214

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 Ser 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> 215

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с c-Met

<400> 215

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 Ser 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> 216

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 216

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 Ser 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> 217

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 217

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

Ser Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85



<210> 218  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 218

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 Ser 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> 219  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 219

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 Ser  
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> 220  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 220

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 Ser Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 221  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 221

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 Ser 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> 222  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 222

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 Ser 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> 223  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен FN3, связывающийся с с-Met

<400> 223

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 Ser Ser  
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr  
85

<210> 224  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> линкер

<400> 224

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, причем домен FN3 выделен из библиотеки, разработанной на основе Tencon с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

2. Домен FN3 по п.1, причем домен FN3

a) 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 использованием 50 нг/мл человеческого EGF;

b) ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением  $IC_{50}$  от приблизительно  $1,8 \times 10^{-8}$  М до приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках A431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF;

c) связывается с человеческим EGFR с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, причем  $K_D$  измеряют в условиях, описанных в примере 3; или

d) связывается с человеческим EGFR с  $K_D$  от приблизительно  $2 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, причем  $K_D$  измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, как описано в примере 3.

3. Домен FN3 по п.1 или 2, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

4. Домен FN3 по любому из пп.1-3, причем домен FN3 связывается с EGFR при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам D23, F27, Y28, V77 и G85 последовательности P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27).

5. Домен FN3 по любому из пп.1-4, причем домен FN3 содержит

a) петлю FG, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180; и

b) петлю BC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

6. Домен FN3 по п.5, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183.

7. Домен FN3 по любому из пп.1-6, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 или 194-211.

8. Домен FN3 по п.7, причем домен FN3 содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1).

9. Домен FN3 по п.8, причем домен FN3 содержит одну или более замен, соответствующих заменам L17A, N46V и E86I в аминокислотной последовательности Tencon SEQ ID NO: 1.

10. Выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3 по п.3.

11. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.10.

12. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.1.

13. Способ получения домена FN3, который специфически связывается с EGFR, включающий культивирование выделенных клеток-хозяев по п.11 в условиях, способствующих экспрессии домена FN3, который специфически связывается с EGFR, и очистку домена FN3.

14. 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.

15. Домен FN3 по п.14, причем домен FN3

a) ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно  $1,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках NCI-N441 с использованием 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF;

b) ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> от приблизительно  $4 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1,5 \times 10^{-6}$  М при

измерении в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF;

с) связывается с человеческим с-Met с  $K_D$  менее чем приблизительно  $5 \times 10^{-8}$  М, причем  $K_D$  измеряют в условиях, описанных в примере 3; или

d) связывается с человеческим с-Met с  $K_D$  от приблизительно  $3 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-8}$  М, причем  $K_D$  измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, как описано в примере 5.

16. Домен FN3 по п.14 или 15, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 83% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

17. Домен FN3 по любому из пп.14-16, причем домен FN3 связывается с с-Met при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам R34, F38, M72 и I79 в P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

18. Домен FN3 по любому из пп.14-17, причем домен FN3 содержит

a) тяж C и петлю CD, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 184; и

b) тяж F и петлю FG, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185.

19. Домен FN3 по п.18, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186.

20. Домен FN3 по любому из пп.14-19, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 32-49, 111-114 или 212-223.

21. Домен FN3 по п.20, причем домен FN3 содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 аминокислотной последовательности Tencon SEQ ID NO: 1.

22. Домен FN3 по п.21, причем домен FN3 содержит одну или более замен, соответствующих заменам L17A, N46V и E86I в аминокислотной последовательности Tencon SEQ ID NO: 1.

23. Домен FN3 по любому из пп.14-22, причем домен FN3 выделяют из библиотеки, разработанной на основе

последовательности Tencon SEQ ID NO: 1.

24. Выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3 по п.16.

25. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.24.

26. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.25.

27. Способ получения домена FN3, специфически связывающегося с с-Met, включающий культивирование выделенных клеток-хозяев по п.26 в условиях, способствующих экспрессии домена FN3, специфически связывающегося с с-Met, и очистку домена FN3, специфически связывающегося с с-Met.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая домен FN3 по п.1 или 14 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Способ лечения субъекта, больного раком, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.28 нуждающемуся в лечении пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

30. Способ по п.29, в котором субъект резистентен или имеет приобретенную резистентность к лечению эрлотинибом, гефитинибом, афатинибом, CO-1686, AZD9192 или цетуксимабом.

31. Способ по п.29, в котором рак представляет собой рак эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), легочную аденокарциному, мелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, тестикулярный рак, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоклеточную карциному (HCC) или спорадическую или наследственную папиллярную почечную карциному (PRCC).

По доверенности



ФИГ. 1А

SEQ ID

NO:

```
18 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
19 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYD-RDGYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
20 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
21 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-RGFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
22 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
23 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
24 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGDHFDSDFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
25 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
27 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
29 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG
107 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
108 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
109 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-HAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
110 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
***** ***** :***** *****
```

```
18 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT (94)
19 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
20 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
21 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
22 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
23 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
24 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
25 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
27 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
29 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
107 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
108 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTT
109 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTT
110 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTT
***** . * : ***** **
```

ФИГ. 1В

SEQ ID  
NO:

```
26      LPAPKNLVSEVTEDSLRLS WTAP-DAAFD SFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG      (60)
28      LPAPKNLVSEVTEDSARLS WTAP-DAAFD SFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
***** ************ **

26      LKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHDVML PLSAEFTT      (94)
28      LKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHDVML PLSAIFTT
***** ********** **
```

ФИГ. 2

		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)	FXIXYEXXXX	GEAIVLTVP	GSERSYDLTG		(60)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTVSIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT	(89)
TCL14	(61)	LKPGTEY	XVXIXGV	KGGXXSX	PLSAIFTT	(89)

ФИГ. 3

SEQ ID

NO:

32 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)

33 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

34 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

35 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

36 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

37 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTG

38 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

39 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTD

40 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

41 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

42 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

43 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

44 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

45 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

46 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

47 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTG

48 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTG

49 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG

111 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

112 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

113 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTG

114 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

\*\*\*\*\*  
\*\*\* \*\* \* . \* :\*\*\*\*\*

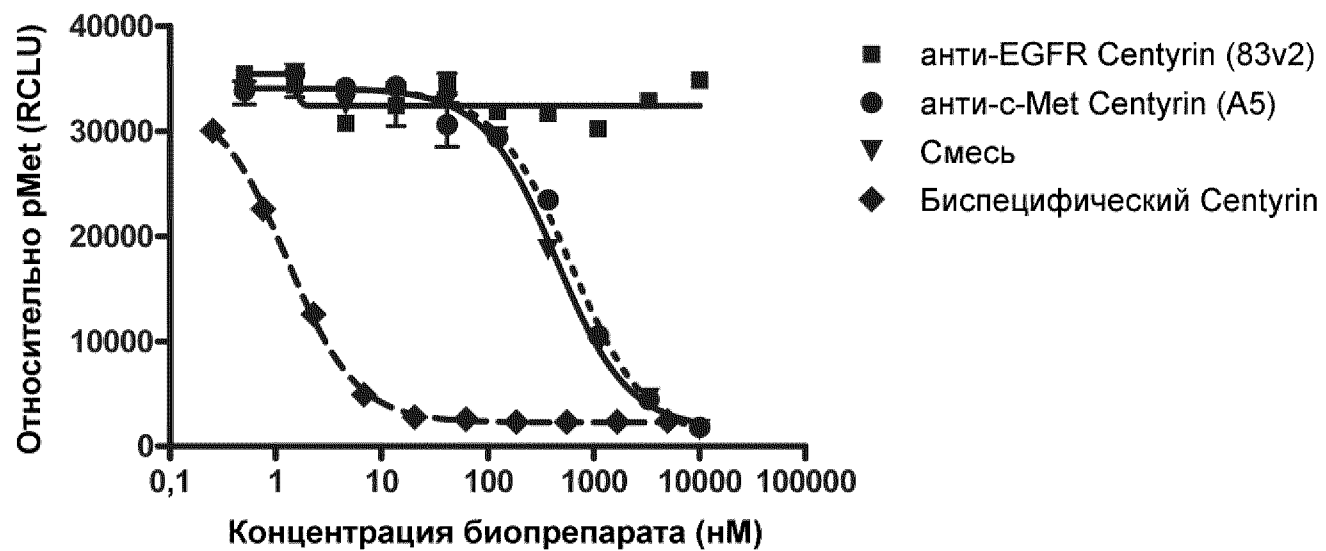
ФИГ. 3 (продолжение)

SEQ ID  
NO:

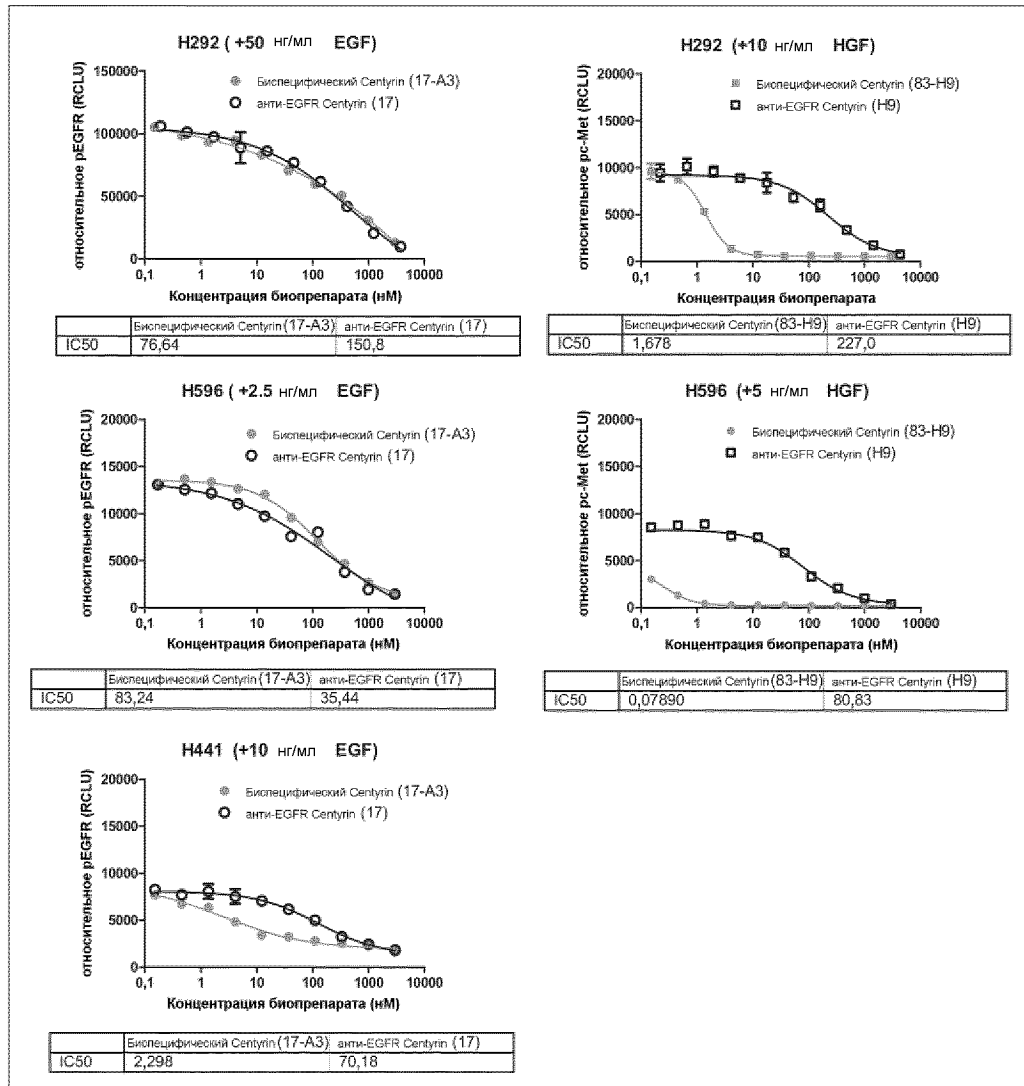
```
32 LKPGTEYYVNILGVKGGISVPLSAIFTT
33 LKPGTEYWVTILGVKGLVSTPLSAIFTT
34 LKPGTEYIVNIMGVKGGSISHPLSAIFTT
35 LKPGTEYVVNILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36 LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37 LKPGTEYVVQIMGVKGTVSPPLSAIFTT
38 LKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39 LKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40 LKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41 LKPGTEYVVNIMGVKGKISPPLSAIFTT
42 LKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
43 LKPGTEYVVQILGVKGGISVPLSAIFTT
44 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISYPLSAIFTT
45 LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46 LKPGTEYVVQIMGVKGTVSPPLSAIFTT
47 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
48 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
49 LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
111 LKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
112 LKPGTEYVVNILGVKGGISPPLSAIFTT
113 LKPGTEYVVNILGVKGGISPPLSAIFTT
114 LKPGTEYVVNILSVKGGISPPLSAIFTT
***** * * .***** :* *****
```

(89)

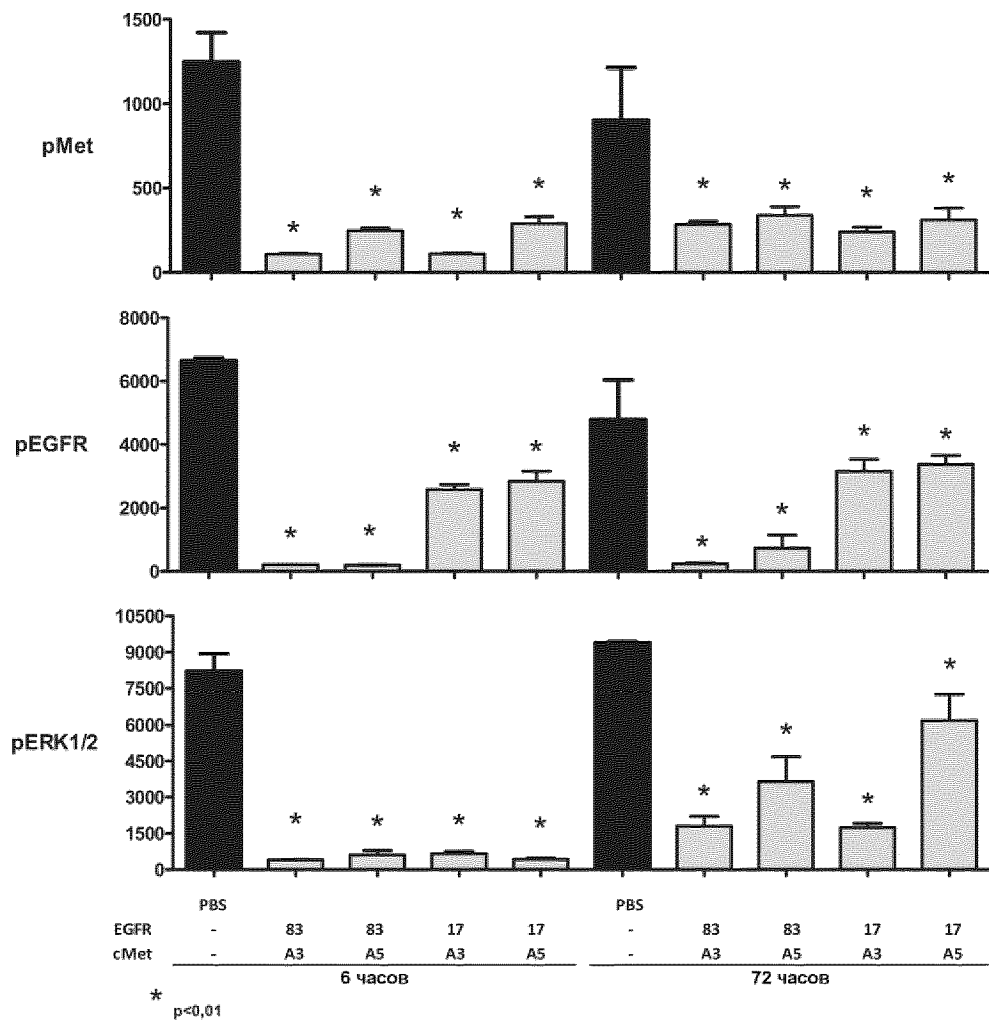
ФИГ. 4



ФИГ. 5

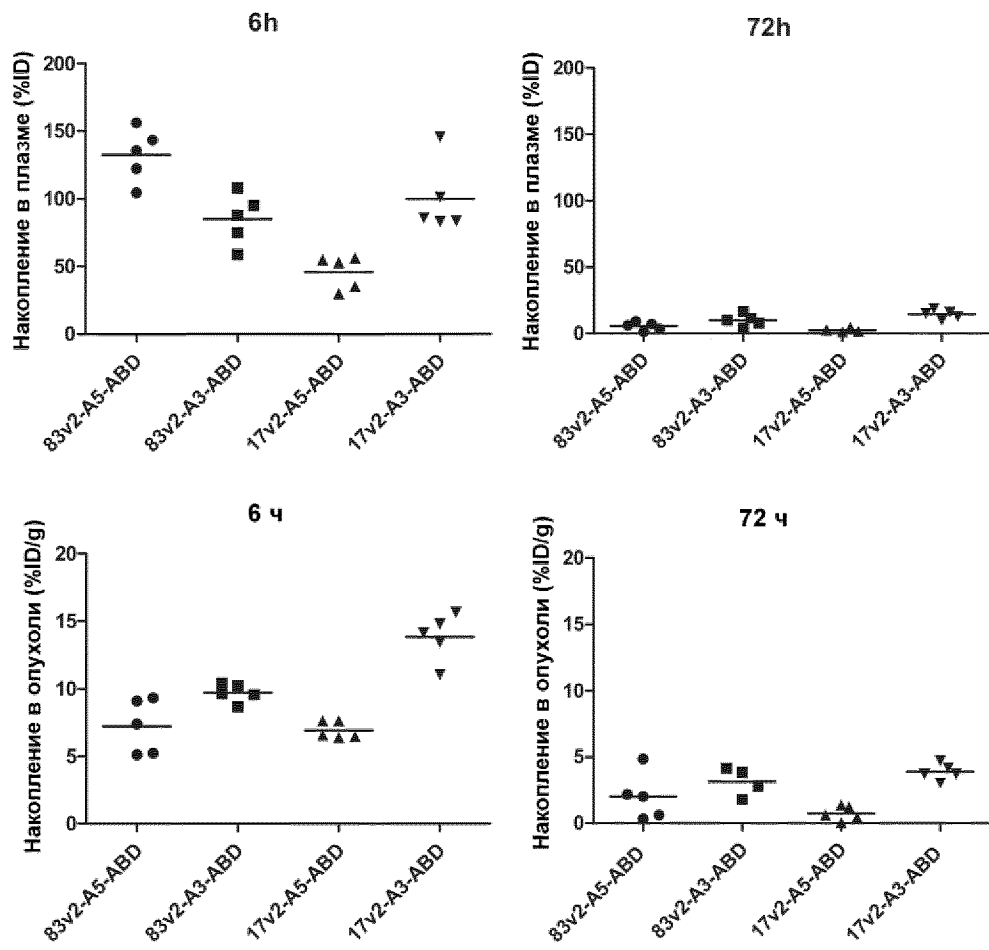


ФИГ. 6

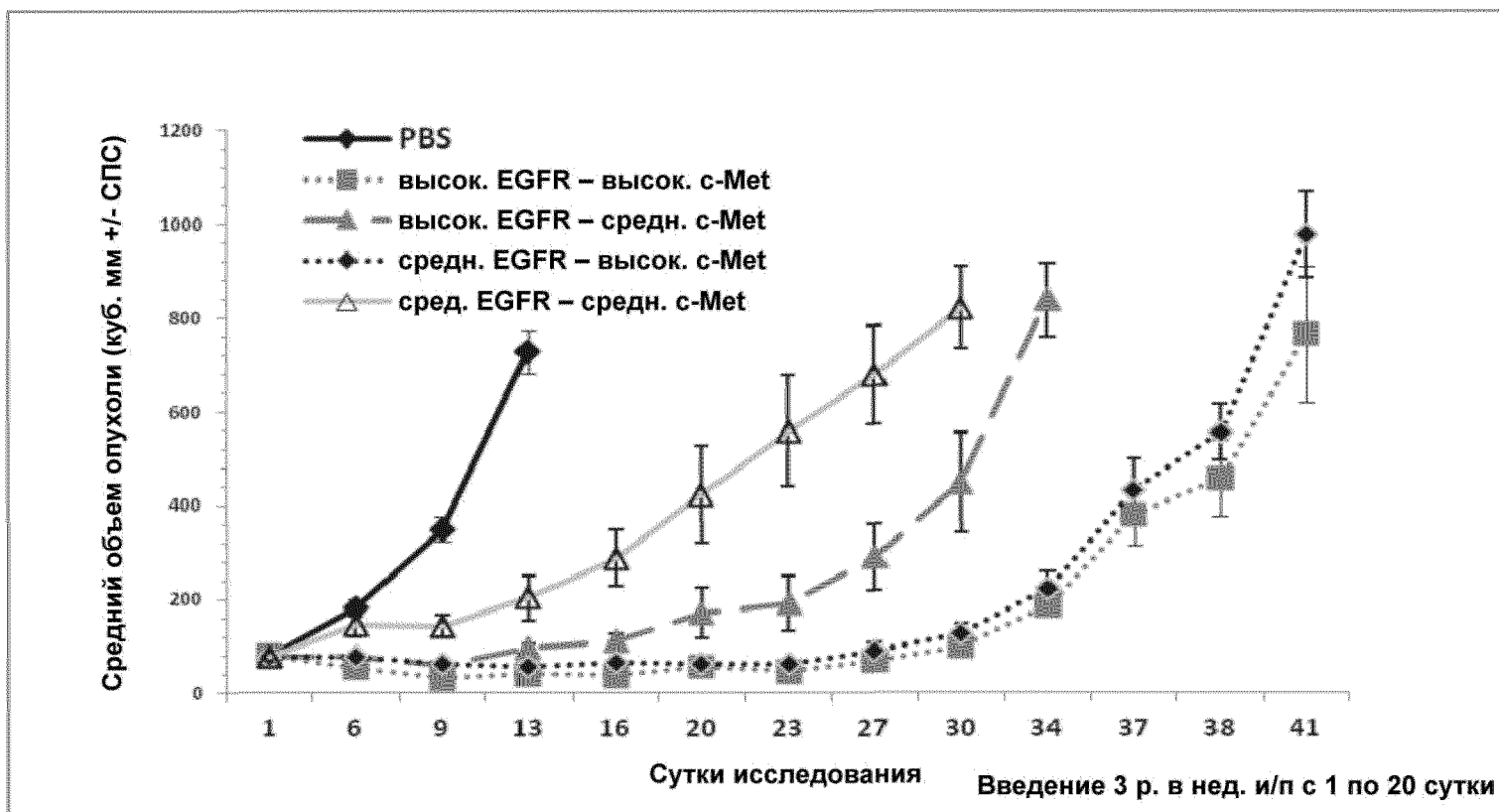




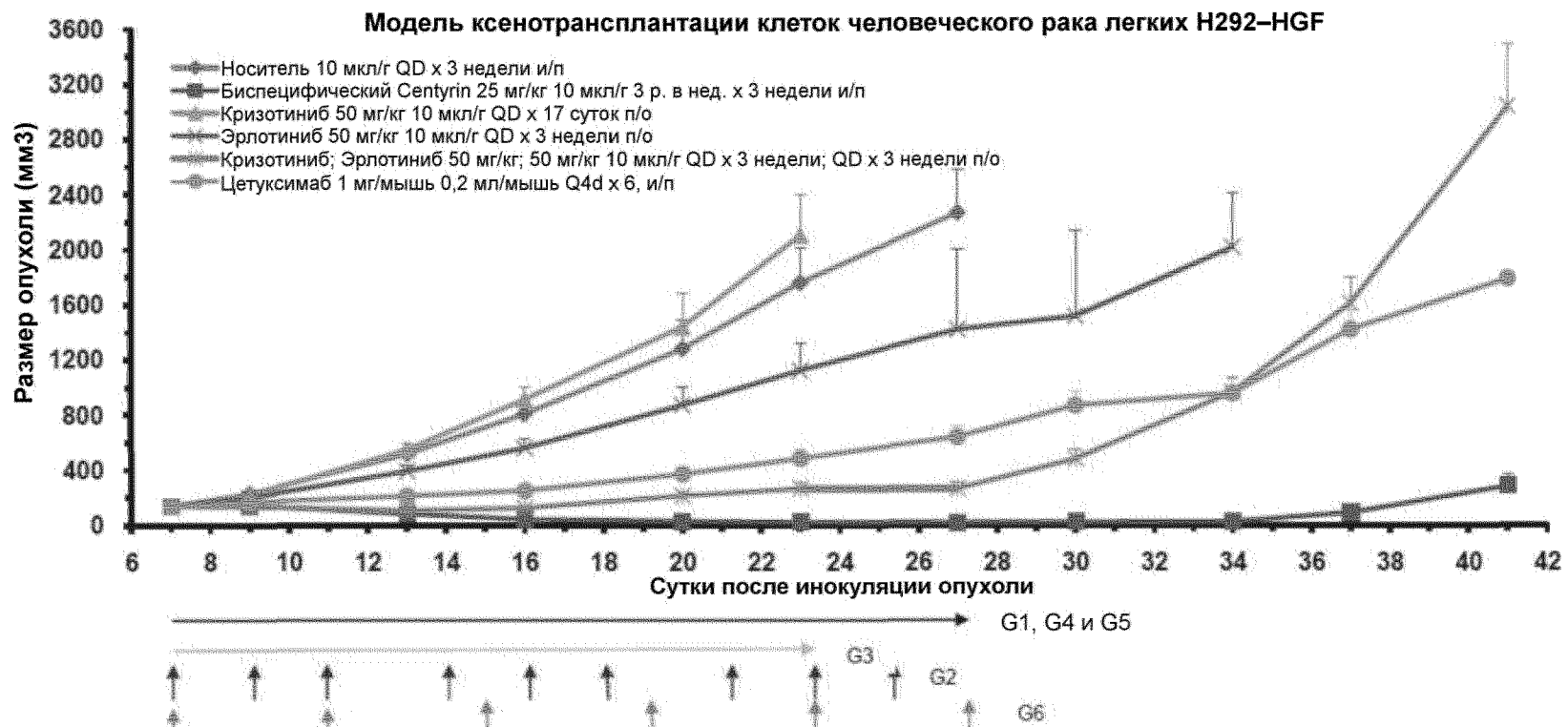
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/71267

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/39; A61K 38/00; C07K 14/00 (2014.01) USPC - 514/9.3; 514/19.2; 530/350; 530/402 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																									
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/39; A61K 38/00; C07K 14/00; C07H 21/04 (2014.01) USPC - 514/9.3; 514/19.2; 530/350; 530/402; 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - A61K 38/39; A61K 38/00; C07K 14/00; C07H 21/04 (2014.01) - see keyword below USPC - 514/9.3; 514/19.2; 530/350; 530/402; 536/23.1 - see keyword below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); PatBase; Medline, Google: fibronectin type III, FN3, fnIII, epidermal growth factor, EGF, EGFR, bispecific, hepatocyte growth factor, HGF, c-Met, HER2, HER3, HER4, VEGFR, cisplatin, vinblastine, NIH- H292, dissociation constant, Kd, inhibit, block, tyrosine kinase inhibitor, erlotinib, gefitinib, afatinib, G719A, G719X,																									
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y --- A</td> <td>US 2011/0053842 A1 (CAMPHAUSEN et al.) 03 March 2011 (03.03.2011), Abstract, para [0002], [0011], [0018], [0021], [0029], [0030], [0031], [0034], [0049], [0086], [0089], [0090], [0139], [0146], [0169], [0180], [0194]-[0196], [0200], [0207], [0245], and [0279]</td> <td>1-3, 29-39, 51-53, 61-68 ----- 40, 47-50</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2012/0244164 A1 (BESTE et al.) 27 September 2012 (27.09.2012), para [0004], [0014], [0036], [0118], [0278], [0612], and [0712]</td> <td>1-3, 51-53, 61-64</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2012/0225870 A1 (JANNE et al.) 06 September 2012 (06.09.2012), para [0006]-[0009], [0027]-[0029], [0036], [0057]-[0059], [0073], [0076], [0077], [0099], [0178], [0195], and [0207]</td> <td>1, 29-37, 51, 65-66/(51), 67, 68/(51)</td> </tr> <tr> <td>Y --- A</td> <td>US 2011/0274623 A1 (JACOBS et al.) 10 November 2011 (10.11.2011), Abstract, para [0011], [0013], [0050], [0054], [0064], [0077], [0081], [0104], [0107], and SEQ ID NOs: 16 and 150</td> <td>38-39, 53, 61-64, 65-68/(38) ----- 40, 47-50</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2010/0179094 A1 (EMANUEL et al.) 15 July 2010 (15.07.2010), Abstract, [0022], [0023], [0292], and Fig 8-9 and 22</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ZUCALI et al. Role of cMET expression in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. Ann Oncol. 2008. Vol. 19(9), p. 1605-12. Abstract; pg 1605, col 1, and pg 1607, col 1, para 2-3 and 5</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2011/0287009 A1 (SCHEER et al.) 24 November 2011 (24.11.2011), para [0425], [0426], and Fig 11</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y --- A	US 2011/0053842 A1 (CAMPHAUSEN et al.) 03 March 2011 (03.03.2011), Abstract, para [0002], [0011], [0018], [0021], [0029], [0030], [0031], [0034], [0049], [0086], [0089], [0090], [0139], [0146], [0169], [0180], [0194]-[0196], [0200], [0207], [0245], and [0279]	1-3, 29-39, 51-53, 61-68 ----- 40, 47-50	Y	US 2012/0244164 A1 (BESTE et al.) 27 September 2012 (27.09.2012), para [0004], [0014], [0036], [0118], [0278], [0612], and [0712]	1-3, 51-53, 61-64	Y	US 2012/0225870 A1 (JANNE et al.) 06 September 2012 (06.09.2012), para [0006]-[0009], [0027]-[0029], [0036], [0057]-[0059], [0073], [0076], [0077], [0099], [0178], [0195], and [0207]	1, 29-37, 51, 65-66/(51), 67, 68/(51)	Y --- A	US 2011/0274623 A1 (JACOBS et al.) 10 November 2011 (10.11.2011), Abstract, para [0011], [0013], [0050], [0054], [0064], [0077], [0081], [0104], [0107], and SEQ ID NOs: 16 and 150	38-39, 53, 61-64, 65-68/(38) ----- 40, 47-50	Y	US 2010/0179094 A1 (EMANUEL et al.) 15 July 2010 (15.07.2010), Abstract, [0022], [0023], [0292], and Fig 8-9 and 22	3	Y	ZUCALI et al. Role of cMET expression in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. Ann Oncol. 2008. Vol. 19(9), p. 1605-12. Abstract; pg 1605, col 1, and pg 1607, col 1, para 2-3 and 5	3	Y	US 2011/0287009 A1 (SCHEER et al.) 24 November 2011 (24.11.2011), para [0425], [0426], and Fig 11	3	<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																							
Y --- A	US 2011/0053842 A1 (CAMPHAUSEN et al.) 03 March 2011 (03.03.2011), Abstract, para [0002], [0011], [0018], [0021], [0029], [0030], [0031], [0034], [0049], [0086], [0089], [0090], [0139], [0146], [0169], [0180], [0194]-[0196], [0200], [0207], [0245], and [0279]	1-3, 29-39, 51-53, 61-68 ----- 40, 47-50																							
Y	US 2012/0244164 A1 (BESTE et al.) 27 September 2012 (27.09.2012), para [0004], [0014], [0036], [0118], [0278], [0612], and [0712]	1-3, 51-53, 61-64																							
Y	US 2012/0225870 A1 (JANNE et al.) 06 September 2012 (06.09.2012), para [0006]-[0009], [0027]-[0029], [0036], [0057]-[0059], [0073], [0076], [0077], [0099], [0178], [0195], and [0207]	1, 29-37, 51, 65-66/(51), 67, 68/(51)																							
Y --- A	US 2011/0274623 A1 (JACOBS et al.) 10 November 2011 (10.11.2011), Abstract, para [0011], [0013], [0050], [0054], [0064], [0077], [0081], [0104], [0107], and SEQ ID NOs: 16 and 150	38-39, 53, 61-64, 65-68/(38) ----- 40, 47-50																							
Y	US 2010/0179094 A1 (EMANUEL et al.) 15 July 2010 (15.07.2010), Abstract, [0022], [0023], [0292], and Fig 8-9 and 22	3																							
Y	ZUCALI et al. Role of cMET expression in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. Ann Oncol. 2008. Vol. 19(9), p. 1605-12. Abstract; pg 1605, col 1, and pg 1607, col 1, para 2-3 and 5	3																							
Y	US 2011/0287009 A1 (SCHEER et al.) 24 November 2011 (24.11.2011), para [0425], [0426], and Fig 11	3																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																								
Date of the actual completion of the international search 10 April 2014 (10.04.2014)	Date of mailing of the international search report <b>19 MAY 2014</b>																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																								

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/71267

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008/0241159 A1 (GERRITSEN et al.) 02 October 2008 (02.10.2008), para [0168]	3
A	US 2005/0004029 A1 (Garcia) 06 January 2005 (06.01.2005), para [0010]	3
A	US 2010/0254989 A1 (BOSSENMAIER et al.) 07 October 2010 (07.10.2010), Abstract, para [0360], [0362]-[0364], [0375],[0377], [0403], and [0404]	1-3, 29-40, 47-53, 61-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/71267

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 4-28, 41-46, 54-60, and 69-71  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-3, 29-37, 51-53, 61-64, 65-68/(51), drawn to an isolated bispecific FN3 domain containing molecule comprising a first fibronectin type III (FN3) domain and a second FN3 domain, wherein the first FN3 domain specifically binds epidermal growth factor receptor (EGFR) and blocks binding of epidermal growth factor (EGF) to EGFR, and the second FN3 domain specifically binds hepatocyte growth factor receptor (c-Met), and blocks binding of hepatocyte growth factor (HGF) to c-Met; or an isolated fibronectin type III (FN3) domain that specifically binds hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks binding of hepatocyte growth factor (HGF) to c-Met, and a method of use.

\*\*\*\*\*Continued in the extra sheet\*\*\*\*\*

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/71267

Continuation of:  
Box No III (unity of invention is lacking)

Group II, claims 38-40, and 47-50, 65-68/(38), drawn to an isolated fibronectin type III (FN3) domain that specifically binds epidermal growth factor receptor (EGFR) and blocks binding of epidermal growth factor (EGF) to EGFR, wherein the FN3 domain is isolated from a library designed based on the Tencon amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Feature

Group I includes the special technical feature of an isolated fibronectin type III (FN3) domain that specifically binds hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks binding of hepatocyte growth factor (HGF) to c-Met, not required by Groups II.

Group II includes the special technical feature of a FN3 domain is isolated from a library designed based on the Tencon amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, not required by Groups I.

Common Technical Features

The inventions of claims 1-3, 29-37 of Group I and Group II share the technical feature of an isolated FN3 domain containing molecule comprising a fibronectin type III (FN3) domain, wherein the FN3 domain specifically binds epidermal growth factor receptor (EGFR) and blocks binding of epidermal growth factor (EGF) to EGFR.

The inventions of claims 65-68/(51) of Group I and claims 65-68/(38) of Group II further share the technical feature of a pharmaceutical composition comprising the FN3 domain and a pharmaceutically acceptable carrier.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2011/0053842 A1 to CAMPHAUSEN et al. (hereinafter 'Camphausen') as follows:

Camphausen discloses an isolated FN3 domain (para [0049] - 'An "isolated" polypeptide'; para [0018] - 'the EGFR binding polypeptide is a Fn3 domain and further comprises a second Fn3 domain'; para [0034] - 'Isolation of EGFR-Binding Clones'; para [0169] - 'The proteins of the present invention can be purified by isolation/purification methods')

--- containing molecule comprising a fibronectin type III (FN3) domain, wherein the first FN3 domain specifically binds epidermal growth factor receptor (EGFR) and blocks binding of epidermal growth factor (EGF) to EGFR (para [0011] - 'a polypeptide comprising a fibronectin type III (Fn3) domain, ... binds human epidermal growth factor receptor (EGFR)...the EGFR binding polypeptide inhibits EGFR binding to one or more EGFR ligands'; para [0021] - 'EGFR binding polypeptide that inhibits the binding of ... epidermal growth factor (EGF) to EGFR').

Camphausen further discloses a pharmaceutical composition comprising the FN3 domain and a pharmaceutically acceptable carrier (para [0029] - 'pharmaceutically acceptable compositions comprising an EGFR binding polypeptide'; para [0011]; para [0200] - 'Therapeutic formulations comprising ...physiologically acceptable carriers').

Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I-II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note re item 4: Claims 4-28, 41-46, 54-60, and 69-71 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

Note:

I) Claim 35 is objected to as lacking a proper antecedent basis for the "the second therapeutic agent" limitation. It is assumed that claim 35 depends upon claim 34. For the purposes of this ISR, claim 35 is construed as follows:

35) The method of claim 34, wherein the second therapeutic agent is a chemotherapeutic agent or a targeted anti-cancer therapy.

II) Claim 53 is objected due to containing an improper format. For the purposes of this ISR, the limitation "d) binds human c-Met with a (KD of" is assumed to read as "d) binds human c-Met with a KD of".