

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035745**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.05

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

(21) Номер заявки
201690773

(22) Дата подачи заявки
2014.10.13

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

(31) **61/890,539**

(56) **US-A1-20130012435**

(32) **2013.10.14**

US-A1-20110274623

(33) **US**

US-A1-20120263723

(43) **2016.08.31**

US-A1-20090311803

(86) **PCT/US2014/060227**

US-A1-20090274693

(87) **WO 2015/057545 2015.04.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Голдберг Шалом, Джекобс Стивен,
Лин Триция, О' Нил Кэрин (US)**

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

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

B1**035745****035745****B1**

Область применения изобретения

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

Предпосылки создания изобретения

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, или ErbB1, или HER1) представляет собой транс-мембранный гликопротеин массой 170 кДа, кодируемый протоонкогеном c-erbB1. EGFR является членом семейства человеческих рецепторов эпидермальных факторов роста (HER), которые представляют собой рецепторные тирозинкиназы (RTK), включающие в себя HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). Эти RTK имеют гомологичную структуру, которая состоит из лиганд-связывающего внеклеточного домена (ECD), одиночного трансмембранного домена и внутриклеточного домена, содержащего каталитический киназный домен и С-концевой хвост. EGFR-сигнализация запускается связыванием лиганда, за которым следует индукция конформационного изменения, димеризация и трансавтофосфорилирование рецептора (Ferguson et al., *Annu Rev Biophys*, 37: 353-73, 2008), в результате чего запускается каскад передачи сигналов, который в конечном счете влияет на широкий спектр клеточных функций, включая пролиферацию и выживаемость клеток. Повышение экспрессии или киназной активности EGFR связано с рядом типов рака у человека, что делает EGFR привлекательной мишенью для терапевтического вмешательства (Mendelsohn et al., *Oncogene* 19: 6550-6565, 2000; Grünwald et al., *J Natl Cancer Inst* 95: 851-67, 2003; Mendelsohn et al., *Semin Oncol* 33: 369-85, 2006). Более того, как увеличение числа копий гена EGFR, так и повышение экспрессии белка связывают с благоприятными ответами на ингибитор тирозинкиназ EGFR IRESSA™ (гефитиниб) при немелкоклеточном раке легких (Hirsch et al., *Ann Oncol* 18:752-60, 2007).

К связанным с EGFR терапевтическим средствам относятся как низкомолекулярные соединения, так и антитела к EGFR, одобренные для лечения колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи и немелкоклеточного рака легких (NSCLC) (Baselga and Arteaga, *J Clin Oncol* 23:2445-2459 (2005; Gill et al., *J Biol Chem*, 259:7755-7760, 1984; Goldstein et al., *Clin Cancer Res*, 1:131 1-1318; 1995; Prewett et al., *Clin Cancer Res*, 4:2957-2966, 1998).

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

с-Met кодирует тирозинкиназный рецептор. Впервые его обнаружили как протоонкоген в 1984 г., после того как было выявлено, что воздействие канцерогена приводило к появлению конститутивно активного слитного белка TPR-MET (Cooper et al., *Nature* 311:29-33, 1984). Активация с-Met через его лиганд HGF вызывает стимуляцию большого числа клеточных процессов, включая рост, подвижность, вовлечение в злокачественный процесс, метастазирование, эпителиально-мезенхимальное превращение, ангиогенез/заживление ран и регенерацию тканей (Christensen et al., *Cancer Lett* 225:1-26, 2005; Peters and Adjei, *Nat Rev Clin Oncol* 9:314-26, 2012). с-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). с-Met структурно аналогичен другим мембранным рецепторам, таким как Ron и Sea, и состоит из внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного домена и цитоплазматического домена (который содержит тирозинкиназный домен и С-концевую хвостовую область). Точная стехиометрия связывания HGF:с-Met неизвестна, но по существу считается, что две молекулы HGF связываются с двумя молекулами с-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 с-Met вследствие амплификации гена, мутации или сверхэкспрессии рецептора.

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

and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003). До 4 и 20% случаев немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака желудка соответственно характеризовались амплификацией c-Met (Sakakura et al., Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299-305; Sierra and Tsao, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 3:S21-35, 2011). При раке легких, даже в отсутствие амплификации гена, часто наблюдают сверхэкспрессию c-Met (Ichimura et al., Jpn J Cancer Res, 87:1063-9, 1996). Более того, почти половина клинических образцов легочных аденокарцином характеризовалась высокими уровнями 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).

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

В настоящее время отдельные роли как EGFR, так и c-Met при раке хорошо известны, что делает данные мишени привлекательными для комбинированной терапии. Оба рецептора осуществляют сигнализацию через одни и те же пути, связанные с выживанием и антиапоптозным эффектом (ERK и AKT). Таким образом, одновременное ингибирование этой пары может ограничивать потенциал активации компенсаторного пути и, таким образом, повышать общую эффективность. Комбинированные виды терапии, мишенями при которых являются EGFR и c-Met, тестировали в клинических испытаниях Tarceva® (эрлотиниб) в комбинации с одновалентным антителом к c-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 c-Met (Adjei et al., Oncologist, 16:788-99, 2011). Комбинированные виды терапии или биспецифические молекулы анти-EGFR/c-Met описаны, например, в международной патентной публикации № WO 2008/127710, патентной публикации США № US 2009/0042906, международной патентной публикации № WO 2009/111691, международной патентной публикации № WO 2009/126834, международной патентной публикации № WO2010/039248, международной патентной публикации № WO 2010/115551.

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

Соответственно существует потребность в дополнительных моноспецифических и биспецифических ингибиторах EGFR и/или c-Met, которые также имеют дополнительную способность к конъюгации с цитотоксическими лекарственными средствами, таким образом нацеливая эти высокоэффективные соединения на экспрессирующие EGFR/c-met опухолевые клетки и усиливая противоопухолевую активность этих ингибиторов EGFR/c-Met. Хотя конъюгаты антител с лекарственными средствами известны в данной области, традиционный способ присоединения фрагмента лекарственного средства, как правило, приводит к образованию гетерогенной смеси молекул, в которой фрагменты лекарственного средства присоединены к нескольким сайтам на антителе. Например, цитотоксические лекарственные средства, как правило, конъюгированы с антителами посредством зачастую многочисленных лизиновых остатков на антителе, в результате чего получается гетерогенная смесь конъюгатов антитела с лекарственным средством. В зависимости от условий реакции гетерогенная смесь обычно имеет распределение антител, содержащих от 0 до около 8 присоединенных фрагментов лекарственного средства. Кроме того, в пределах каждой подгруппы конъюгатов с определенным целочисленным соотношением фрагментов лекарственного средства к антителам имеется потенциально гетерогенная смесь, в которой определенный фрагмент лекарственного средства присоединен к различным сайтам на антителе. Аналитические и препаративные способы не позволяют разделить и охарактеризовать типы молекул-конъюгатов антитело-лекарственное средство в гетерогенной смеси, полученной в результате реакции конъюгации. Антитела представляют собой крупные, сложные и структурно разнородные биомолекулы, зачастую содержащие множество реакционных функциональных групп. Их способность к реакции с линкерными реагентами и промежуточными продуктами лекарственное средство-линкер зависит от таких факторов, как pH, кон-

центрация, концентрация солей и сорастворители. Кроме того, многоэтапный процесс конъюгации может быть невоспроизводимым вследствие сложностей, связанных с контролем условий реакции и характеристики реагентов и промежуточных продуктов.

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

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

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

Изложение сущности изобретения

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

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

В настоящем изобретении дополнительно предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 с, по меньшей мере, одной цистеиновой заменой из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114, который специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met.

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

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

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

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

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

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

Дополнительный аспект изобретения представляет собой способ получения выделенных биспеци-

фических FN3 с внедренными остатками цистеина путем мутагенеза нуклеотидной последовательности исходной биспецифической молекулы FN3 с заменой одного или более аминокислотных остатков на цистеиновые остатки для кодирования биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина; экспрессии молекулы с внедренными остатками цистеина; и выделения биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

Краткое описание чертежей

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

Фиг. 2. Структуры цитотоксин/линкер.

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

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

Фиг. 5А и 5В. Выравнивание последовательности с-Met-связывающих доменов FN3. Петля С и тяж CD, а также петля F и тяж FG заключены в прямоугольники и охватывают остатки 29-43 и 65-81.

Фиг. 6. Показано ингибирование фосфорилирования с-Met в клетках H292, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3, и стимулированных HGF. Наблюдали существенное увеличение эффективности биспецифической к EGFR/с-Met молекулы (ECB1) по сравнению с моноспецифическим с-Met-связывающим доменом FN3 (P114AR5P74-A5, показан на фигуре как элемент А5), используемым отдельно или в комбинации с EGFR-связывающим доменом FN3 (P54AR4-83v2, показан на фигуре как элемент 83v2).

Фиг. 7. Ингибирование фосфорилирования EGFR и с-Met в клетках, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домены FN3. В клеточных линиях с высокими уровнями экспрессии EGFR, H292 (А) и H596 (В) анти-EGFR моноспецифические и биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, в равной степени эффективно могут уменьшать фосфорилирование EGFR. В клеточных линиях с низкими уровнями экспрессии EGFR относительно с-Met, H441 (С), биспецифические к EGFR/с-Met молекулы повышают эффективность ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению только с моноспецифическим EGFR-связывающим доменом FN3. В клеточных линиях с низкими уровнями экспрессии с-Met относительно EGFR, H292 (D) и H596 (E), ингибирование фосфорилирования с-Met существенно усиливалось при использовании биспецифической к EGFR/с-Met молекулы по сравнению только с моноспецифическим с-Met-связывающим доменом FN3. В исследовании использовали следующие молекулы: биспецифическая ECB5 (показана на фигуре как элемент 17-A3), моноспецифический EGFR-связывающий домен FN3 P53A1R5-17 (показан на фигуре как элемент 17), биспецифическая к EGFR/с-Met молекула ECB3 (показана на фигуре как элемент 83-H9) и моноспецифический с-Met-связывающий домен FN3 P114AR7P93-H9 (показан на фигуре как элемент H9).

Фиг. 8. Показана фармакодинамическая сигнализация в опухолях, выделенных у мышей, получавших дозы биспецифических к EGFR/с-Met молекул в течение 6 или 72 ч. Все молекулы в значительной степени снижали фосфорилирование с-Met, EGFR и ERK как через 6 ч, так и через 72 ч, причем степень ингибирования зависела от аффинности доменов FN3 к EGFR и/или с-Met. Биспецифические молекулы создавали путем соединения EGFR-связывающего домена FN3 с высокой (показано как элемент 83, p54AR4-83v2) или средней (показано на фигуре как элемент 17v2, P53A1R5-17v2) аффинностью с с-Met-связывающим доменом FN3 с высокой (показано на фигуре как элемент А3, P114AR7P94-A3) или средней (показано на фигуре как элемент А5, P114AR5P74-A5) аффинностью.

Фиг. 9. Накопление в плазме (сверху) и опухоли (снизу) биспецифических к EGFR/с-Met молекул с различными значениями аффинности, связанных с альбумин-связывающим доменом (ABD), показано через 6 ч (слева) и 72 ч (справа) после интраперитонеального (и/п) введения. Через шесть часов после введения накопление в опухоли было максимальным у мышей, получавших биспецифическую молекулу, в которой удерживается EGFR-связывающий домен FN3 (17v2) со средней аффинностью или с-Met-связывающий домен (83v2) с высокой аффинностью.

Биспецифические молекулы включали следующие EGFR- или с-Met-связывающие домены FN3 со средней или высокой аффинностью: 83v2-A5-ABD (ECB18; высокая/средняя к EGFR/cMet); 83v2-A3-ABD (ECB38; высокая/высокая); 17v2-A5 (ECB28; средняя/средняя); 17v2-A3-ABD (ECB39; средняя/высокая). 83v2 обозначает p54AR4-83v2; 17v2 обозначает p53A1R5-17v2; А3 обозначает p114AR7P94-A3; А5 обозначает p114AR5P74-A5.

Фиг. 10. Ксенотрансплантаты опухоли H292-HGF имплантировали мышам линии SCID Beige. Когда опухоли достигали среднего объема приблизительно 80 мм³, мышам три раза в неделю вводили биспецифические к EGFR/с-Met молекулы (25 мг/кг) или носитель PBS. Все биспецифические молекулы

уменьшали рост опухоли, причем ингибирование роста опухоли (TGI) зависело от аффинности молекул к с-Met и EGFR (высокая EGFR - высокая сMet обозначает p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ECB38); высокая EGFR - средняя сMet обозначает p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ECB18); средняя EGFR - высокая сMet обозначает p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3 (ECB39); средняя EGFR - средняя -сMet обозначает p53A1R5-17-p114AR5P74-A 5 (ECB28)).

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

Подробное описание изобретения

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

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

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

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

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

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

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

Применяемый в настоящем документе термин "рецептор эпидермального фактора роста" или "EGFR" относится к EGFR человека (также известному как HER-1 или Erb-B1 (Ullrich et al., Nature 309:418-425, 1984) с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 73, и по номеру доступа NP 005219 в GenBank, а также ее вариантам природного происхождения. К таким вариантам относятся хорошо известный вариант EGFRvIII и другие варианты альтернативного сплайсинга (например, обозначенные в SwissProt номерами доступа P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4), варианты GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962 и PRO-988 (Livingston et al., NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478).

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

Применяемый в настоящем документе термин "эпидермальный фактор роста" (EGF) относится к

хорошо известному EGF человека из 53 аминокислот с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 74.

Применяемый в настоящем документе термин "рецептор фактора роста гепатоцитов" или "с-Met" относится к с-Met человека с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101, или по номеру доступа в GenBank NP_001120972, и ее природным вариантам.

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

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

Блокирование/ингибирование лиганда EGFR, например, EGF с EGFR и/или HGF с с-Met, посредством домена FN3 или биспецифической к EGFR/с-Met молекулы изобретения, содержащей домен FN3, 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 к EGFR/с-Met молекула, содержащая домен FN3, "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 способов, например путем измерения ингибирования связывания биотинилированного EGF на экспрессирующих EGFR клетках A431, которые подвергали воздействию домена FN3 или биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домен FN3, с помощью FACS и с применением способов, описанных в настоящем документе, или путем измерения связывания биотинилированного HGF с внеклеточным доменом с-Met с применением хорошо известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

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

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

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

Применяемый в настоящем документе термин "нейтрализует сигнализацию с-Met" относится к способности домена FN3 изобретения ингибировать сигнализацию с-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 с-Met по сравнению с нормальной клеткой из ткани того же типа. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию EGFR и/или с-Met можно измерить, применяя хорошо известные анализы, например, ИФА, иммунофлуоресценцию, проточную цитометрию или радиоиммунный анализ на живых или лизированных клетках. Альтернативно или дополнительно уровни молекул нуклеиновых кислот, кодирующих EGFR и/или с-Met, можно измерить в клетке, например, применяя флуоресцентную гибридизацию *in situ*, саузэрн-блоттинг или ПЦР. Сверхэкспрессия EGFR и/или с-Met означает, что уровень EGFR и/или с-Met на поверхности клетки по меньшей мере в 1,5 раза выше по сравнению с уровнем нормальной клетки.

Применяемый в настоящем документе термин "Tenson" относится к синтетическому домену фибронектина типа III (FN3) с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 и описанной в патентной публикации США № US 2010/0216708.

Применяемый в настоящем документе термин "раковая клетка" или "опухолевая клетка" относится к раковой, предраковой или преобразованной клетке либо *in vivo*, либо *ex vivo* и к культуре клеток, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения, которые не обязательно затрагивают получение нового генетического материала. Хотя преобразование может быть вызвано инфицированием преобразующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты, оно также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Преобразование/рак проявляется, например, в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образо-

вании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркеров, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли или ее подавлении у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т.п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

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

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

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

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

Применяемый в настоящем документе термин "биспецифическая к EGFR/c-Met молекула" или "биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3" относится к молекуле, содержащей EGFR-связывающий домен FN3 и отдельный c-Met-связывающий домен FN3, которые ковалентно связаны либо напрямую, либо посредством линкера. Пример биспецифической к EGFR/c-Met молекулы содержит первый домен FN3, специфически связывающий EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающий 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 соответственно одного, двух, четырех и шести сайтов связывания, специфичных для антигена.

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

Композиции настоящего изобретения

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

Моноспецифические EGFR-связывающие молекулы

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

Домены FN3 изобретения связываются с EGFR с высокой аффинностью, ингибируют сигнализацию EGFR и могут обеспечивать благоприятный эффект в плане специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами EGFR и иметь улучшенное проникание в ткани по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител.

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

Домены FN3 изобретения могут блокировать связывание EGF с EGFR со значением IC_{50} менее чем приблизительно 1×10^{-7} М, менее чем приблизительно 1×10^{-8} М, менее чем приблизительно 1×10^{-9} М, менее чем приблизительно 1×10^{-10} М, менее чем приблизительно 1×10^{-11} М или менее чем приблизительно 1×10^{-12} М в конкурентном анализе с использованием клеток A431 и обнаружения величины флуоресценции от связанного биотинилированного EGF с использованием конъюгата стрептавидин-фикоэритрин при 600 нм в клетках A431, инкубированных с доменами FN3 изобретения или без них. Примеры доменов FN3 могут блокировать связывание EGF с EGFR со значением IC_{50} в диапазоне от около 1×10^{-9} М до около 1×10^{-7} М, например EGFR-связывающие домены FN3 с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137. Домены FN3 изобретения могут блокировать связывание EGF с EGFR по меньшей мере на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению со связыванием EGF с EGFR в отсутствие доменов FN3 изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

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

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

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

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

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC_{50} от около $1,8 \times 10^{-8}$ М до около $2,5 \times 10^{-6}$ М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF. Такие примеры доменов FN3 представляют собой домены с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137.

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

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

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

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

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX9RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180), где X_9 представляет собой M или I; и

петлю BC, содержащую последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 181); 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;

X₅ представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X₆ представляет собой G, D или A;

X₇ представляет собой A, F, G, H или D и

X₈ представляет собой Y, F или L.

Домены FN3 изобретения, которые специфически связываются с EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, могут содержать в качестве структурного элемента петлю FG, которая содержит последовательность HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), где X₉ представляет собой M или I. Такие домены FN3 могут дополнительно содержать петлю BC длиной 8 или 9 аминокислот, которая описана последовательностью X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181), и могут ингибировать аутофосфорилирование EGFR со значением IC₅₀ менее чем приблизительно 2,5×10⁻⁶ M и со значением IC₅₀ в диапазоне от около 1,8×10⁻⁸ M до около 2,5×10⁻⁶ M при измерении в клетках A431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

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

LPAFKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQSEKVGAEAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182)
или последовательность

LPAFKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQSEKVGAEAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

где

X₁ представляет собой A, T, G или D;

X₂ представляет собой A, D, Y или W;

X₃ представляет собой P, D или N;

X₄ представляет собой L или отсутствует;

X₅ представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X₆ представляет собой G, D или A;

X₇ представляет собой A, F, G, H или D;

X₈ представляет собой Y, F или L и

X₉ представляет собой M или I.

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

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

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

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

Моноспецифические с-Met-связывающие молекулы

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

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

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

Домены FN3 изобретения могут блокировать связывание HGF с с-Met со значением IC₅₀ менее чем приблизительно 1×10⁻⁷ M, менее чем приблизительно 1×10⁻⁸ M, менее чем приблизительно 1×10⁻⁹ M, менее чем приблизительно 1×10⁻¹⁰ M, менее чем приблизительно 1×10⁻¹¹ M или менее чем приблизительно

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

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

Связывание лиганда, например, HGF с с-Met, стимулирует димеризацию рецептора, аутофосфорилирование, активацию внутреннего рецептора, цитоплазматического тирозинкиназного домена и иницирование множества сигнальных путей трансдукции и трансактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла или деления. Ингибирование сигнализации с-Met может приводить к ингибированию в одном или более расположенных ниже сигнальных путях передачи с-Met, и, следовательно, нейтрализация с-Met может оказывать различные эффекты, включая ингибирование пролиферации и дифференцировки клеток, ангиогенез, подвижность клеток и метастазирование.

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

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

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

В одном варианте осуществления домен FN3 изобретения связывает человеческий с-Met с константой диссоциации (K_D), которая равна или менее чем приблизительно 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М, 1×10^{-13} М, 1×10^{-14} М или 1×10^{-15} М в соответствии с данными поверхностного плазмонного резонанса или метода Кипеха, известного специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 изобретения связывается с человеческим с-Met с K_D от около 3×10^{-10} М до около 5×10^{-8} М. Аффинность домена FN3 к с-Met можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа (см., например, Berzofsky, et al., *Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); а также способы, описанные в настоящем документе). Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре домен FN3 - антиген может изменяться при измерении в разных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например, K_D , K_{on} , K_{off}) предпочтительно выполняют с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

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

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

В одном варианте осуществления домен FN3, который специфически связывается с с-Met, содержит тяж С и петлю CD, содержащую последовательность DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), где

X₁₀ представляет собой W, F или V;

X₁₁ представляет собой D, F или L;

X₁₂ представляет собой V, F или L;

X₁₃ представляет собой V, L или T;

X₁₄ представляет собой V, R, G, L, T или S;

X₁₅ представляет собой G, S, A, T или K и

X₁₆ представляет собой E или D; и
тяж F и петлю FG, содержащую последовательность TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), где

X₁₇ представляет собой Y, W, I, V, G или A;
X₁₈ представляет собой N, T, Q или G;
X₁₉ представляет собой L, M, N или I;
X₂₀ представляет собой G или S;
X₂₁ представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;
X₂₂ представляет собой I, V или L и
X₂₃ представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

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

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
AIVLTVPGSESYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),

где

X₁₀ представляет собой W, F или V;
X₁₁ представляет собой D, F или L;
X₁₂ представляет собой V, F или L;
X₁₃ представляет собой V, L или T;
X₁₄ представляет собой V, R, G, L, T или S;
X₁₅ представляет собой G, S, A, T или K;
X₁₆ представляет собой E или D;
X₁₇ представляет собой Y, W, I, V, G или A;
X₁₈ представляет собой N, T, Q или G;
X₁₉ представляет собой L, M, N или I;
X₂₀ представляет собой G или S;
X₂₁ представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;
X₂₂ представляет собой I, V или L и
X₂₃ представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с c-Met, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49 или 111-114.

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

Выделение EGFR- или c-Met-связывающих доменов FN3 из библиотеки, основанной на последовательности Tencon

Tencon (SEQ ID NO: 1) представляет собой домен фибронектина типа III (FN3) неприродного происхождения, разработанный на основе консенсусной последовательности пятнадцати доменов FN3 тенасина-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; патентная публикация США № 2010/0216708). Кристаллическая структура Tencon демонстрирует шесть открытых на поверхности петель, соединяющих семь бета-тяжей, характерных для доменов FN3, причем бета-тяжи обозначены как A, B, C, D, E, F и G, а петли обозначены как AB, BC, CD, DE, EF и FG (Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992; патент США № 6673901). Эти петли или выбранные остатки в пределах каждой петли можно рандомизировать для конструирования библиотек доменов фибронектина типа III (FN3), которые можно применять для выбора новых молекул, связывающихся с EGFR. В табл. 1 представлены положения и последовательности каждой петли и бета-тяжа в Tencon (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, библиотека, разработанная на основе последовательности Tencon, может иметь рандомизированную петлю FG или рандомизированные петли BC и FG, например, библиотеки TCL1 или TCL2, как описано ниже. Петля BC Tencon имеет длину 7 аминокислот. Таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tencon с диверсификацией по петле BC можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Петля FG Tencon имеет длину 7 аминокислот, таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tencon с диверсификацией по петле FG можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Дополнительного разнообразия в петлях библиотек Tencon можно достичь путем вставки и/или делеций остатков в петлях. Например, петли FG и/или BC можно расширить на 1-22 аминокислоты или уменьшить на 1-3 аминокислоты. Петля FG в Tencon имеет длину 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител имеет длину в диапазоне от 4 до 28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия петлю FG можно диверсифицировать в последовательности, а также по длине для соответствия диапазону длины CDR3 антитела из 4-28 остатков. Например, петлю FG можно дополнительно диверсифицировать по длине, удлив ее на дополнительные 1, 2, 3, 4 или 5 ами-

нокислот.

Библиотека, разработанная на основе последовательности Tenson, также может иметь альтернативные рандомизированные поверхности, образованные сбоку от домена FN3 и содержащие два или более бета-тяжей и, по меньшей мере, одну петлю. Одна такая альтернативная поверхность образована аминокислотами в бета-тяжах С 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, показана на фиг. 4, и подробное создание таких библиотек описано в заявке на патент США № 13/852,930.

Библиотеки, разработанные на основе последовательности Tenson, также включают в себя библиотеки, разработанные 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), и такие варианты демонстрируют повышенную термическую стабильность. Примеры вариантов Tenson описаны в патентной публикации США № 2011/0274623 и включают в себя Tenson 27 (SEQ ID NO: 99), имеющую замены E11R, L17A, N46V, E86I по сравнению с Tenson с SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Домен FN3	Tenson (SEQ ID NO: 1)
А тяж	1-12
AB петля	13-16
В тяж	17-21
BC петля	22-28
С тяж	29-37
CD петля	38-43
Д тяж	44-50
DE петля	51-54
Е тяж	55-59
EF петля	60-64
Г тяж	65-74
FG петля	75-81
Г тяж	82-89

Библиотеки на основе Tenson и другой последовательности FN3 можно рандомизировать по выбранным положениям остатков с использованием случайного или определенного набора аминокислот. Например, варианты библиотеки, имеющие случайные замены, можно создать с использованием кодонов NNK, которые кодируют все 20 аминокислот природного происхождения. В других схемах диверсификации можно применять кодоны DVK для кодирования аминокислот Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys. Альтернативно для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов можно применять кодоны NNS. Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в диверсифицируемых положениях можно синтезировать, например, с использованием технологии Slonomics® (<http://www.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 любой желаемой молекулы ДНК. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

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

нализацию EGFR и/или c-Met с применением способов, описанных в настоящем документе.

Домены FN3 изобретения, специфически связывающие EGFR или c-Met, можно создавать, применяя любой домен FN3 в качестве матрицы для создания библиотеки и проведения скрининга в библиотеке молекул, специфически связывающих EGFR или c-Met, с применением предложенных в ней способов. Примеры подходящих для применения доменов FN3 включают в себя 3-й домен FN3 тенасцина C (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 № WO 2009/085462; патент США № 6969108; патент США № 6172197; патент США № 5223409; патент США № 6582915; патент США № 6472147).

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

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с EGFR и блокирует связывание EGF с EGFR, который содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137, и дополнительно содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tенсон (SEQ ID NO: 1).

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

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

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

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

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

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

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

Белки чувствительны, или "лабильны", при денатурации, вызванной нагревом, ультрафиолетовым или ионизирующим излучением, изменениями осмоларности окружающей среды и pH при нахождении в жидком растворе, механическим сдвиговым усилием, вызванным фильтрованием через поры малого

размера, ультрафиолетовым излучением, ионизирующим излучением, таким как гамма-облучение, химической или термической дегидратацией или любым другим воздействием или усилием, которые могут привести к разрушению структуры белка. Стабильность молекулы можно определить с применением стандартных способов. Например, стабильность молекулы можно определить путем измерения температуры термического плавления (ТМ) - температуры в градусах Цельсия ($^{\circ}\text{C}$), при которой половина молекул разворачивается, с применением стандартных способов. Как правило, чем выше ТМ, тем более стабильной является молекула. Помимо нагрева способность белка сохранять конкретную трехмерную структуру также может изменяться в зависимости от химической среды.

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

Химическую денатурацию аналогичным образом можно измерить различными способами. К химическим денатурирующим соединениям относятся гидрохлорид гуанидина, тиоцианат гуанидина, карбамид, ацетон, органические растворители (диметилформамид, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия); восстановители (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитротиибензол и гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные детергенты, кислоты (например, соляная кислота (HCl), уксусная кислота (CH_3COOH), галогенуксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды) и специализированные денатурирующие соединения. Количественное определение степени денатурации может быть основано на потере функционального свойства, такого как способность связываться с молекулой-мишенью, или на физико-химических свойствах, таких как склонность к агрегации, открытие доступа к ранее недоступным растворителю остаткам, или на разрушении или образовании дисульфидных связей.

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

Домены FN3 изобретения можно создать в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, как средство повышения валентности и, следовательно, avidности к связыванию молекулы-мишени или создания би- или мультиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более разных молекулы-мишени. Димеры и мультимеры можно создать путем связывания моноспецифических, би- или мультиспецифических белковых каркасов, например, путем включения аминокислотного линкера, например, линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают в себя (GS)₂ (SEQ ID NO: 78), (GGGGS)₅ (SEQ ID NO: 79), (AP)₂ (SEQ ID NO: 80), (AP)₅ (SEQ ID NO: 81), (AP)₁₀ (SEQ ID NO: 82), (AP)₂₀ (SEQ ID NO: 83), A(EAAAK)₅AAA (SEQ ID NO: 84), линкеры. Димеры и мультимеры могут соединяться друг с другом в направлении от N-конца к C-концу. Применение природных и искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell et al., J Biol Chem 264, 5260-5268, 1989; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; патент США № 5 856456).

Биспецифические молекулы, связывающие EGFR и c-Met

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

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

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения, содержащие домены FN3, можно создать путем ковалентного связывания любого EGFR-связывающего домена FN3 и любого c-Met-связывающего домена FN3 напрямую или посредством линкера. Следовательно, первый домен FN3 биспецифической

молекулы может иметь характеристики, описанные выше применительно к EGFR-связывающим доменам FN3, а второй домен FN3 биспецифической молекулы может иметь характеристики, описанные выше применительно к с-Met-связывающим доменам FN3.

В одном варианте осуществления первый домен FN3 биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC_{50} менее чем приблизительно $2,5 \times 10^{-6}$ М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении 1349 со значением IC_{50} менее чем приблизительно $1,5 \times 10^{-6}$ М при измерении в клетках NCI-H441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF.

В другом варианте осуществления первый домен FN3 биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC_{50} в диапазоне от около $1,8 \times 10^{-8}$ М до около $2,5 \times 10^{-6}$ М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении 1349 со значением IC_{50} в диапазоне от около 4×10^{-9} М до около $1,5 \times 10^{-6}$ М при измерении в клетках NCI-H441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF.

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

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

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

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

Второй домен FN3 биспецифической к EGFR/с-Met молекулы изобретения может блокировать связывание HGF с с-Met со значением IC_{50} в диапазоне от около 2×10^{-10} М до около 6×10^{-8} М в анализе на детекцию ингибирования связывания биотинилированного HGF со слитным белком с-Met-Fc в присутствии второго домена FN3. Второй домен FN3 биспецифической к EGFR/с-Met молекулы может 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 второго домена FN3 при использовании одинаковых условий анализа.

Биспецифическая к EGFR/с-Met молекула изобретения может ингибировать сигнализацию EGFR и/или 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 биспецифической к EGFR/с-Met молекулы изобретения при использовании одинаковых условий анализа.

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

Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы изобретения, содержащие первый домен FN3, специфически связывающий EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающий с-Met, обеспечивают значительно более высокое синергичное ингибирование сигнализации EGFR и с-Met и пролиферации опухолевых клеток по сравнению с синергичным ингибированием, наблюдаемым в случае смеси первого и второго доменов FN3. Синергичное ингибирование можно оценивать, например, путем измерения ингибирования фосфорилирования ERK посредством биспецифических к EGFR/с-Met молекул, содержащих домен FN3, и посредством смеси двух моноспецифических молекул, одна из которых связывается с EGFR, а другая - с с-Met. Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы изобретения могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением IC_{50} , которое по меньшей мере приблизительно в 100 раз меньше, например по меньшей мере в 500, 1000, 5000 или 10000 раз меньше по сравнению со значением IC_{50} для смеси двух моноспецифических доменов FN3, что указывает на по меньшей мере 100-кратно более высокую эффективность биспецифических к EGFR/с-Met молекул, содержащих домен FN3, по сравнению со смесью двух моноспецифических доменов FN3. Примеры биспецифических к EGFR/с-Met молекул,

содержащих домен FN3, могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением IC_{50} около 5×10^{-9} М или менее. Фосфорилирование ERK можно измерять с применением стандартных способов и способов, описанных в настоящем документе.

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

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

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180), где X₉ представляет собой M или I; и

петлю BC, содержащую последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181), причем

X₁ представляет собой A, T, G или D;

X₂ представляет собой A, D, Y или W;

X₃ представляет собой P, D или N;

X₄ представляет собой L или отсутствует;

X₅ представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X₆ представляет собой G, D или A;

X₇ представляет собой A, F, G, H или D;

X₈ представляет собой Y, F или L и

второй домен FN3 содержит

тяж C и петлю CD, содержащую последовательность DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), где

X₁₀ представляет собой W, F или V;

X₁₁ представляет собой D, F или L;

X₁₂ представляет собой V, F или L;

X₁₃ представляет собой V, L или T;

X₁₄ представляет собой V, R, G, L, T или S;

X₁₅ представляет собой G, S, A, T или K;

X₁₆ представляет собой E или D и

тяж F и петлю FG, содержащую последовательность TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), где

X₁₇ представляет собой Y, W, I, V, G или A;

X₁₈ представляет собой N, T, Q или G;

X₁₉ представляет собой L, M, N или I;

X₂₀ представляет собой G или S;

X₂₁ представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;

X₂₂ представляет собой I, V или L; и

X₂₃ представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

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

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182)

или последовательность

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSYVFENDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

причем в SEQ ID NO: X и X;

X₁ представляет собой A, T, G или D;

X₂ представляет собой A, D, Y или W;

X₃ представляет собой P, D или N;

X₄ представляет собой L или отсутствует;

X₅ представляет собой D, H, R, G, Y или W;

X₆ представляет собой G, D или A;
 X₇ представляет собой A, F, G, H или D;
 X₈ представляет собой Y, F или L и
 X₉ представляет собой M или I.

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

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
 AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID
 NO: 186),

где

X₁₀ представляет собой W, F или V;
 X₁₁ представляет собой D, F или L;
 X₁₂ представляет собой V, F или L;
 X₁₃ представляет собой V, L или T;
 X₁₄ представляет собой V, R, G, L, T или S;
 X₁₅ представляет собой G, S, A, T или K;
 X₁₆ представляет собой E или D;
 X₁₇ представляет собой Y, W, I, V, G или A;
 X₁₈ представляет собой N, T, Q или G;
 X₁₉ представляет собой L, M, N или I;
 X₂₀ представляет собой G или S;
 X₂₁ представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;
 X₂₂ представляет собой I, V или L; и
 X₂₃ представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

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

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения имеют некоторые структурные характеристики, связанные с их функциональными характеристиками, такими как ингибирование аутофосфорилирования EGFR, например петля FG первого домена FN3, связывающегося с EGFR, которая содержит последовательность HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180), где X₉ представляет собой M или I.

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

ингибируют индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC₅₀ менее чем приблизительно 8×10⁻⁷ М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF;

ингибируют индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением IC₅₀ менее чем приблизительно 8,4×10⁻⁷ М при измерении в клетках NCI-H441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF;

ингибируют индуцированную HGF пролиферацию клеток NCI-H292 со значением IC₅₀ менее чем приблизительно 9,5×10⁻⁶ М, причем пролиферацию клеток индуцируют 10% FBS, содержащим 7,5 нг HGF;

связываются с EGFR с K_D менее чем приблизительно 2,0×10⁻⁸ М;

связываются с c-Met с K_D менее чем приблизительно 2,0×10⁻⁸ М.

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

ингибируют индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC₅₀ в диапазоне от около 4,2×10⁻⁹ М до 8×10⁻⁷ М при измерении в клетках A431 с применением 50 нг/мл человеческого EGF;

ингибируют индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением IC₅₀ от около 2,4×10⁻⁸ М до около 8,4×10⁻⁷ М при измерении в клетках NCI-H441 с применением 100 нг/мл человеческого HGF;

ингибируют индуцированную HGF пролиферацию клеток NCI-H292 со значением IC₅₀ в диапазоне от около 2,3×10⁻⁸ М до около 9,5×10⁻⁶ М, причем пролиферацию клеток индуцируют 10% FBS, содержащим 7,5 нг HGF;

связываются с EGFR с K_D от около 2×10⁻¹⁰ М до около 2,0×10⁻⁸ М;

связываются с c-Met с K_D от около 1×10⁻⁹ М до около 2,0×10⁻⁸ М.

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

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQSEKVGGEAINLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV HNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

где

X₁ представляет собой D;

X₂ представляет собой D;

X₃ представляет собой P;

X₄ отсутствует;

X₅ представляет собой H или W;

X₆ представляет собой A;

X₇ представляет собой F;

X₈ представляет собой Y; и

X₉ представляет собой M или I; и

c-Met-связывающий домен FN3 с последовательностью:

PAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃ PLSAEFTT (SEQ
ID NO: 186),

где

X₁₀ представляет собой W;

X₁₁ представляет собой F;

X₁₂ представляет собой F;

X₁₃ представляет собой V или L;

X₁₄ представляет собой G или S;

X₁₅ представляет собой S или K;

X₁₆ представляет собой E или D;

X₁₇ представляет собой V;

X₁₈ представляет собой N;

X₁₉ представляет собой L или M;

X₂₀ представляет собой G или S;

X₂₁ представляет собой S или K;

X₂₂ представляет собой I и

X₂₃ представляет собой P.

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

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

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

LPAPKNLVVSX₂₄VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVGEX₃₀LTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (SEQ ID NO:
187),

где

X₂₄ представляет собой E, N или R;

X₂₅ представляет собой E или P;

X₂₆ представляет собой L или A;

X₂₇ представляет собой H или W;

X₂₈ представляет собой E или D;

X₂₉ представляет собой E или P;

X₃₀ представляет собой N или V;

X₃₁ представляет собой G или Y;

X₃₂ представляет собой M или I; и

X₃₃ представляет собой E или I; и

второй домен FN3 содержит последовательность

LPAPKNLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂L
TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPLSAX₄₆FTT (SEQ ID NO:
188);

где

X₃₄ представляет собой E, N или R;
 X₃₅ представляет собой E или P;
 X₃₆ представляет собой L или A;
 X₃₇ представляет собой E или P;
 X₃₈ представляет собой V или L;
 X₃₉ представляет собой G или S;
 X₄₀ представляет собой S или K;
 X₄₁ представляет собой E или D;
 X₄₂ представляет собой N или V;
 X₄₃ представляет собой L или M;
 X₄₄ представляет собой G или S;
 X₄₅ представляет собой S или K и
 X₄₆ представляет собой E или I.

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

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

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

Биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу изобретения, содержащую домен FN3, можно создать путем ковалентного соединения EGFR-связывающего домена FN3 и c-Met-связывающего домена FN3 изобретения с применением известных способов. Домены FN3 можно соединить посредством линкера, например, линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают в себя (GS)₂, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₅ (SEQ ID NO: 79), (AP)₂ (SEQ ID NO: 80), (AP)₅ (SEQ ID NO: 81), (AP)₁₀ (SEQ ID NO: 82), (AP)₂₀ (SEQ ID NO: 83), A(EAAAK)₅AAA (SEQ ID NO: 84), линкеры. Применение природных и искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell et al., J Biol Chem 264, 5260-5268, 1989; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; патент США № 5,856,456). Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы изобретения можно соединить вместе С-концом первого домена FN3 к N-концу второго домена FN3 или С-концом второго домена FN3 к N-концу первого домена FN3. Любой EGFR-связывающий домен FN3 можно ковалентно соединять с c-Met-связывающим доменом FN3. Примеры EGFR-связывающих доменов FN3 представляют собой домены с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137, а примеры c-Met-связывающих доменов FN3 представляют собой домены с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32-49 и 111-114. EGFR-связывающие домены FN3, которые нужно соединить с биспецифической молекулой, могут дополнительно содержать инициатор-метионин (Met) на своих N-концах.

Варианты биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, находятся в рамках объема изобретения. Например, в биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу, содержащую домены FN3, 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 исходных молекул. Консервативными называют замены, проводимые внутри семейства аминокислот, связанных по боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты можно разделить на четыре семейства:

- (1) кислые (аспартат, глутамат);
- (2) щелочные (лизин, аргинин, гистидин);
- (3) неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и
- (4) незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин).

Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда объединяют в одну группу ароматических аминокислот. Альтернативно набор аминокислот можно разделить на следующие группы:

- (1) кислые (аспартат, глутамат);
- (2) щелочные (лизин, аргинин, гистидин);

- (3) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), причем серин и треонин могут при необходимости образовывать отдельную группу алифатических-гидроксильных;
- (4) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан);
- (5) амидные (аспарагин, глутамин) и
- (6) серосодержащие (цистеин и метионин) (Stryer (ed.), Biochemistry, 2nd ed, WH Freeman and Co., 1981).

Возможно введение в биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу, содержащую домен FN3, неконсервативных замен, которые включают в себя замены аминокислотных остатков на другие классы аминокислот для улучшения свойств биспецифических молекул. Чтобы быстро определить возможность получения функционального гомолога в результате изменения аминокислотной последовательности полипептида или его фрагмента, можно оценить способность модифицированного полипептида или фрагмента вызывать ответ аналогично немодифицированному полипептиду или фрагменту с применением анализов, описанных в настоящем документе. Пептиды, полипептиды или белки с более чем одной заменой также можно легко протестировать аналогичным образом.

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

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

Фрагменты, увеличивающие период полужизни

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

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

В биспецифические молекулы изобретения можно встроить дополнительные фрагменты, такие как молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), такие как ПЭГ-5000 или ПЭГ-20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например, лаурат, мирилат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандиовую кислоту, тетрадекандиовую кислоту, октадекандиовую кислоту, докозандиовую кислоту и т.п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго- или полисахариды) для получения желаемых свойств. Эти фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с кодирующими белковый каркас последовательностями, и их можно создавать с помощью стандартных методик клонирования и экспрессии. Альтернативно для прикрепления фрагментов в формируемые рекомбинантным способом молекулы изобретения можно применять хорошо известные способы химического связывания.

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

Моноспецифические и биспецифические молекулы изобретения, которые включают дополнительные фрагменты, можно сравнить по функциональности с помощью ряда известных анализов. Например,

изменение свойств моноспецифических и/или биспецифических молекул вследствие встраивания доменов Fc и/или вариантов домена Fc можно проанализировать в анализах связывания с рецепторами Fc с применением растворимых форм рецепторов, таких как рецепторы FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с применением хорошо известных клеточных анализов для измерения, например, ADCC или CDC или оценки фармакокинетических свойств молекул изобретения на моделях *in vivo*.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева

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

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, который имеет аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137.

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

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

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

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

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

Полинуклеотиды изобретения могут содержать по меньшей мере одну неcodирующую последовательность, такую как промоторная или энхансерная последовательность, интрон, сигнал полиаденилирования, *cis*-последовательность, облегчающую связывание с RepA, и т.п. Полинуклеотидные последовательности также могут содержать дополнительные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты, которые кодируют, например, маркерную последовательность или последовательность тега, такую как гистициновый тег или HA-тег для облегчения очистки или определения белка, сигнальную последовательность, партнер для слитного белка, такой как RepA, Fc или белок покрытия бактериофага, такой как pIX или pIII.

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

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

ocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Выбранная для экспрессии клетка-хозяин может быть получена от млекопитающего или ее можно выбрать из клеток COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых производных, иммортализованных или преобразованных упомянутых клеток. Альтернативно клетку-хозяина можно выбирать из видов или организмов, неспособных к гликозилированию полипептидов, например, прокариотической клетки или организма, такого как BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), и любого из природных или сконструированных штаммов *E. coli*, *Klebsiella* или *Pseudomonas*.

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

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

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

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

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

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

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

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

Домены FN3 изобретения, специфически связывающиеся с c-Met и блокирующие связывание HGF с c-Met, можно применять для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды

рака, которые поддаются лечению посредством с-Met-связывающих доменов FN3 изобретения, включают в себя виды, связанные со сверхэкспрессией с-Met. Примеры видов рака, которые поддаются лечению посредством доменов FN3 изобретения, включают в себя виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичек, рак желудка и рак тимуса.

Section 1.01 Домены FN3 изобретения, специфически связывающиеся с EGFR и блокирующие связывание EGF с EGFR, можно применять для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды рака, которые поддаются лечению посредством доменов FN3 изобретения, включают в себя виды, связанные со сверхэкспрессией EGFR, или варианты. Примеры видов рака, которые поддаются лечению посредством доменов FN3 изобретения, включают в себя виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак предстательной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, рак яичек, рак желудка и рак тимуса.

Введение/фармацевтические композиции

Для терапевтического применения биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3 изобретения, можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество домена или молекулы в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или носителю, с которыми вводят активное соединение. Такие носители могут быть жидкостями, таким как вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4% соляной раствор и 0,3% раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их стерилизацию можно проводить с помощью стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты для регулирования и буферизации pH, стабилизаторы, загустители, увлажняющие и красящие агенты и т. п. Концентрация молекул изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. обычно от менее чем приблизительно 0,5% или по меньшей мере около 1 и до 15 или 20 вес.%, и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Подходящие носители и составы, включая другие белки человека, например, сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см. в особенности pp. 958-989.

Способ введения для терапевтического применения биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домены FN3, EGFR-связывающих доменов FN3 или с-Met-связывающих доменов FN3 может представлять собой любой подходящий путь, обеспечивающий доставку агента в организм хозяина, такой как парентеральное введение, например, внутривенное, внутримышечное,

интраперитонеальное, внутривенное, подкожное, легочное;

чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное); с применением состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, гранул; и содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе; или же с помощью других средств, очевидных для квалифицированного специалиста, которые хорошо известны в данной области. Локализованное введение можно обеспечить, например, путем доставки в сустав, бронхи, брюшную полость, внутрь капсулы, хрящ, полость, клетку, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, простату, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, внутрь пораженных тканей, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Таким образом, фармацевтическую композицию изобретения для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной забуференной воды и от около 1 нг до около 100 мг, например, от около 50 нг до около 30 мг, или более предпочтительно от около 5 до около 25 мг домена FN3 изобретения. Аналогичным образом, фармацевтическая композиция изобретения для внутривенного введения может содержать около 250 мл стерильного раствора Рингера и от около 1 до около 30 мг, например, от около 5 до около 25 мг биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, EGFR-связывающего домена FN3 или с-Met-связывающего домена FN3 изобретения. Фактические способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены

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

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

Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим средством одновременно, последовательно или раздельно. Второе терапевтическое средство может представлять собой химиотерапевтический агент, противоангиогенный агент или цитотоксическое лекарственное средство. При применении для лечения рака биспецифические к EGFR/с-Met молекулы, содержащие домены FN3, EGFR-связывающие домены FN3 или с-Met-связывающие домены FN3, можно применять в комбинации с традиционными средствами лечения рака, такими как хирургия, радиотерапия, химиотерапия или их комбинации. Примеры агентов, которые можно применять в комбинации с доменами FN3 изобретения, представляют собой антагонисты HER2, HER3, HER4, VEGF и белковые ингибиторы тирозинкиназ, такие как Iressa® (гефитиниб) и Tarceva (эрлотиниб).

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

Пример 1. Создание библиотек Tенсон

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

Tенсон:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT

GLKPGTEYTVSIIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO 1):

Создание библиотеки TCL1

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

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

Таблица 2

Библиотека	Конфигурация петли BC	Конфигурация петли FG
WT Tенсон	TAPDAAFD*	KGGHRSN**
TCL1	TAPDAAFD*	XXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
TCL2	#####	#####S##

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

**KGGHRSN: SEQ ID NO: 86.

X обозначает вырожденные аминокислоты, кодируемые NNS-кодонами.

обозначает "разработанное распределение аминокислот", описанное в тексте.

Для создания библиотеки TCL1 выполняли последовательные циклы ПЦР для присоединения промотора Tас, введения вырожденных элементов в петлю F:G и добавления необходимых сайтов рестрикции для конечной сборки. Сначала в два этапа создали последовательность ДНК, содержащую промоторную последовательность и последовательность 5'-фрагмента петли FG Tенсон. В качестве матрицы для ПЦР использовали ДНК, соответствующую полной последовательности гена Tенсон, с праймерами POP2220 (SEQ ID NO: 2) и TC5'toFG (SEQ ID NO: 3). Полученный в результате этой реакции продукт ПЦР использовали в качестве матрицы для следующего цикла ПЦР-амплификации с праймерами 130mer (SEQ ID NO: 4) и Tc5'toFG для завершения присоединения последовательности 5'-фрагмента и промоторной последовательности к Tенсон. Затем в петлю F:G вводили диверсификацию путем амплификации ДНК-продукта, полученного на первом этапе, с прямым праймером POP2222 (SEQ ID NO: 5) и обратными праймерами TCF7 (SEQ ID NO: 6), TCF8 (SEQ ID NO: 7), TCF9 (SEQ ID NO: 8), TCF10 (SEQ ID NO: 9), TCF11 (SEQ ID NO: 10) или TCF12 (SEQ ID NO: 11), содержащими вырожденные нуклеотиды. Выполняли по меньшей мере по восемь ПЦР-реакций по 100 мкл для каждой подбиблиотеки, чтобы свести к минимуму число циклов ПЦР и максимально увеличить разнообразие библиотеки. По меньшей мере 5 мкг этого продукта ПЦР очищали из геля и использовали на последующем этапе с праймерами POP2222 (SEQ ID NO: 5) и POP2234 (SEQ ID NO: 12), выполнив в результате прикрепление 6xHis-тега и сайта рестрикции NotI к 3'-концу последовательности Tенсон. Эту ПЦР-реакцию проводили с использованием лишь пятнадцати циклов ПЦР и по меньшей мере 500 нг ДНК-матрицы. Полученный продукт ПЦР очищали из геля, расщепляли рестрикционным ферментом NotI и очищали на колонке Qiagen.

3'-фрагмент библиотеки представляет собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая сайт рестрикции PspOMI, кодирующую область гена герA и cis- и ori-элементы. ПЦР проводили с использованием плазмиды (pCR4Blunt) (Invitrogen), содержащей данный ДНК-фрагмент, с праймерами M13 Forward (прямой) и M13 Reverse (обратный). Полученные продукты ПЦР расщепляли PspOMI в течение ночи и очищали из геля. Для лигирования 5'-участка библиотечной ДНК с 3'-фрагментом ДНК, содержащим ген герA, 2 пмоль 5'-фрагмента ДНК лигировали с эквимольным количеством 3'-фрагмента герA 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. Цитированный библиотечный продукт разделяли на двенадцать ПЦР-амплификаций и проводили ПЦР в 12 циклов с парой праймеров POP2250 (SEQ ID NO: 13) и Did-LigRev (SEQ ID NO: 14). Выход ДНК для каждой подбиблиотеки в библиотеке TCL1 находился в диапазоне от 32 до 34 мкг.

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

Создание библиотеки TCL2

Была создана библиотека TCL2, в которой в Tенсон были рандомизированы как петля BC, так и петля FG, а распределение аминокислот в каждом положении строго контролировалось. В табл. 3 представлено распределение аминокислот в желаемых положениях петель в библиотеке TCL2. Разработанное

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

Таблица 3

Положение остатка*	Остатки дикого типа (д.т.)	Распределение в библиотеке TCL2
22	T	Разработанное распределение
23	A	Разработанное распределение
24	F	50% F+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 Tencon SEQ ID NO: 1.

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

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

Создание библиотеки TCL14

Верхние (BC, DE и FG) и нижние (AB, CD и EF) петли, например, отмеченные поверхности связывания в доменах FN3, разделены бета-тяжами, которые образуют центр структуры FN3. Альтернативные

поверхности, расположенные с двух "сторон" доменов FN3 и имеющие другие формы, нежели поверхности, образованные только петлями, образованы с одной стороны домена FN3 двумя антипараллельными бета-тяжами, бета-тяжами C и F и петлями CD и FG, и в настоящем документе называются поверхностью C-CD-F-FG.

Была создана библиотека, рандомизирующая альтернативную поверхность Tenson путем рандомизации выбранных открытых на поверхности остатков, относящихся к тягам C и F, а также к участкам петель CD и FG, как показано на фиг. 4. Для создания библиотеки использовали вариант Tenson - Tenson27 (SEQ ID NO: 99), имеющий следующие замены по сравнению с Tenson (SEQ ID NO: 1): E11R L17A, N46V, E86I. Полное описание способов, применяемых для разработки этой библиотеки, приведено в заявке на патент США № 13/852930.

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

Скрининг библиотеки

Для выбора EGFR-связывающих доменов из библиотек TCL1 и TCL2 применяли *cis*-дисплей. Рекомбинантный человеческий внеклеточный домен EGFR, слитый с IgG1 Fc (R&D Systems), биотинилировали стандартными способами и применяли для пэннинга (остатки 25-645 полноразмерного EGFR с SEQ ID NO: 73). Для транскрипции и трансляции *in vitro* (ITT) 2-6 мкг библиотечной ДНК инкубировали с 0,1 мМ полного набора аминокислот, компонентами 1X премикса S30 и 30 мкл экстракта S30 (Promega) в общем объеме 100 мкл и инкубировали при 30°C. Через 1 ч 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 мин. 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 ч при комнатной температуре. Для связывания 500 мкл заблокированных реакционных смесей ITT смешивали с 100 мкл комплексов EGFR-Fc:EGF и инкубировали в течение 1 ч 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 мин, амплифицировали ПЦР и присоединяли к ДНК-фрагменту, кодирующему RepA, путем рестрикционного расщепления и лигирования для дополнительных циклов пэннинга. Соединения с высокой аффинностью связывания выделяли путем последовательного понижения концентрации мишени EGFR-Fc в каждом цикле от 200 нМ до 50 нМ и повышения жесткости условий промывки. В циклах 4 и 5 несвязанные и слабо связанные домены FN3 удаляли путем промывки в присутствии 10-кратного молярного избытка небитинилированных EGFR-Fc в течение ночи в PBS.

После пэннинга выбранные домены FN3 амплифицировали ПЦР с применением олигонуклеотидов Tson5new2 (SEQ ID NO: 15) и Tson6 (SEQ ID NO: 16), субклонировали в вектор pET, модифицированный путем включения сайта безлигазного клонирования, и трансформировали в клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) для экспрессии растворимого продукта в *E. coli* с применением стандартных методик молекулярной биологии. К каждому домену FN3 добавляли генную последовательность, кодирующую C-концевой полигистидиновый тег, для обеспечения возможности очистки и обнаружения. Культуры выращивали до достижения оптической плотности 0,6-0,8 в среде 2YT с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина в 96-луночных блоках объемом 1 мл при 37°C, затем добавляли IPTG до 1 мМ и в этот момент температуру снижали до 30°C. Клетки собирали приблизительно через 16 ч путем центрифугирования и замораживали при -20°C. Лизирование клеток проводили путем инкубации каждого осадка в 0,6 мл лизирующего буфера BugBuster® HT (Novagen EMD Biosciences) со встряхиванием при комнатной температуре в течение 45 мин.

Выбор доменов FN3, связывающихся с EGFR на клетках

Для оценки способности разных доменов FN3 связываться с EGFR в более физиологическом контексте измеряли их способность связываться с клетками A431. Клетки A431 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1555) обладают сверхэкспрессией EGFR $\sim 2 \times 10^6$ рецепторов на клетку. Клетки высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Лизаты экспрессирующих домены FN3 бактерий 1000-кратно разбавляли в буфере для окрашивания при FACS (Becton Dickinson) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в трех планшетах. Лизаты удаляли и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата антител к пентагистидину His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с помощью считывателя Acumen 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 ≥ 10 -кратно превосходило фоновый сигнал. Для связывания посредством скрининга отбирали 300 лизатов из библиотеки TCL14, получив 58 уникальных последовательностей доменов FN3, связывающихся с EGFR.

Выбор доменов FN3, ингибирующих связывание EGF с EGFR на клетках

Чтобы лучше охарактеризовать механизм связывания с EGFR, измеряли способность различных обнаруженных клонов домена FN3 связываться с EGFR в конкуренции с EGF с применением клеток A431 параллельно со скрининговым анализом связывания с A431. Клетки A431 высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка разбавленного 1:1000 лизата бактерий в течение 1 часа при комнатной температуре в трех планшетах. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по кат. E-3477) добавляли в каждую лунку с конечной концентрацией 30 нг/мл и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза буфером для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (Invitrogen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 600 нм с помощью считывателя Acumen eX3.

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

Экспрессия и очистка идентифицированных доменов FN3, связывающихся с EGFR

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

Анализ методом эксклюзионной хроматографии

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

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

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

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR

Очищенные EGFR-связывающие домены FN3 тестировали на их способность ингибировать стимулированное EGF фосфорилирование EGFR в клетках A431 в одной концентрации. Фосфорилирование EGFR отслеживали с помощью набора EGFR phospho(Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Клетки высевали по 20000/лунка на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл/лунка (Gibco), содержащую GlutaMAX™, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco), и позволяли им прикрепиться на ночь при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в течение ночи в условиях голодания в 100 мкл/лунка среды, не содержащей FBS, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Затем клетки обрабатывали по 100 мкл/лунка предварительно нагретой (37°C) средой без питательных веществ, содержащей EGFR-связывающие домены FN3, в концентрации 2 мкМ в течение 1 ч при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Контроли обрабатывали только средой без питательных веществ. Клетки

стимулировали путем добавления и осторожного перемешивания 100 мкл/лунка подогретой (37°C) среды без питательных веществ, содержащей 100 нг/мл рекомбинантного человеческого EGF (R&D Systems, № по кат. 236-EG) с конечными концентрациями 50 нг/мл EGF, а также 1 мкМ EGFR-связывающего домена FN3 и инкубированием при 37°C, 5% CO₂ в течение 15 мин. Один набор контрольных лунок оставляли без стимуляции в качестве отрицательных контролей. Среду полностью удаляли и клетки лизировали при помощи 100 мкл/лунка лизирующего буфера Complete Lysis Buffer (Meso Scale Discovery) в течение 10 мин при комнатной температуре при встряхивании, как описано в инструкциях производителя. Планшеты для анализа, предназначенные для измерения EGFR, фосфорилированного по тирозиновому остатку 1173 (Meso Scale Discovery), блокировали входящим в комплект блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1,5-2 ч. Затем планшеты промывали 4 раза, используя 200 мкл/лунка 1X Tris Wash Buffer (Meso Scale Discovery). Аликвоты клеточных лизатов (30 мкл/лунка) переносили в планшеты для анализа, которые закрывали пленкой для герметизации планшетов (VWR), и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч. Планшеты для анализа промывали 4 раза, по 200 мкл/лунка Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли по 25 мкл ледяного раствора детекторного антитела (Meso Scale Discovery), стараясь избежать появления пузырей. Планшеты инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч, затем промывали 4 раза по 200 мкл/лунка Tris Wash Buffer. Сигналы обнаруживали путем добавления по 150 мкл/лунка буфера считывания (Meso Scale Discovery) и считывали на приборе SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с применением заданных производителем параметров для данного анализа по умолчанию. Процентное ингибирование стимулированного EGF позитивного контрольного сигнала вычисляли для каждого EGFR-связывающего домена FN3.

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR измеряли для 2 32 идентифицированных клонов из библиотек TCL1 и TCL2. 22 из этих клонов ингибировали фосфорилирование EGFR на величину $\geq 50\%$ при концентрации 1 мкМ. После удаления клонов, которые либо плохо экспрессировались, либо были сочтены мультимерами в соответствии с данными эксклюзионной хроматографии, отобрали девять клонов для дополнительной биологической характеристики. Последовательности петель BC и FG данных клонов представлены в табл. 4. Восемь из девяти выбранных клонов имели общую последовательность петли FG (HNVYKDTNMRGL; SEQ ID NO: 95), и между несколькими клонами наблюдали существенное сходство в последовательностях петель BC.

Таблица 4

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

Пример 3. Характеризация EGFR-связывающих доменов FN3, которые ингибируют связывание EGF

Крупномасштабная экспрессия, очистка и удаление эндотоксина

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

Для лизирования клеток оттаявший осадок повторно суспендировали в растворе 1X BugBuster® с добавлением 25 Е/мл Benzonase® (Sigma-Aldrich) и 1 тыс. ЕД/мл rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) в соотношении 5 мл BugBuster® на грамм осадка. Лизирование проводили в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным встряхиванием, затем центрифугировали при 56000 × g в течение 50 мин при 4°C. Супернатант отбирали и фильтровали через фильтр 0,2 мкм, после чего наносили на 5-миллилитровую колонку HisTrap FF, предварительно доведенную до равновесного состояния при помощи буфера А (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) с применением хроматографической системы GE Healthcare ÄKTAexplorer 100s. Колонку промывали буфером А объемом, составляю-

щим 20 объемов колонки, и дополнительно промывали 16% буфером В (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 250 mM имидазола) с объемом, составляющим 6 объемов колонки. Домены FN3 элюировали 50% буфером В с объемом, составляющим 10 объемов колонки, а затем градиентом 50-100% буфера В с объемом, составляющим 6 объемов колонки. Фракции, содержащие белок домена FN3, объединяли, концентрировали с использованием концентратора Millipore 10K MWCO и фильтровали, после чего наносили на колонку HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare), предварительно доведенную до равновесного состояния PBS. Выбирали пик мономерного белка, элюирующийся из эксклюзионной колонки.

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

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

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

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

Связывание выбранных EGFR-связывающих доменов FN3 с EGFR на клетках ("анализ связывания с клетками A431")

Клетки A431 высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Очищенные EGFR-связывающие домены FN3 (от 1,5 нМ до 30 мкМ) добавляли к клеткам (50 мкл) в течение 1 ч при комнатной температуре в трех планшетах. Супернатант удаляли и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата антител к пентагистидину His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с помощью считывателя Acumen eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений EC₅₀. В таблице 5 представлены значения EC₅₀ для каждого из конструкторов в диапазоне от 2,2 до > 2 0 мкМ.

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

Клетки A431 высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Очищенные EGFR-связывающие домены FN3 (от 1,5 нМ до 30 мкМ) добавляли к клеткам (50 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре в трех планшетах. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по кат. E-3477) добавляли в каждую лунку с конечной концентрацией 30 нг/мл и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза буфером для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка.

Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (Invitrogen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 600 нм с помощью считывателя Асипен eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений IC_{50} . В табл. 5 представлены значения IC_{50} для каждого из конструкторов в диапазоне от 1,8 до 121 нМ.

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR (анализ фосфо-EGFR)

Выбранные домены FN3, которые в значительной степени ингибировали стимулированное EGF фосфорилирование EGFR, более полно оценивали путем измерения значений IC_{50} для ингибирования. Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR анализировали при разных концентрациях домена FN3 (от 0,5 нМ до 10 мкМ), как описано выше в разделе "ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR". Строили график зависимости сигнала электрохемилюминесценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определяли значения IC_{50} путем аппроксимации данных сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). В табл. 5 представлены значения IC_{50} для каждого из конструкторов в диапазоне от 18 нМ до > 2,5 мкМ.

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

Ингибирование EGFR-зависимого роста клеток оценивали по измерению жизнеспособности клеток человеческих опухолевых клеточных линий со сверхэкспрессией EGFR, NCI-H292 и NCI-H322 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1848 и CRL-5806 соответственно) после воздействия EGFR-связывающим доменом FN3. Клетки высевали по 500 клеток/лунка (NCI-H292) или по 1000 клеток/лунка (NCI-H322) на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (Nunc), в среду RPMI (Gibco) 100 мкл/лунка, содержащую GlutaMAX™ и 10 мМ HEPES, с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco), и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Клетки обрабатывали фосфатно-буферным соляным раствором (PBS), содержащим разные концентрации EGFR-связывающих доменов FN3, по 5 мкл/лунка. Контроли обрабатывали 5 мкл/лунка только PBS или 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты в PBS. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 120 ч. Жизнеспособные клетки обнаруживали путем добавления 75 мкл/лунка реагента CellTiter-Glo® (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 2 мин и инкубацией в темноте при комнатной температуре в течение дополнительных 10 мин. Планшеты считывали на считывателе для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices) в режиме люминесценции с временем считывания 0,5 с/лунка по сравнению с пустой средой. Строили график зависимости процента роста обработанных PBS клеток от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения IC_{50} определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном с использованием GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). В табл. 5 представлены значения IC_{50} в диапазоне от 5,9 нМ до 1,15 мкМ и от 9,2 нМ до >3,1 мкМ при применении клеток NCI-H292 и NCI-H322 соответственно.

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

Таблица 5

Идентификатор клона домена FN3	SEQ ID NO:	Аффинность к EGFR-Fc (нМ)	Связывание с клетками A431	Конкуренция с EGF на клетках A431	Фосфо-EGFR	Рост NCI- H292	Рост NCI- H322
			EC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ (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	> 20000	55	179	1150	> 3073

Пример 4. Конструирование EGFR-связывающих доменов FN3

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

Таблица 6

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

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

Цистеиновые мутанты доменов FN3 получали из базовой молекулы Tensop и ее вариантов, которые не содержат цистеиновых остатков. Эти мутации можно получить с применением стандартных методик молекулярной биологии, известных в данной области, чтобы ввести уникальный цистеиновый остаток в базовую последовательность Tensop (SEQ ID NO: 1) или в другие домены FN3, чтобы он служил сайтом для химической конъюгации с низкомолекулярными лекарственными средствами, флуоресцентными метками, полиэтиленгликолем или любым числом других химических объектов. Выбираемый для мутации сайт должен удовлетворять определенным критериям. Например, молекула Tensop, в которую вводятся мутации для получения свободного цистеина, должна: (i) хорошо экспрессироваться в *E. coli*; (ii) сохранять высокий уровень растворимости и термической стабильности; и (iii) сохранять связывание с мишенью-антигеном после конъюгации. Поскольку Tensop-каркас содержит всего ~90-95 аминокислот, можно легко сконструировать варианты с одиночным цистеином в каждом положении каркаса и точно определить идеальное (-ые) положение (-я) для химической конъюгации.

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

Конструирование, экспрессия и очистка

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

Химическая конъюгация

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

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

Таблица 7

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Выход белка (мг)	Конъюгация
L1C	0,58	Белок не определялся
P2C	0,28	Да
A3C	1,05	Да
P4C	0,77	Да
K5C	0,19	Да
N6C	0,56	Да
L7C	0,96	Да
V8C	1,40	Да
V9C	0,92	Да
S10C	0,91	Да
E11C	0,82	Да
V12C	0,76	Да
T13C	0,53	Да
E14C	1,05	Да
D15C	1,12	Да
S16C	0,65	Да
A17C	0,70	Нет
R18C	1,14	Да
L19C	0,47	Нет
S20C	1,02	Да
W21C	0,09	Нет белка
D22C	0,80	Да
D23C	0,90	Да
P24C	0,63	Да
W25C	1,24	Да
A26C	1,34	Да
F27C	0,92	Да
Y28C	1,15	Да
E29C	1,10	Да
S30C	0,80	Да
F31C	0,75	Да
L32C	0,64	Да
I33C	0,09	Нет
Q34C	1,14	Да
Y35C	0,85	Нет
Q36C	0,04	Нет белка
E37C	0,84	Нет белка
S38C	0,80	Да
E39C	0,72	Да
K40C	1,20	Да
V41C	0,99	Да
G42C	1,27	Да
E43C	0,22	Да
A44C	0,07	Да
I45C	1,14	Да
V46C	0,14	Да
L47C	1,12	Да
T48C	1,22	Да
V49C	1,10	Да
P50C	0,69	Да
G51C	1,15	Да

S52C	0,24	Да
E53C	1,13	Да
R54C	1,55	Да
S55C	0,88	Да
Y56C	1,71	Нет
D57C	0,09	Нет белка
L58C	0,59	Нет
T59C	0,80	Да
G60C	1,24	Да
L61C	0,05	Нет белка
K62C	1,12	Да
P63C	1,44	Да
G64C	1,30	Да
T65C	0,90	Нет
E66C	0,20	Да
Y67C	0,06	Нет белка
T68C	0,76	Да
V69C	0,62	Нет
S70C	0,59	Да
I71C	0,77	Нет
Y72C	1,22	
G73C	0,83	Да
V74C	0,52	Да
H75C	0,55	Да
N76C	1,10	Да
V77C	1,12	Да
Y78C	1,29	Да
K79C	0,29	Да
D80C	1,23	Да
T81C	0,59	Да
N82C	0,14	Да
M83C	1,03	Да
R84C	1,40	Да
G85C	1,17	Да
L86C	0,52	Да
P87C	1,53	Да
L88C	1,68	Да
S89C	1,20	Да
A90C	0,71	Да
I91C	0,64	Да
F92C	0,05	Нет белка
T93C	0,64	Да
T94C	0,26	~50% конъюгированного
G95C	0,88	Да
83v2His6-cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	1,28	Да

Аналитическая эксклюзионная хроматография

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

Таблица 8

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Процентная доля мономера
L1C	100
P2C	86
A3C	100
P4C	100
K5C	100
N6C	94
L7C	93
V8C	91
V9C	Двойной пик
S10C	80
E11C	100
V12C	66
T13C	82
E14C	96
D15C	97
S16C	75
A17C	93
R18C	93
L19C	83
S20C	94
W21C	Нет белка
D22C	85
D23C	100
P24C	88
W25C	76
A26C	95
F27C	97
Y28C	92
E29C	85
S30C	94
F31C	57
L32C	100
I33C	100
Q34C	97
Y35C	100
Q36C	100
E37C	87
S38C	93
E39C	100
K40C	97
V41C	98
G42C	87
E43C	100
A44C	100
I45C	97
V46C	100

L47C	100
T48C	90
V49C	88
P50C	100
G51C	96
S52C	100
E53C	97
R54C	96
S55C	100
Y56C	97
D57C	100
L58C	67
T59C	100
G60C	100
L61C	нет белка
K62C	95
P63C	92
G64C	100
T65C	83
E66C	100
Y67C	Нет белка
T68C	100
V69C	90
S70C	100
I71C	Двойной пик
Y72C	100
G73C	66
V74C	100
H75C	100
N76C	94
V77C	92
Y78C	90
K79C	100
D80C	79
T81C	86
N82C	100
M83C	91
R84C	100
G85C	95
L86C	83
P87C	98
L88C	98
S89C	96
A90C	100
I91C	100
F92C	Нет белка
T93C	100
T94C	100
G95C	100
83v2His ₆ -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	97

Анализ связывания EGFR

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

Таблица 9

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Количество варианта в анализе: 500 нМ	100 нМ	10 нМ
P2C	0,01	0,00	0,00
A3C	0,82	0,88	0,34
P4C	0,12	0,02	0,02
K5C	0,92	1,06	0,61
N6C	0,89	1,01	0,76
L7C	0,90	1,00	0,35
V8C	0,90	1,03	0,96
V9C	0,93	1,03	0,94
S10C	0,96	1,07	0,83
E11C	0,95	1,08	0,90
V12C	0,93	1,06	0,87
T13C	0,90	1,04	0,87
E14C	1,15	1,27	1,11
D15C	0,97	1,09	0,98
S16C	0,63	1,05	0,88
R18C	0,94	1,05	0,86
S20C	0,91	1,05	0,81
D22C	0,90	1,02	0,84
D23C	0,40	0,20	0,02
P24C	0,83	0,85	0,45
W25C	0,70	0,64	0,38
A26C	0,95	1,06	0,95
F27C	0,23	0,07	0,00
Y28C	0,09	0,01	0,00
E29C	0,93	1,07	0,89
S30C	0,90	1,02	0,90
F31C	0,62	0,34	0,04
L32C	0,91	1,01	0,87
Q34C	0,94	1,03	0,89
S38C	0,82	0,93	0,80
E39C	0,90	1,00	0,90
K40C	0,86	0,95	0,88
V41C	0,95	0,99	0,92
G42C	0,90	0,99	0,84
E43C	0,92	1,04	0,68
I45C	0,93	1,04	0,91
V46C	0,90	1,01	0,61

L47C	0,91	1,02	0,92
T48C	0,93	1,00	0,88
V49C	0,98	1,01	0,96
P50C	0,97	1,05	0,91
G51C	0,92	1,03	0,88
S52C	0,93	1,03	0,78
E53C	0,91	1,02	0,91
R54C	0,93	1,01	0,89
S55C	0,11	0,00	0,00
T59C	0,93	1,04	0,83
G60C	0,93	1,02	0,86
K62C	0,61	0,73	0,64
P63C	0,92	1,02	0,95
G64C	1,36	1,42	1,28
E66C	H/o	H/o	H/o
T68C	0,95	1,04	0,83
S70C	0,93	1,01	0,86
Y72C	0,93	1,00	0,93
G73C	0,21	0,02	0,00
V74C	0,95	1,01	0,76
H75C	0,25	0,19	0,07
N76C	0,91	0,97	0,75
V77C	0,03	0,00	0,03
Y78C	0,68	0,63	0,31
K79C	0,93	0,99	0,90
D80C	0,91	0,97	0,70
T81C	1,02	0,90	0,50
N82C	0,96	0,97	0,56
M83C	0,24	0,04	0,07
R84C	0,98	1,04	0,91
G85C	0,29	0,02	0,19
L86C	0,92	0,96	0,77
P87C	0,91	0,93	0,73
L88C	0,97	1,03	0,95
S89C	1,04	1,02	0,97
A90C	1,01	1,05	0,94
I91C	1,00	1,01	0,90
T93C	1,04	1,05	0,96
G95C	1,00	1,03	1,01
83v2His ₆ -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	1,00	1,00	1,00

Термическая стабильность

Термическую стабильность конъюгатов цистеин-NEM оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Тестировали только конъюгаты, которые были определены как экспрессирующиеся с высокой эффективностью, эффективно конъюгируемые и сохраняющие связывание с EGFR. Кроме того, были исключены цистеиновые варианты внутри петель BC и FG. Данные по стабильности получали путем нагревания 400 мкл аликвоты варианта от 25 до 100°C при скорости нагрева 1°C в минуту в микрокалориметре VP-DSC (MicroCal). Для оценки обратимости термического сворачивания/разворачивания провели на образце второе идентичное сканирование. Для вычисления температуры

плавления полученные данные аппроксимировали в модели разворачивания с 2 состояниями (табл. 10). Из дополнительного анализа были исключены цистеиновые варианты со сниженными температурами плавления ($\leq 63^\circ\text{C}$ или на $> 8^\circ\text{C}$ ниже, чем у исходного белка P54AR4-83v2) или варианты, демонстрирующие необратимое разворачивание: V9C, V12C, T13C, R18C, E29C, E39C, G42C, V49C, P50C, G51C и P63C.

Таблица 10

Цистеиновый вариант P54AR4-83v2	Первое сканирование, T_m ($^\circ\text{C}$)	Второе сканирование, T_m ($^\circ\text{C}$)	Обратимо?
N6C	71	70	Да
V8C	69	69	Да
V9C	46	46	Нет
S10C	68	68	Да
E11C	71	72	Да
V12C	58	58	Да
T13C	63	63	Да
E14C	70	71	Да
D15C	73	73	Да
S16C	68	68	Да
R18C	62	62	Да
S20C	70	70	Да
E29C	63	66	Да
S30C	71	71	Да
L32C	71	70	Да
Q34C	75	74	Да
S38C	65	65	Да
E39C	67	69	Нет
K40C	70	70	Да
V41C	71	71	Да
G42C	65	67	Нет
I45C	69	68	Да
L47C	67	67	Да
T48C	72	72	Да
V49C	54	55	Нет
P50C	63	65	Нет
G51C	61	61	Да
E53C	76	75	Да
R54C	65	65	Да
T59C	67	67	Да
G60C	66	66	Да
K62C	65	65	Да
P63C	60	62	Нет
G64C	70	70	Да
T68C	72	72	Да
S70C	73	72	Да
Y72C	70	69	Да
V74C	68	67	Да

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

Анализ цитотоксичности

Цистеиновые варианты P54AR4-83v2 конъюгировали с цитотоксическим ингибитором тубулина монометилауристатином F (MMAF) посредством отщепляемого ферментом линкера Val-Cit или неотщепляемого линкера PEG4 (VC-MMAF; см. фиг. 2) с применением методологии, описанной для конъюгации с NEM. Выполняли конъюгацию 32 вариантов, оставшихся после исключений на предыдущих этапах, с исходным белком P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 217 и 255) и Tencon (SEQ ID NO: 265) в качестве отрицательного контроля.

Уничтожение клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток человеческой опухолевой линии H1573 со сверхэкспрессией EGFR после воздействия конъюгатов цистеиновых вариантов с цитотоксином. Клетки высевали на черные планшеты с прозрачным дном, обработанные для культивирования клеток (Falcon 353219), в количестве 7000/лунка, 100 мкл на лунку среды RPMI без фенолового красного (Gibco 11835-030) с 5% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco). Клетки оставляли на ночь для прикрепления при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Среду отсасывали из 96-луночного планшета и клетки обрабатывали 50 мкл свежей среды и 50 мкл 2X ингибитора, приготовленного в свежей среде. Жизнеспособность клеток определяли по анализу по конечной точке с помощью Cell TiterGlo (Promega) через 70 ч. Значения IC₅₀ определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном с использованием GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). В табл. 11 приведены значения IC₅₀, полученные на основе данных анализа CellTiter Glo. Среднее значение IC₅₀ для двух повторностей конъюгата 83v2-cys/vcMMAF составляло 0,7 нМ. Четыре из 32 протестированных конъюгатов имели значения IC₅₀, которые более чем в два раза превышали значение для исходного белка (более 1,4 нМ), и были отброшены: L32C, T68C, Y72C и V74C. Кроме того, три конъюгата давали значения IC₅₀, в два раза более эффективные, чем у исходного белка, и они могут особенно хорошо подходить для преобразования в конъюгаты лекарственного средства: N6C, E53C и T93C.

Таблица 11

Вариант	IC ₅₀ (нМ)
N6C	0,16
V8C	0,35
S10C	0,43
E11C	0,94
E14C	0,34
D15C	0,33
S16C	0,75
S20C	0,36
S30C	0,78
L32C	2,92
Q34C	0,74
S38C	0,76
K40C	0,73
V41C	1,13
I45C	0,63
L47C	1,03
T48C	0,59
E53C	0,09
R54C	0,37
T59C	0,44
G60C	1,00
K62C	1,25
G64C	0,36
T68C	3,70
S70C	1,14
Y72C	1,85
V74C	3,13
L88C	0,81
S89C	0,94
A90C	1,00
I91C	0,54
T93C	0,20
83v2His ₆ -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	0,61
83v2His ₆ -cys (SEQ ID NO: 217 и 255)	0,79
Д.т.	146,00
Д.т.	166,30

Конечные цистеиновые варианты

Было показано, что из 96 протестированных положений для 28 цистеиновых вариантов наблюдалось выполнение критериев сохранения высокого уровня экспрессии в *E. coli*, эффективной конъюгации посредством тиол-малеимидной реакции, сохранения связывания с антигеном-мишенью EGFR, сохранения свойств термостабильности и обратимого разворачивания и сохранения способности к уничтожению клеток с высокой экспрессией EGFR при конъюгации цистеинового варианта с цитотоксическим лекарственным средством. Эти положения таковы: N6C (SEQ ID NO: 210 и 248), V8C (SEQ ID NO: 189 и 227), S10C (SEQ ID NO: 190 и 228), E11C (SEQ ID NO: 191 и 229), E14C (SEQ ID NO: 192 и 230), D15C (SEQ ID NO: 193 и 231), S16C (SEQ ID NO: 194 и 232), S20C (SEQ ID NO: 195 и 233), S30C (SEQ ID NO: 196 и 234), Q34C (SEQ ID NO: 197 и 235), S38C (SEQ ID NO: 198 и 236), K40C (SEQ ID NO: 199 и 237), V41C (SEQ ID NO: 200 и 238), I45C (SEQ ID NO: 201 и 239), L47C (SEQ ID NO: 202 и 240), T48C (SEQ ID NO: 203 и 241), E53C (SEQ ID NO: 204 и 242), R54C (SEQ ID NO: 205 и 243), T59C (SEQ ID NO: 206 и 244), G60C (SEQ ID NO: 207 и 245), K62C (SEQ ID NO: 208 и 246), G64C (SEQ ID NO: 209 и 247), T68C (SEQ ID NO: 210 и 248), S70C (SEQ ID NO: 211 и 249), L88C (SEQ ID NO: 212 и 250), S89C (SEQ ID NO: 213 и 251), A90C (SEQ ID NO: 214 и 252), I91C (SEQ ID NO: 215 и 253) и T93C (SEQ ID NO: 216 и 254). Местоположения этих 28 положений в пределах структуры белка 83v2 показаны на фиг. 3.

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

Пэннинг на человеческом c-Met

Проводили скрининг библиотеки TCL14 на биотинилированный внеклеточный домен человеческого c-Met (bt-c-Met) для идентификации доменов FN3, способных к специфическому связыванию с c-Met. Для выбора 3 мкг библиотеки TCL14 транскрибировали и транслировали *in vitro* (IVTT) в линейном экстракте S30 *E. Coli* (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США) и экспрессированную библиотеку блокировали Cis Block (2% BSA (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, штат Миссури, США), 100 мкг/мл ДНК спермы сельди (Promega) и 1 мг/мл гепарина (Sigma-Aldrich)). Для выбора добавляли bt-c-Met в концентрации

ях 400 нМ (цикл 1), 200 нМ (циклы 2 и 3) и 100 нМ (циклы 4 и 5). Связанные элементы библиотеки извлекали с применением магнитных гранул с нейтравидином (Thermo Fisher, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США) (циклы 1, 3 и 5) или магнитных гранул со стрептавидином (Promega) (циклы 2 и 4), а несвязанные элементы библиотеки удаляли путем промывки гранул 5-14 раз 500 мкл PBS-T с последующей 2-кратной промывкой 500 мкл PBS.

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

Продукты циклов 5, 7 и 9 клонировали с помощью ПЦР в модифицированный вектор pET15 (EMD Biosciences, г. Гиббстаун, штат Нью-Джерси, США), содержащий сайт безлигазного клонирования (pET15-LIC), с применением праймеров TCON6 (SEQ ID NO: 30) и TCON5 E86I short (SEQ ID NO: 31), а белки экспрессировали как белки с His6-тегом на C-конце после преобразований и индукции IPTG (конечная концентрация 1 mM, 30°C в течение 16 ч) с применением стандартных протоколов. Клетки собирали путем центрифугирования и затем лизировали с помощью Bugbuster HT (EMD Biosciences) с добавлением 0,2 мг/мл лизоцима из белка куриного яйца (Sigma-Aldrich). Бактериальные лизаты очищали путем центрифугирования и супернатанты переносили в новые 96-луночные планшеты deep-well.

Скрининг на домены FN3, ингибирующие связывание HGF с c-Met. Домены FN3, присутствующие в лизатах *E. coli*, подвергали скринингу на их способность ингибировать связывание HGF с очищенным внеклеточным доменом c-Met в биохимическом формате. Рекомбинантный человеческий химерный белок c-Met Fc (0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/луночка) наносили на 96-луночные планшеты White Maxisorp Plates (Nunc) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты дважды промывали, используя 300 мкл/луночка трис-буферного соляного раствора с 0,05% Tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich) в приборе для промывки планшетов Biotek. Планшеты для анализа блокировали StartingBlock T20 (200 мкл/луночка, Thermo Fisher Scientific, г. Рокленд, штат Иллинойс, США) в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) при встряхивании и повторно дважды промывали 300 мкл TBS-T. Лизаты с доменом FN3 разбавляли в StartingBlock T20 (от 1:10 до 1:100000) с помощью роботизированной системы Hamilton STARplus. Лизаты (50 мкл/луночка) инкубировали на планшетах для анализа в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Без промывки планшетов добавляли bt-HGF (1 мкг/мл в StartingBlock T20, 50 мкл/луночка, биотинилированный) на 30 мин при комнатной температуре при встряхивании. В контрольные лунки, содержащие лизаты Tencon27, добавляли либо Starting Block T20, либо разбавленный bt-HGF. Затем планшеты промывали четыре раза 300 мкл/луночка TBS-T и инкубировали с 100 мкл/луночка Streptavidin-HRP (1:2000 в TBS-T, Jackson ImmunoResearch, г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) в течение 30-40 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты повторно промывали TBS-T четыре раза. Для формирования сигнала на планшет добавляли хемилюминесцентный субстрат, POD Chemiluminescence Substrate (50 мкл/луночка, Roche Diagnostics, г. Индианаполис, штат Индиана, США), полученный в соответствии с инструкциями производителя, и в течение приблизительно 3 мин регистрировали хемилюминесценцию на приборе Molecular Devices M5 с использованием SoftMax Pro. Процентное ингибирование определяли с применением следующих расчетов: $100 - ((RLU_{\text{образец}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}}) / (\text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}})) \times 100$. Значения процентного ингибирования 50% или более считались успешными.

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

Определение IC_{50} для ингибирования связывания HGF с c-Met. Выбранные домены FN3 дополнительно характеризовали в анализе на конкуренцию с HGF. Строили кривые "доза - ответ" для очищенных доменов FN3 с использованием описанного выше анализа (начальные концентрации - 5 мкМ). Вычисляли значения процентного ингибирования. Строили график зависимости % ингибирования от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определяли значения IC_{50} путем аппроксимации данных сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4.

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

значения IC_{50} лишь 0,2 нМ.

Пример 7. Характеризация доменов FN3, связывающихся с с-Met и ингибирующих связывание HGF. Домены FN3 экспрессировали и очищали так, как описано выше в примере 2. Эксклюзионную хроматографию и кинетический анализ проводили так, как описано выше в примерах 1 и 2 соответственно. В табл. 12 показаны последовательности тяжа С, петли CD, тяжа F и петли FG, а также полная аминокислотная последовательность SEQ ID NO: для каждого домена.

Таблица 12

Клон		Петля С	Тяж CD	Петля F	Тяж FG
Название	SEQ ID NO:				
P114AR5P74-A5	32	FDSFWIRYDE	WVGGE	TEYYVNILGV	KGGSISV
P114AR5P75-E9	33	FDSFFIRYDE	FLRSGE	TEYWVTILGV	KGGLVST
P114AR7P92-F3	34	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYIVNIMGV	KGGSISH
P114AR7P92-F6	35	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNILGV	KGGGLSV
P114AR7P92-G8	36	FDSFVIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P92-H5	37	FDSFWIRYLE	FLLGGE	TEYAWQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P93-D11	38	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVGINGV	KGGYSSY
P114AR7P93-G8	39	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYGVTINGV	KGGRVST
P114AR7P93-H9	40	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYWQIIGV	KGGHISL
P114AR7P94-A3	41	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGKISP
P114AR7P94-E5	42	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYAVNIMGV	KGGRVSV
P114AR7P95-B9	43	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGSISV
P114AR7P95-D3	44	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGSISY
P114AR7P95-D4	45	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P95-E3	46	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P95-F10	47	FDSFWIRYFE	FTTAGG	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-G7	48	FDSFWIRYFE	LISTGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP

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

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

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

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

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

Клетки NCI-H441 (№ по кат. НТВ-174, Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США) высевали по 20000 клеток на лунку на покрытые поли-Д-лизином черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США) и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Очищенные домены FN3 (50 мкл/лунка; 0-1000

nM) добавляли к клеткам на 1 ч при 4°C на двух планшетах. Супернатанты удаляли и клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка, BD Biosciences, № по кат. 554657). Клетки инкубировали с биотинилированным антителом к HIS (с разбавлением 1:160 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл/лунка, R&D Systems, № по кат. BAF050) в течение 30 мин при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка), после чего инкубировали с конъюгированными антителами к мышиному IgG1-Alexa 488 (с разбавлением 1:80 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл/лунка, Life Technologies, № по кат. A21121) в течение 30 мин при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка) и оставляли в буфере для окрашивания при FACS (50 мкл/лунка). Определяли полную флуоресценцию на считывателе Acumen eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений EC₅₀. Было обнаружено, что домены FN3 показывают диапазон значений активности связывания со значениями EC₅₀ в диапазоне от 1,4 до 22,0, как показано в табл. 13.

Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования c-Met

Очищенные домены FN3 тестировали на их способность ингибировать стимулированное HGF фосфорилирование c-Met в NCI-H441 с применением набора c-Met phospho(Tyr1349) производства Meso Scale Discovery (г. Гейтерсберг, штат Мериленд, США). Клетки высевали по 20000/лунка на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани, в среду RPMI 100 мкл/лунка (содержащую Glutamax и HEPES, Life Technologies), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Life Technologies) и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в условиях голодания в бессывороточной среде RPMI (100 мкл/лунка) при 37°C с 5% CO₂. Затем к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI (100 мкл/лунка), содержащую домены FN3 в концентрации 20 мкМ и ниже, на 1 ч при 37°C с 5% CO₂. Контроли обрабатывали только средой. Клетки стимулировали 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF (100 мкл/лунка, R&D Systems, № по кат. 294-HGN) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂, в течение 15 мин. Один набор контрольных лунок оставляли без стимуляции в качестве отрицательных контролей. Среду полностью удаляли и лизировали клетки полным лизирующим буфером Complete Lysis Buffer (50 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) в течение 10 мин при комнатной температуре со встряхиванием в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты для анализа, предназначенные для измерения фосфорилированного c-Met, блокировали входящим в комплект блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем планшеты трижды промывали Tris Wash Buffer (200 мкл/лунка, Meso Scale Discovery). Клеточные лизаты (30 мкл/лунка) наносили на планшеты для анализа и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч. Затем планшеты для анализа четырехкратно промывали Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли ледяной раствор детекторного антитела (25 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) на 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием. Планшеты повторно четырехкратно промывали Tris Wash Buffer. Сигналы обнаруживали путем добавления буфера 150 Read Buffer (150 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) и считывания на приборе SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с применением заданных производителем параметров для данного анализа по умолчанию. Строили график зависимости сигнала электрохемилуминесценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определили значения IC₅₀ путем аппроксимации данных сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. Было обнаружено, что домены FN3 ингибировали фосфорилированные c-Met со значениями IC₅₀ в диапазоне от 4,6 до 1415 нМ, как показано в табл. 13. Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток Ингибирование c-Met-зависимого роста клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток U87-MG (Американская коллекция типовых культур, № по кат. HTB-14) после воздействия c-Met-связывающих доменов FN3. Клетки высевали по 8000 клеток на лунку на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл/лунка с добавлением 10% FBS и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Через 24 ч после высева среду отсасывали и к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI. Через 24 ч после обработки бессывороточной средой клетки обрабатывали путем добавления бессывороточной среды, содержащей c-Met-связывающие домены FN3 (30 мкл/лунка). Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч. Жизнеспособные клетки обнаруживали путем добавления 100 мкл/лунка реагента CellTiter-Glo® (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 10 мин. Планшеты считывали на считывателе для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices), настроенном на режим люминесценции, с временем считывания 0,5 секунды/лунка. Строили график зависимости исходных единиц люминесценции (RLU) от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения IC₅₀ определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой "доза - ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. В табл. 13 показаны значения IC₅₀ в диапазоне от 1 нМ до > 1000 нМ.

Таблица 13

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

Клон		Аффинность (Kd, нМ)	Конкуренция с HGF, IC ₅₀ (нМ)	Связывание с клетками H441 (EC ₅₀ , нМ)	Ингибирование pMet в клетках H441 (IC ₅₀ , нМ)	Ингибирование пролиферации клеток U87-MG (IC ₅₀ , нМ)
Название	SEQ ID NO:					
P114ARSP74-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	1,2,9	288,2	2,69,9
P114AR7P94-A3	41	0,4	0,2	1,4	5	9,3
P114AR7P94-E5	42	4,2	0,7	3,4	124,3	195,6
P114AR7P95-B9	43	0,5	0,3	Н/о	9,8	17,4
P114AR7P95D3	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	3,29,7
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

Термическая стабильность с-Met-связывающих доменов FN3

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

Таблица 14

Клон		Термическая стабильность (T _m , °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 8. Создание и характеристика биспецифических к EGFR/c-Met молекул

Создание биспецифических к EGFR/c-Met молекул

Множество комбинаций EGFR- и с-Met-связывающих доменов FN3, описанных в примерах 1-6, соединяли в биспецифические молекулы, способные связываться как с EGFR, так и с с-Met. Кроме того, были созданы и соединены в биспецифические молекулы EGFR-связывающих доменов FN3, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107-110, и с-Met-связывающих доменов FN3, которые имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 111-114. Были созданы синтетические гены, кодирующие аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO 50-72 и 106 (табл. 15), так чтобы сохранялся следующий формат: EGFR-

связывающий домен FN3, затем пептидный линкер, затем с-Met-связывающий домен FN3. Для обеспечения очистки на С-конце встраивали полигистидиновый тег. Помимо этих молекул, описанных в табл. 15, линкер между двумя доменами FN3 варьировали по длине, составу последовательности и структуре в соответствии с указанным в табл. 16. Предусмотрена возможность применения ряда других линкеров для соединения таких доменов FN3. Биспецифические к EGFR/с-Met молекулы экспрессировали и очищали из *E. coli*, как описано применительно к моноспецифическим EGFR или с-Met доменам FN3, с применением этапов IMAC и гелепроникающей хроматографии.

Таблица 15

Биспецифическая к EGFR/с-Met молекула		EGFR-связывающий домен FN3		с-MET-связывающий домен FN3		Линкер	
Идентификационный номер клона	SEQ ID	Идентификационный номер клона	SEQ ID	Идентификационный номер клона	SEQ ID	Последовательность	SEQ ID
ECB1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(GGGGS) ₄	79
ECB2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) ₄	79
ECB3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) ₄	79
ECB4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) ₄	79
ECB5	54	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) ₄	79
ECB6	55	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) ₄	79
ECB7	56	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) ₄	79
ECB15	57	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81
ECB27	58	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB60	59	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81
ECB37	60	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB94	61	P54AR4-83v22	108	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) ₅	81
ECB95	62	P54AR4-83v22	108	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) ₅	81
ECB96	63	P54AR4-83v22	108	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) ₅	81
ECB97	64	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB106	65	P54AR4-83v23	109	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) ₅	81
ECB107	66	P54AR4-83v23	109	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) ₅	81
ECB108	67	P54AR4-83v23	109	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) ₅	81
ECB109	68	P54AR4-83v23	109	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB118	69	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) ₅	81
ECB119	70	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) ₅	81
ECB120	71	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) ₅	81
ECB121	72	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB91	106	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB18	118	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB28	119	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB38	120	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81
ECB39	121	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81

Таблица 16

Линкер	SEQ ID NO:	Длина линкера в аминокислотах	Структура
GS	78	2	Неупорядоченная
GGGGS	105	5	Неупорядоченная
(GGGGS) ₄	79	20	Неупорядоченная
(AP) ₂	80	4	Жесткая
(AP) ₅	81	5	Жесткая
(AP) ₁₀	82	20	Жесткая
(AP) ₂₀	83	40	Жесткая
A (EAAAk) ₅ AAA	84	29	α-спиральная

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

Клетки NCI-H292 высевали на 96-луночные планшеты в среду RPMI, содержащую 10% FBS. Через 24 ч среду заменяли на бессывороточную RPMI. Через 24 ч после бессывороточной среды клетки обрабатывали различными концентрациями доменов FN3: моноспецифического к EGFR домена FN3 с высокой аффинностью (P54AR4-83v2), моноспецифического к с-Met домена FN3 с низкой аффинностью (P114AR5P74-A5), смеси двух моноспецифических к EGFR и с-Met доменов FN3 или биспецифических к

EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3 с низкой аффинностью к с-Met, соединенный с доменом FN3 с высокой аффинностью к EGFR (ECB1). Клетки обрабатывали в течение 1 ч моноспецифическими или биспецифическими молекулами и затем стимулировали EGF, HGF или комбинацией EGF и HGF в течение 15 мин при 37°C, 5% CO₂. Клетки лизировали лизирующим буфером MSD и оценивали сигнализацию в клетках с применением соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

Домен FN3 с низкой аффинностью к с-Met ингибировал фосфорилирование с-Met со значением IC₅₀, равным 610 нМ (фиг. 6). Как и ожидалось, домен FN3, связывающийся с EGFR, не был способен ингибировать фосфорилирование с-Met, а смесь моноспецифических молекул выглядела идентично только домену FN3, связывающемуся с с-Met. Однако биспецифическая к EGFR/c-Met молекула ингибировала фосфорилирование с-Met с IC₅₀, равным 1 нМ (фиг. 6), т.е. с обеспечением сдвига эффективности более чем на 2 порядка относительно одной моноспецифической к с-Met молекулы.

Потенциал биспецифической к EGFR/c-Met молекулы в отношении увеличения ингибирования фосфорилирования с-Met и/или EGFR посредством эффекта avidности оценивали на множестве типов клеток с различными значениями плотности и соотношениями с-Met и EGFR (фиг. 7). Клетки NCI-H292, NCI-H441 или NCI-H596 высевали на 96-луночные планшеты в среду RPMI, содержащую 10% FBS. Через 24 ч среду заменяли на бессывороточную RPMI. Через 24 ч после бессывороточной среды клетки обрабатывали разными концентрациями моноспецифического EGFR-связывающего домена FN3, моноспецифического с-Met-связывающего домена FN3 или биспецифической к EGFR/c-Met молекулы (ECB5, образована из P53A1R5-17v2 и P114AR7P94-A3). Клетки обрабатывали в течение 1 ч моноспецифическими или биспецифическими молекулами, а затем стимулировали EGF, HGF или комбинацией EGF и HGF в течение 15 мин при 37°C, 5% CO₂. Клетки лизировали лизирующим буфером MSD и оценивали сигнализацию в клетках с применением соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

На фиг. 7 (A-C) показано ингибирование EGFR с помощью моноспецифического EGFR-связывающего домена FN3 по сравнению с биспецифической к EGFR/c-Met молекулой в трех разных клеточных линиях. Для оценки avidности в анализе на фосфорилирование EGFR EGFR-связывающий домен FN3 со средней аффинностью (1,9 нМ) (P53A1R5-17v2) сравнивали с биспецифической к EGFR/c-Met молекулой, содержащей тот же EGFR-связывающий домен FN3, соединенный с с-Met-связывающим доменом FN3 с высокой аффинностью (0,4 нМ) (P114AR7P94-A3). В клетках H292 и H596 ингибирование фосфорилирования EGFR для моноспецифических и биспецифических молекул было сопоставимым (фиг. 7A и 7B), вероятно, вследствие того, что данные клеточные линии имели высокое соотношение рецепторов EGFR и с-Met. Для проверки данной теории оценивали ингибирование фосфорилирования EGFR в клетках NCI-H441, содержащих больше рецепторов с-Met, чем EGFR. Обработка клеток NCI-H441 биспецифической к EGFR/c-Met молекулой снижала IC₅₀ для ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению с моноспецифическим EGFR-связывающим доменом FN3 в 30 раз (фиг. 7C).

Потенциал повышения эффективности в случае биспецифической к EGFR/c-Met молекулы оценивали в анализе фосфорилирования с-Met с применением молекулы с высокой аффинностью к EGFR (0,26 нМ) и средней аффинностью к с-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 с-Met-связывающим доменом FN3 в 134 и 1012 раз соответственно (фиг. 7D и 7E).

Было подтверждено, что повышенная эффективность ингибирования фосфорилирования EGFR и с-Met биспецифическими к EGFR/c-Met молекулами отражается в увеличенном ингибировании сигнализации и пролиферации. В этих экспериментах смесь EGFR- и с-Met-связывающих доменов FN3 сравнивали с биспецифической к EGFR/c-Met молекулой. Как описано в табл. 17 и 18, значения IC₅₀ для фосфорилирования ERK (табл. 17) и пролиферации клеток H292 (табл. 18) были снижены при обработке клеток биспецифической к EGFR/c-Met молекулой по сравнению с моноспецифическими связующими. IC₅₀ для ингибирования фосфорилирования ERK биспецифической к EGFR/c-Met молекулой было в 143 раза ниже, чем в случае смеси двух моноспецифических к EGFR и с-Met доменов FN3, что демонстрирует влияние avidности на эффективность молекул в данном анализе. В табл. 17 моноспецифические EGFR- или с-Met-связывающие домены FN3 ингибируют активность не полностью, и, следовательно, показанные значения IC₅₀ следует считать нижними пределами. Анализ пролиферации выполняли с применением разных комбинаций EGFR- и с-Met-связывающих доменов FN3 либо в виде смеси, либо в виде связанных в биспецифический формат. IC₅₀ для ингибирования пролиферации для биспецифической к EGFR/c-Met молекулы было в 34-236 раз ниже, чем при использовании смеси моноспецифических исходных EGFR- или с-Met-связывающих доменов FN3. Это подтверждает, что эффект avidности, наблюдавшийся на уровне рецепторов (фиг. 6 и 7), преобразуется в улучшение ингибирования сигнализации в клетках (табл. 17) и пролиферации (табл. 18).

Таблица 17

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

Таблица 18

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

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

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

Мышей линии SCID Beige подкожно инокулировали клетками NCI-H292, экспрессирующими человеческий HGF (2,0×10⁶ клеток в Cultrex (Trevigen) в объеме 200 мкл), в дорзальную часть бока каждого животного. Измерения опухолей проводили дважды в неделю до тех пор, пока объем опухоли не составил 150-250 мм³. Затем мышам и/п вводили одну дозу биспецифических к EGFR/c-Met молекул (связанных с альбумин-связывающим доменом для увеличения периода полужизни) или носитель PBS. Через 6 или 72 ч после введения опухоли извлекали и немедленно замораживали в жидком азоте. Образцы крови собирали посредством кардиальной пункции в 3,8% цитрат, содержащий ингибиторы протеаз. Сразу же после сбора образцы крови центрифугировали, полученную плазму переносили в пробирки для образцов и хранили при -80°C. Опухоли взвешивали, разрезали на небольшие части и лизировали в пробирках Lysing Matrix A (LMA), содержащих буфер RIPA с ингибиторами протеаз/фосфатаз HALT (Pierce), 50 мМ фторида натрия (Sigma), 2 мМ активированного ортованадата натрия (Sigma) и 1 мМ PMSF (MesoScale Discovery). Лизаты удаляли из матрицы LMA и центрифугировали для удаления нерастворимого белка. Растворимый белок опухоли количественно определяли в анализе на белок BCA и разбавляли до эквивалентных уровней белка в лизирующем буфере для опухоли. Фосфорилированные c-Met, EGFR и ERK измеряли при помощи планшетов для анализов производства MesoScale Discovery (в соответствии с протоколом производителя и приведенным выше описанием).

На фиг. 6 показаны результаты экспериментов. Каждая биспецифическая к EGFR/c-Met молекула в значительной степени снижала уровни фосфорилированных c-Met, EGFR и ERK как через 6 ч, так и через 72 ч. Данные, представленные на фиг. 6, показывают значимость одновременного ингибирования как c-Met, так и EGFR, а также то, как аффинность биспецифической к EGFR/c-Met молекулы для каждого рецептора влияет на ингибирование расположенной ниже ERK. Молекулы, содержащие высокоаффинные EGFR-связывающие домены FN3 (P54AR4-83v2; показан как элемент "8" на фигуре, K_D=0,26 нМ), ингибировали фосфорилирование EGFR в большей степени, чем молекулы, содержащие среднеаффинные EGFR-связывающие домены FN3 (P53A1R5-17v2; показан как элемент "17" на фигуре, K_D=1,9 нМ), как через 6, так и через 72 ч. Все четыре протестированные биспецифические молекулы полностью ингибировали фосфорилирование ERK в момент времени через 6 ч независимо от аффинности. К 72-

часовому сроку молекулы, содержащие высокоаффинный с-Met-связывающий домен (P114AR7P94-A3; показан как элемент "A3" на фигуре, $K_D=0,4$ нМ), в значительной степени ингибировали фосфорилирование ERK по сравнению со среднеаффинным с-Met-связывающим доменом FN3 (P114AR5P74-A5; показан как элемент "A5" на фигуре; $K_D=10,1$ нМ; фиг. 6).

Концентрацию каждой биспецифической к EGFR/с-Met молекулы измеряли через 6 и 72 ч после введения в крови и в опухоли (фиг. 9). Интересно, что биспецифическая молекула со среднеаффинным EGFR-связывающим доменом (P53A1R5-17v2; $K_D=1,9$ нМ), но высокоаффинным с-Met-связывающим доменом FN3 (P114AR7P94-A3; $K_D=0,4$ нМ) значительно сильнее накапливалась в опухоли через 6 часов по сравнению с другими молекулами, причем различие уменьшалось к 72 ч. Можно предположить, что клетки за пределами опухоли имеют более низкие уровни экспрессии как EGFR, так и с-Met на поверхности, и, следовательно, молекула со средней аффинностью к EGFR не связывается с нормальной тканью так прочно, как EGFR-связывающий домен FN3 с высокой аффинностью. Таким образом, для связывания с опухолью остается больше свободного EGFR-связывающего домена FN3 со средней аффинностью. Таким образом, определение соответствующих значений аффинности к каждому рецептору может позволить обнаружить терапевтическое средство со сниженными значениями системной токсичности и повышенным накоплением в опухоли.

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

Мышей линии SCID Beige подкожно инокулировали клетками NCI-H292, экспрессирующими человеческий HGF ($2,0 \times 10^6$ клеток в Cultrex (Trevigen), 200 мкл), в дорзальную часть бока каждого животного. Через одну неделю после имплантации мышей делили на группы с эквивалентными объемами опухолей (средний объем опухоли = $77,9 \pm 1,7$ мм³). Мышам три раза в неделю вводили биспецифические молекулы и дважды в неделю регистрировали объем опухоли. Ингибирование роста опухоли (TGI) наблюдали при использовании четырех разных биспецифических молекул с различными значениями аффинности к с-Met и EGFR. На фиг. 10 показан благоприятный эффект ингибирования как с-Met, так и EGFR, поскольку наблюдали задержку роста опухоли у мышей, получавших обработку молекулами, содержащими EGFR-связывающий домен FN3 с высокой аффинностью, по сравнению с EGFR-связывающим доменом FN3 со средней аффинностью, когда с-Met-связывающий домен FN3 имел среднюю аффинность (незаштрихованные и заштрихованные треугольники, P54AR4-83v2-P114AR5P74-A5 по сравнению с P53A1R5-17-P114AR5P74-A5). Кроме того, данные показывают значимость наличия с-Met-связывающего домена FN3 с высокой аффинностью, поскольку биспецифические молекулы, содержащие EGFR-связывающие домены FN3 либо с высокой, либо со средней аффинностью, но с-Met-связывающий домен FN3 с высокой аффинностью, показали наибольшую эффективность (пунктирные серые и черные линии, P54AR4-83v2-P114AR7P94-A3 и P53A1R5-17v2-P114AR7P94-A3).

Эффективность биспецифической молекулы и других ингибиторов EGFR и с-Met

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

Клетки H292-HGF культивировали *in vitro* в среде RPMI1640 с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (10% об./об.) и L-глутамина (2 мМ) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO₂. Клетки регулярно пересевали дважды в неделю с обработкой трипсин-ЭДТА. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

Для развития опухоли мышам подкожно инокулировали в область правого бока опухолевыми клетками H292-HGF (2×10^6) в 0,1 мл PBS с Cultrex (1:1). Обработку начинали, когда средний размер опухоли достигал 139 мм³. Введение тестового препарата и число животных в каждой экспериментальной группе показаны в таблице плана эксперимента ниже (табл. 26). Дату инокуляции опухолевыми клетками обозначали как 0 сутки.

Таблица 26

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

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

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

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

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

Основная конечная точка - возможность замедлить рост опухоли или излечить мышей-носителей опухоли. Размер опухоли измеряли дважды в неделю в двух направлениях с помощью штангенциркуля; объем выражали в мм^3 с применением формулы: $V=0,5 a \times b^2$, где a и b представляют собой большей и малый диаметры опухоли соответственно. Затем размер опухоли применяли для вычисления значений как Т-С, так и Т/С. Вычисляли значение Т-С, где Т - время (в сутках), необходимое для того, чтобы опухоль среднего размера в группе лечения достигла 1000 мм^3 , а С - время (в сутках), необходимое для того, чтобы опухоль среднего размера в контрольной группе достигла того же размера. Значение Т/С (в процентах) представляло собой показатель противоопухолевой эффективности; Т и С представляли собой средние объемы в группе обработки и контрольной группе соответственно в заданные сутки. Полную регрессию опухоли (CR) определяли как уменьшение опухолей до предела, который не обнаруживается при пальпации ($62,5 \text{ мм}^3$). Частичную регрессию опухоли (PR) определяли как уменьшение опухолей относительно исходного объема опухоли. Чтобы CR или PR расценивались как устойчивые, требовалось, чтобы CR или PR определялись минимум в течение 3 или более последовательных измерений опухоли.

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

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

Таблица 19. Размеры опухолей в группах обработки

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

Средний размер опухоли в группе, получавшей обработку носителем (группа 1), достиг 1758 мм³ на 23 сутки после инокуляции опухоли. Лечение биспецифической к EGFR/c-Met молекулой при уровне дозы 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 мм³, значение T/C=1%, p=0,004, по сравнению с группой, получавшей носитель, на 23 сутки).

Обработка только кризотинибом при уровне дозы 50 мг/кг (группа 3) не показала противоопухолевой эффективности; средний размер опухоли составил 2102 мм³ на 23 сутки (значение T/C=120%, p=0,944, по сравнению с группой, получавшей носитель).

Обработка только эрлотинибом при уровне дозы 50 мг/кг (группа 4) показала небольшую противоопухолевую эффективность, но не было выявлено достоверных отличий от группы, получавшей носитель; средний размер опухоли составил 1122 мм³ на 23 сутки (значение T/C=64%, p=0,429, по сравнению с группой, получавшей носитель), при этом наблюдалась задержка роста опухоли на 4 суток при размере опухоли 1000 мм³ по сравнению с группой, получавшей носитель.

Комбинация кризотиниба (50 мг/кг, группа 5) и эрлотиниба (50 мг/кг, группа 5) продемонстрировала значительную противоопухолевую активность; средний размер опухоли составил 265 мм³ на 23 сутки (T/C=15%; p=0,008), при этом наблюдалась задержка роста опухоли на 17 суток при размере опухоли 1000 мм³ по сравнению с группой, получавшей носитель.

Обработка только цетуксимабом при уровне дозы 1 мг/мышь (группа 6) не продемонстрировала значительной противоопухолевой активности; средний размер опухоли составил 485 мм³ на 23 сутки (T/C=28%; p=0,018), при этом наблюдалась задержка роста опухоли на 17 суток при размере опухоли 1000 мм³ по сравнению с группой, получавшей носитель. На фиг. 11 показаны значения противоопухолевой активности различных терапевтических средств.

Противоопухолевая активность

Таблица 20

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

Потерю массы тела от средней до тяжелой наблюдали в группе, получавшей носитель, что может быть обусловлено растущей опухолевой нагрузкой; 3 мыши погибли, а 1 мышь усыпили, когда потеря массы тела (BWL) к 23 суткам составила > 20%. Небольшую токсичность биспецифической к EGFR/c-Met молекулы наблюдали в группе 2; 3 мышей усыпили при достижении в период обработки BWL >

20%; масса тела постепенно восстанавливалась при отмене обработки в течение 2-недельного периода наблюдения. Более тяжелую потерю массы тела наблюдали в группе монотерапии кризотинибом или эрлотинибом по сравнению с группой, получавшей носитель, что указывает на связанную с обработкой токсичность. Комбинация кризотиниба и эрлотиниба по существу переносилась на фазе дозирования, но к концу исследования наблюдали сильную потерю массы тела, что может быть связано с возобновлением быстрого роста опухоли в период отсутствия обработки. Монотерапия цетуксимабом переносилась в исследовании хорошо; потерю массы тела наблюдали только к концу исследования из-за возобновления роста опухоли.

Таким образом, биспецифическая к EGFR/c-Met молекула при 25 мг/кг (3 раза в неделю × 3 недели) обеспечивала полный ответ в модели ксенотрансплантации клеток человеческого рака легких H292-HGF мышам линии SCID/Beige. Обработку перенесли 7 из 10 мышей, а у 3 из 10 мышей наблюдали сильную потерю массы тела. На фиг. 11 и в табл. 20 показано влияние различных терапевтических средств на размер опухоли в моменты времени после обработки.

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

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

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

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

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

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

Таблица 21

	K _d (EGFR, нМ)	K _d (c-Met, нМ)	Ингиби- рование pMet в клетках H441 (t ₅₀ , нМ)	H292 ингиби- рование pEGFR в клетках H292 (t ₅₀ , нМ)	H292-HGF ингибирование пролиферации в индуцированных HGF клетках H292 (t ₅₀ , нМ)
ECB15	0,2	2,6	Н/Д	4,2	23
ECB94	1	4,3	53,8	5,1	29,6
ECB95	1,1	6,2	178,8	13,6	383,4
ECB96	1,6	22,1	835,4	24,7	9480
ECB97	1,3	1,7	24,2	16,6	31,0
ECB106	16,7	5,1	53,3	367,4	484,5
ECB107	16,9	9	29,9	812,3	2637
ECB108	15,3	25,5	126,2	814,4	11372
ECB109	17,3	2,1	26	432	573,6

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

Создание биспецифических к EGFR/c-Met молекул

На основе данных, полученных в результате цистеинового сканирования мутанта P54AR4-83v2

(пример 5), для продления периода полужизни также были разработаны цистеиновые мутанты, обозначенные ECB147 (SEQ ID NO: 218 и 256), в биспецифической к EGFR/c-Met молекуле, которая состоит из P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), связывающего cMet P114AR7P95-C5v2 (SEQ ID NO: 114) и альбумин-связывающего домена. Эти три домена соединены линкерами (Ala-Pro) 5 (SEQ ID NO: 81). Были разработаны варианты с одним, двумя или четырьмя цистеинами с заменами на С-конце, в линкерных областях или в положении Lys-62 одного из доменов FN3 (SEQ ID NO: 219-225 и 257-263). Другой биспецифический вариант, ECB82cys (SEQ ID NO: 226 и 264), состоит из P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), P114AR7P94-A3v22 (SEQ ID NO: 111), варианта альбумин-связывающего домена, причем все три домена соединены линкерами AP, и одного С-концевого цистеина. Также для конструирования контрольных конъюгатов применяли дополнительный цистеиновый вариант не нацеленного на мишень каркаса Tencon (SEQ ID NO: 265). Все варианты конструировали, экспрессировали и очищали так, как описано в предыдущих примерах. Чистоту оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Аналитическая эксклюзионная хроматография с применением колонки Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) показывает, что препараты с доменом FN3 не содержат агрегатов и элюируются во время, соответствующее мономерному белку. По данным масс-спектрометрии, массы соответствовали теоретическим массам (табл. 22).

Таблица 22

Название варианта	Расчетная MW (Да)	Экспериментальная MW (Да)
ECB147v1	27895	27894
ECB147v2	27838	27837
ECB147v3	27877	27876
ECB147v4	27895	27894
ECB147v5	27813	27812
ECB147v6	27838	27837
ECB147v7	27927	27926
P54AR4-83v2-cys	11789	11790
Tencon-cys	10820	

Химическая конъюгация

Для химической конъюгации очищенных биспецифических цистеиновых вариантов с малеимид-содержащими молекулами белка сначала восстанавливали с помощью ТСЕР, получив свободные тиолы. 1-2 мг каждого биспецифического цистеинового варианта смешивали с избытком ТСЕР при нейтральном pH (Sigma, № по кат. 646547) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30-60 мин. ТСЕР удаляли путем добавления 3 объемов насыщенного раствора сульфата аммония (4,02 М) с осаждением цистеиновых вариантов. После центрифугирования при 16000-20000×g при 4°C в течение 20 мин и удаления супернатанта осадок белка растворяли в PBS или натрий-фосфатном буфере и сразу же смешивали с 5- или 10-кратным избытком малеимид-содержащей молекулы. Реакционную смесь инкубировали в течение 30-60 мин при комнатной температуре, а затем гасили избытком свободного тиола, например цистеином или β-меркаптоэтанолом, чтобы убрать избыток малеимида. Несвязанный малеимид удаляли при помощи обессоливающих колонок Zeba (Thermo, № по кат. 89890), препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке Tosoh G3000SWxl (№ P4619-14N; 7,8 мм × 30 см; 5 мкм) или путем связывания цистеинового варианта со смолой Ni-NTA, промывки и элюирования по существу так, как описано выше. Конъюгаты характеризовали при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза и масс-спектрометрии. Этот общий способ применяли для конъюгации биспецифических цистеиновых вариантов с молекулами флуоресцеин-малеимида (Thermo, № по кат. 62245), ПЭГ24-малеимида (Quanta Biodesign, № по кат. 10319) и малеимид-цитотоксина с помощью различных линкеров (см. структуры на фиг. 2).

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR Очищенные биспецифические конъюгаты с ПЭГ24-малеимидом тестировали на способность ингибировать стимулированное EGF фосфорилирование EGFR в клетках человеческой опухолевой линии NCI-H292 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1848) с применением набора EGFR phospho(Tyr1173) производства Meso Scale Discovery (г. Гейтерсберг, штат Мериленд, США), а также так, как описано в примере 3. Эти конъюгаты сравнивали с немодифицированным ECB38 (SEQ ID No. 109), который отличается от ECB147 двумя аминокислотами. Конъюгаты и ECB38 ингибировали EGFR с аналогичными значениями IC₅₀, как показано в табл. 23, и этот факт демонстрирует, что модификация в обозначенных сайтах в значительной степени не влияла на связывание с мишенью.

Таблица 23

Название белка	IC ₅₀ (нМ)
ECB38	2, 3
ECB147v3-PEG24	1, 6
ECB147v5-PEG24	0, 9
ECB147v6-PEG24	1, 4
ECB147v7-PEG24	1, 4

Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования с-Met Очищенные биспецифические конъюгаты с ПЭГ24-малеимидом также тестировали на их способность ингибировать стимулированное HGF фосфорилирование с-Met в NCI-H292 с помощью набора с-Met phospho(Tyr1349) производства Meso Scale Discovery (г. Гейтерсберг, штат Мерилэнд, США), а также так, описано в примере 7. Конъюгаты и ECB38 ингибировали сMet с аналогичными значениями IC₅₀, как показано в табл. 24, и этот факт демонстрирует, что модификация в этих сайтах в значительной степени не влияет на связывание с мишенью.

Таблица 24

Название белка	IC ₅₀ (нМ)
ECB38	1, 3
ECB147v3-PEG24	0, 5
ECB147v5-PEG24	0, 4
ECB147v6-PEG24	0, 4
ECB147v7-PEG24	0, 5

Анализ цитотоксичности

Конъюгаты, состоящие из цистеиновых вариантов ECB147, 83v2-cys или Tencon-cys, соединенные с цитотоксическим ингибитором тубулина из семейства ауристативов (фиг. 2), тестировали на зависимость от мишени цитотоксичность в раковых клетках. Ингибитор был присоединен к цистеин-содержащему белку посредством нерасщепляемого линкера PEG₄ или расщепляемого ферментом линкера валин-цитруллин или валин-лизин. Уничтожение клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток человеческих опухолевых линий H1573 и A431 со сверхэкспрессией EGFR, а также EGFR-негативной опухолевой линии MDA-MB-435 после воздействия конъюгатов белок-токсин с применением процедуры, описанной в примере 4. В табл. 25 приведены значения IC₅₀, полученные при анализе либо прибором CellTiter Glo, либо счетчиком объектов IncuCyte для моментов времени 66, 72 или 90 часов. Конъюгаты белок-лекарственное средство продемонстрировали эффективное уничтожение клеток, экспрессирующих антиген-мишень EGFR. Конъюгаты с несколькими лекарственными средствами также продемонстрировали повышенную цитотоксичность во многих протестированных клеточных линиях.

Таблица 25

Конъюгаты MMAE			
Конъюгат	IC ₅₀ H1537 (нМ)	IC ₅₀ A431 (нМ)	IC ₅₀ MDA-MB-435 (нМ)
TenconCys-mal-PEG ₄ -MMAE	H/o	> 500	
TenconCys-mal-PEG ₄ -VC-MMAE	H/o	841	Плохое соответствие
TenconCys-mal-PEG ₄ -VK-MMAE	H/o	4, 5	Плохое соответствие
83v2cys-mal-PEG ₄ -MMAE	H/o	> 500	
83v2cys-mal-PEG ₄ -VC-MMAE	H/o	315	512
83v2cys-mal-PEG ₄ -VK-MMAE	H/o	19, 6	62
Конъюгаты MMAF			
Конъюгат	IC ₅₀ H1537 (нМ)	IC ₅₀ A431 (нМ)	IC ₅₀ MDA-MB-435 (нМ)
TenconCys-mal-PEG ₄ -MMAF	H/o	> 1000	
TenconCys-mal-PEG ₄ -VC-MMAF	996 1541	> 500	> 500
TenconCys-mal-PEG ₄ -VK-MMAF	H/o	> 500	> 500
83v2cys-mal-PEG ₄ -MMAF	H/o	> 1000	
83v2cys-mal-PEG ₄ -VC-MMAF	1, 19 1, 05	1, 6	> 500
83v2cys-mal-PEG ₄ -VK-MMAF	H/o	3, 9	> 500
ECB147v3- (mal-PEG ₄ -VC-MMAF) ₄	0, 15 0, 075	0, 0078 0, 0197	H/o
ECB147v5- (mal-PEG ₄ -VC-MMAF) ₂	0, 056 0, 050	0, 087 0, 071	H/o
ECB82cys-mal-PEG ₄ -VC-MMAF	0, 576 0, 249	1, 1 0, 64	H/o

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Искусственная	Tencon	I.PAPKNI.WSEVTEFDSI.RI.SWTPADAAFDST.TQYQR.SEKVGEATNI.TVPGSERSYDI.TGLKPGTEYRYSIYGVGKGHRSNPLSAEFTT
2	ДНК	Искусственная	POP2220	CGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACC
3	ДНК	Искусственная	TC5'toFG	AACACCGTAGATAGAAAACGGT
4	ДНК	Искусственная	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGTACAATTMTACATA4CCCCATCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGGATCTACCATGCTG
5	ДНК	Искусственная	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	ДНК	Искусственная	TCF7	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNNSNNNSNNNSNNNSNN AACACCGTAGATAGAAAACGGT
7	ДНК	Искусственная	TCF8	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNNSNNNSNNNSNNNSNN SNNAACACCGTAGATAGAAAACGGT
8	ДНК	Искусственная	TCF9	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNNSNNNSNNNSNNNSNN SNNNSNNAACACCGTAGATAGAAAACGGT
9	ДНК	Искусственная	TCF10	GGTGGTGAMTCCGCAGACAGCGGSNNNSNNNSNNNSNNNSNN SNNNSNNNAACACCGTAGA7AGAAAACGGT
10	ДНК	Искусственная	TCF11	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNNSNNNSNNNSNNNSNN SNNNSNNNSNNAACACCGTAGATAGAAAACGGT

11	ДНК	Искусственная	TCF12	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNNSNNNSNNNSNNNSNN SNNNSNNNSNNNSNNAACACCGTAGATAGaAAACGGT
12	ДНК	Искусственная	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG
13	ДНК	Искусственная	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	ДНК	Искусственная	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	ДНК	Искусственная	TconSnew 2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAATGGTGATGGTGATGGTGACCACCGGTGGTGAATTCC GCAGACAG
16	ДНК	Искусственная	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGCGCCGAAAAAC
17	ДНК	Искусственная	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCAACATCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGCCCCAAC T GATCTT C AC C AAAC
18	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQSEKVGGEAINLWPGSERSYDLT GLKPGTFYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
19	PRT	Искусственная	P54AR4-17 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQSEKVGGEAINLWPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	Искусственная	P54AR4-47 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWGYNDDHFDSEKVGGEAINLWPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	Искусственная	P54AR4-48 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFUQYQSEKVGGEAINLWPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	Искусственная	P54AR4-37 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQYQSEKVGGEAINLWPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	Искусственная	54AR4-74 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWGYNDDHFDSEKVGGEAINLWPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Искусственная	P54AR4-31 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQSEKVGGEAINLWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHN VYKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Искусственная	P54AR4-83 без met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGGEAINLWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Искусственная	P54CR4-31 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYGESE KVGEAINLWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGLVGSY VF E H DV MLR LSAEFTT
27	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGGEAiVLTWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	Искусственная	P54CR4-31v2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQES KVGEAiVLTWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGLVGSY VFEHDVMLPLSAIFTT
29	PRT	Искусственная	P54AR4-73v2 без Met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQYQES EKVGGEAiNLTWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
30	ДНК	Искусственная	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC G AA AAA C
31	ДНК	Искусственная	TCON5 E86lshort	GAG CCG CCG CCA CCG GTT TAA TGG TGA TGG TG/i TGG TGA CCA CCG GTG GTG AAG ATC GCA GAC AG
32	PRT	Искусственная	P114AR5P74- A5	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV WGGEAiVLTWPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGG SISVPLSAIFTT
33	PRT	Искусственная	P114AR5P75- E9	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFILRSGEiVLTWPGSERSYDL TGLKPGTEYVVVtiLGVKGLVSTPLSAIFTT
34	PRT	Искусственная	P114AR7P92- F3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAiVLTWPGSERSYDLTGLKPGTEYiVNMIGVKGGS1 SHPLSAIFTT

35	PRT	Искусственная	Pi 14AR7P9 2-F6	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSVVTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYWNILGVKGGLSVPLSAIFTT
36	PRT	Искусственная	P114AR7P92- G8	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37	PRT	Искусственная	P114AR7P92- H5	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38	PRT	Искусственная	P114AR7P93- D11	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39	PRT	Искусственная	P114AR7P9 3-G8	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT DLKPGTEYGVTTINGVKGRVSTPLSAIFTT
40	PRT	Искусственная	P114AR7P93- H9	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41	PRT	Искусственная	P114AR7P9 4-A3	LPAPKNLWSRVTE DSAR LS WTAPDAAF DS F WIRY F E F L GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
42	PRT	Искусственная	Pi 14AR7P9 4-E5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSVVTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYAVNIIVIGVKGGRVSVPLSAIFTT
43	PRT	Искусственная	P114AR7P95- B9	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFL G SG E AI VL TVP G S E RS Y D L TG L KP G TE Y WQIL GV KG G SI SVPLSAIFTT
44	PRT	Искусственная	P114AR7P95- D3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWNIMGVKGGISYPLSAIFTT
45	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-D4	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQILGVKGGYI SI PLSAIFTT
46	PRT	Искусственная	P114AR7P95- E3	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWQIIVIGVKGGTVSPPLSAIFTT
47	PRT	Искусственная	P114AR7P95- F10	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWNIMGVKGGISPPPLSAIFTT
48	PRT	Искусственная	P114AR7P9 5-G7	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYWNIMGVKGGISPPPLSAIFTT
49	PRT	Искусственная	P114AR7P95- H8	LPAP KNLVVS RVTE DSARLS WTAP DAAF DS FVV i RYF E F V SKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGSI SPPLSAIFTT
50	PRT	Искусственная	ECB1	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGSM LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYDEW VGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNIILGVKGGIS VPLSAIFTT
51	PRT	Искусственная	ECB2	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFUQYQES EKVGEAIVLWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGSL PAPKNLWSRVTEDSARLSVVTAPDAAFDSEFWIRYFEFLG SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKIS PPLS.AIFTT
52	PRT	Искусственная	ECB3	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFUQYQES EKVGEAIVLWPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGSM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP DAAF DS F WIRY F E F L GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT

53	PRT	Искусственная	ECB4	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFUQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGM LPAP KNLVVS RVTE DSARLS W TAP D.AAF DS F F i RYDE F LR SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGLVS TPLSAIFTT
54	PRT	Искусственная	ECB5	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP D.AAF DS F WI RY F E F L GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
55	PRT	Искусственная	ECB8	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFUQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP D.AAF DS F WI RY F E F L GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIiGVKGGHIS LPLSAIFTT
58	PRT	Искусственная	ECR7	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGM LPAP KNLVVS RVTE DS ARLS W TAP D.AAF DS F WI RY F E F L GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIiGVKGGHIS LPLSAIFTT
57	PRT	Искусственная	ECB15	MLPAPKNLWSEVTED8ARLSWDDPWAFYE8FUQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLSRVTED SARLSWTAPDAAFDSEFWI RYFEF LGSGEAI VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
58	PRT	Искусственная	ECB27	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLSRVTED SARLSVVTAPDAAFDSEFVlRYDEVWGGEAiVLTVPGSE SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSiSVPLSAIFTT
59	PRT	Искусственная	ECB60	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPKNLSRVT EDSARLSWTAPDAAFDSEFWI RYFEFLGSGEAi VLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT

60	PRT	Искусственная	ECB37	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFUQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYDEVWGGEAiVLTVPGSE SYDLTGLKPGTEYYVNI LGVKGGSiSVPLSAIFTT
61	PRT	Искусственная	ECB94	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAIFTTAPAPAPAPAP L PAP K NL VVS R VTE D SARLSWTAPDAAFDSEFW I RYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGKI SPPLSAI FTT
62	PRT	Искусственная	ECB95	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSEFWiRYFEFVGSGEAiVLTVPGSE SYDLTGLKPGTEYVNI LGVKGGSiSPPLSAIFTT
63	PRT	Искусственная	ECB96	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVSKGDAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSI SPPLSAI FTT
64	PRT	Искусственная	ECB97	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY K DTNi R G L P LSAi FTTAPAP AP APAPLPAP K NL WS R VTE D SARLSWTAPDAAFDSEFWI RYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LSVKGGSiSPPLSAI FTT
65	PRT	Искусственная	ECB106	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGL.PLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWI RYFEF LGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKTSPPISAI FTT
66	PRT	Искусственная	ECB107	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWiRYFEFVGSGEAiVLTVPGSE SYDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSiSPPLSAIFTT
67	PRT	Искусственная	ECB108	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY K DTNi R G L P LSAi FTTAPAP APAPAPLPAP K NLWSRVTE D SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVSKGDAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSiSPPLSAIFTT

68	PRT	Искусственная	ECB109	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd SARLSWTAPDAAFDSEW I RYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LSVKGGSiSPPLSAi FTT
69	PRT	Искусственная	ECB118	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd SARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGKI SPPLSAi FTT
70	PRT	Искусственная	ECB119	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNi RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd S AR L S W TAP D AAF D S F W l R Y F E F VG S G E Ai V L TV P G S E R SYDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSiSPPLSAiFTT
71	PRT	Искусственная	ECB120	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd SARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKGDAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LGVKGGSi SPPLSAi FTT
72	PRT	Искусственная	ECB121	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLiQYQES EKVGEAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSiYGVpfnVY KDTNI RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEd SARLSWTAPDAAFDSEW I RYFEF LGSGEAi VLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNI LSVKGGSiSPPLSAi FTT

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

```

1  mrpsgtagaa  llallaalcp  asraleekkv  cqgtsnkltp  lgtfedhfls
lqrmfnncev
61  vlgngleityv  qrnydlsflk  tiqevagyvl  ialntverip  lenlqiirgn
myyensyala
121  vlsnydankt  glkelpmrnl  qeilhgavrf  snnpalcnve  siqwrdivss
dflshMsmdf
181  qnhlgscqkc  dpscpngscw  gageencqkl  tkiicaqqcs  grcrgkspsd
cchnqcaagc
241  tgpresdclv  crkfrdeatc  kdtcpplmly  npttyqmdvn  pegkysfgat
cvkkcprnyv
301  vtdhgscvra  cgadsyemee  dgvrkckkce  gpcrkvcngi  gigefkdsls
inatnikhfk
361  nctsisgdlh  ilpvafrgds  fthtppldpq  eldilkvtke  itgflligaw
penrtdlhaf
421  enleiirgrt  kqhggqflav  vslnitslgl  rslkeisdgd  viisgnknlc
yantiniwkkk
481  fgtsgqtki  isnrgensck  atgqvchal  spegcwgpep  rdcvscrnvs
rgrecvdkcn
541  llegeprefv  enseciqchp  eclpqamnit  ctgrgpdnci  qcahyidgph
cvktcpagvm
601  genntlvwky  adaghvchlc  hpnctygctg  pglegcptng  pkipsiatgm
vgallllllv
661  algiglfmrr  rhivrkrtrl  rllqerelve  pltpsgaepn  qallrilket
efkkikvlgs
721  gafgtvykgl  wipegekvi  pvaikelrea  tspkankeil  deayvmavsd
nphvcrligi
781  cltstvqlit  qlmpfgclld  yvrehkdng  sqyllnwcvg  iakgmnyled
rrlvhrdlaa
841  rnlvltkpg  vkitdfglak  llgaekeyh  aeggvpiw  malesilhri
ythqsdvwsy
901  gvtvwelmtf  gskpydgipa  seissilekg  erlpqpict  idvymimvkc
wmidadsrpk
961  freliiefsk  mardpqrylv  iqqdermhlp  sptdsnfyra  lmdeedmddv
vdadeylipq
1021  qgffsspsts  rtpllsslsa  tsnnstvac  drnglqscpi  kedsflqrys
sdptgalted
1081  siddtflpvp  eyinqsvpkr  pagsvqnpvy  hnqplnpaps  rdphyqdphs
tavgnpeyln
1141  tvqptcvnst  fdspahwaqk  gshqisldnp  dyqqdffbke  akpngifkgs
taenaeylrv

```

1201 apqssefiga

74	PRT	Homo sapiens	EGF	NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCWGYIG ERCQYRDLKWWEELR
----	-----	--------------	-----	---

SEQ ID NO: 75, PRT, Homo Sapiens, тенаascin-C

```

1  mgamtqllag  vflaflalat  eggvlkkvir  hkrqsgvnat  lpeenqpvvf
nhvyniklpv
61  gsqcsvdles  asgekdlapp  sepsesfgeh  tvdgenqivf  thriniprra
cgcaaapdvk
121  ellsrleele  nlvsslreqc  tagagcclqp  atgrldtrpf  csgrgnfste
gcgcvcepgw
181  kgpncsepec  pgnchlrgrc  idgqcicddg  ftgedcsqla  cpsdcndqgk
cvngvcicfe
241  gyagadcsre  icpvpceeh  gtcvdglcvc  hdgfagddcn  kplclnncyn
rgrcvenecv
301  cdegftgedc  selicpndcf  drgrcingtc  yceegftged  cgkptcphac
htqgrceegq
361  cvcdegfagv  dcsekrpad  chnrgrcvdg  rcecdgftg  adcgelkcpn
gcsghgrcvn
421  gqcvcdegyt  gedcsqlrcp  ndchsrgrcv  egkcvceggf  kgydcsmcsc
pndchqhgrc
481  vngmcvcddg  ytgedcrdrq  cprdcsnrgl  cvdggcvcde  gftgpdcael
scpndchgqg
541  rcvngqcvch  egfmgkdcke  qrcpsdchgq  grcvdggcic  hegftgldcg
qhscpsdcnn
601  lgqcvsgrci  cnegysgedc  sevspkdlv  vtevteetvn  lawdnemrvt
eylvvytpth
661  egglemqfrv  pgdqtstiiq  elepgveyfi  rvfailenkk  sipvsarvat
ylpapeglkf
721  ksiketsvev  ewdpldiafe  tweiifrmMn  kedegaitks  lrrpetsyrq
tglapggqeye
781  islhivknnt  rgpglkrvtt  trldapsqie  vkdvtdttal  itwfkplaei

```

dgieltygik
 841 dvpgdrttid ltedenqysi gnlkpdteye vslisrrgdm ssnpaketft
 tgldaprnlr
 901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt
 tltglrpgte
 961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpla
 kfdryrllys
 1021 lptgqwgvgq lprnttsyvl rglepggeyn vlltaekgrh kskparvkas
 teqapelenl
 1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiiqvqe ankveaarnl tvpgslravd
 ipglkaatpy
 1141 tvsiygvigq yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwda lklnwtapeg
 ayeyffiqvq
 1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitirgvtq dfsttplsve
 vlteevpdmg
 1261 nltvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs
 meipglragt
 1321 pyvtvlhgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dgrlrlnwtaa
 ДHKyehfviq
 1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls
 aeastakepe
 1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrllle tveynisgae
 rtahisglpp
 1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm
 asenafdsfl
 1561 vtvvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp
 lraeiivteae
 1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvfdnf vlkirdtkkq sepleitlla
 pertrditgl
 1681 reateyeiel ygiskgrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw
 raptaqvesf
 1741 rityvpitgg tpsmvtvdgt ktqtrlvkli pgveylvsi amkgfeesep
 vsgsfttald
 1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekvpe itrvtsgntv
 eyaltdlepa
 1861 teytlrifae kgpqksstit akfttdldsp rdlstatevqs etalltwrpp
 rasvtgyllv
 1921 yesvdgtvke vivgpdttsty sladlspsth ytakiqalng plrshMiqti
 fttigllypf
 1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaeal evfcdmtsdg ggwivflrrk
 ngrenfyqnw
 2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaqqgy elrvdlrdhg etafavydkf
 svgdaktryk
 2101 lkvegysgta gdsamayhng sfstfdktd saitncalsy kgafwyrnch
 rvnlmgrygd
 2161 nnhsqgvnwf hwkghehsiq faemklrpsn frnlegrrkr a

76	PRT	Искусст- венная	Fibcon	LdaptcHqvtnvtdtsitvswippsatit gyritytpsnpggepkeiivppsstw titgitpgveywsIyaIkdnqesplvgt qtt
77	PRT	Искусст- венная	10-й домен FN3 фибронектина (FN10)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTiTVYA VTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	Искусст- венная	Линкер	GSGS
79	PRT	Искусст- венная	Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
80	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAP
81	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAPAPAPAP
82	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	Искусст- венная	Линкер	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP PAPAPAPA PAP
84	PRT	Искусственная	Линкер	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKAAA
85	PRT	Искусственная	Петля BC Tencon	TAPDAAFD
86	PRT	Искусственная	Петля GF Tencon	KGGHRSN
87	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17 Петля BC	ADPHGFYD
88	PRT	Искусственная	P54AR4-17 Петля BC	TYDRDGYD
89	PRT	Искусственная	P54AR4-47 Петля BC	WDPFSFYD
90	PRT	Искусственная	P54AR4-48 Петля BC	DDPRGFYE
91	PRT	Искусственная	P54AR4-73 Петля BC	TWPYADLD
92	PRT	Искусственная	P54AR4-74 Петля BC	GYNGDHFD

93	PRT	Искусственная	P54AR4-81 Петля BC	DYDLGVYD
94	PRT	Искусственная	P54AR4-S3 Петля BC	DDPWDFYE
95	PRT	Искусственная	Петли FG EGFR	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	Искусственная	Петли FG EGFR	LGSYYFEHDVM
97	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECB97; P54AR4- 83v22	Atgttgccagcgccgaagaacctggtag ltagcgaggttactgaggac agcgcgctctgagctgggacgatccgt ggcggttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtc ggtgaagcgattgtgctgac cgtcccggtccgagcggttcciacgac ctgaccggttgaagccgggt accgagtaiacggtgagcatctacggtg itcacaigtctataaggaca ctaatatccggtcrgcctctgagcgc
				cattttcaccacc
98	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECB15; P54AR4- 83v2	Atgctgccagcccctaagaatctggtcg tgagcgaagtaaccgagga cagcgcccgcctgagctgggacgaccg tggcggttctatgagtctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagt tggcgaagcgatcgctcctga ccgtcccgggtagcgagcgctcctacga tctgaccggcctgaaaccgg gtacggagtagacggtgiccatttacgg tgttcacaatgtgiataaagac aecaacatgctggcctgccgctgrcgg cgattttcaccacc
99	PRT	Искусственная	tencon 27	LPAPKNLVSVRTEDSARLSWTAPDAAF DSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLS AIFTT
100	PRT	Искусственная	Библиотек а TCL 14	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFXIXYEXXXGAEIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLSA IFTI

> SEQ ID NO: 101

PRT

Homo sapiens

c-Met

1 mkapavlapg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvMk yqlpnftaet
 piqnvilheh
 61 hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanlsgg
 vwkdniHMal
 121 vvdtyyddql iscgsvnrgt cqrhvfphnh tadiqsevhc ifspqieeps
 qcpdcvvsal
 181 gakvlssvkd rfinffvgnt inssyfpdhp lhsisvrrlk etkdgfmflt
 dqsyidvlpe
 241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtriir fcsinsglhs
 ymemplecil
 301 tekrrkrstk kevfnilqaa yvskpgaqla rqigaslndd ilfgvfaqsk
 pdsaepmdrs
 361 amcafpiyv ndffnkivnk nnvrclghfy gpnhehcfnr tllrnssgce
 arrdeyrtef
 421 ttalqrvdlf mgqfsevlit sistfikgdl tianlgtseg rfmqvvsrs
 gpstphvnfl
 481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvitgkki tkiplnlgc rhfqscsqcl
 sappfvqcgw
 541 chdkcvssee clsgtwqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf
 rrnnkfdlkk
 601 trvllgnesc tltlsestmn tlkctvgpam nkhfhMsiii snghgttqys
 tfsyvdpvit
 661 sispkygpma ggtlltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk svnsilecy
 tpaqtistef
 721 avklkidlan retsifsyre dpivyeiht ksfirstwke plnivsflfc
 fasggstitg
 781 vgknlsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsneiicct tpslqqnlq
 lplktkaffm
 841 ldgilskyfd liyvhnvfk pfekpvmism gnenvleikg ndidpeavkg
 evlkgvnsksc
 901 enihlhseav lctvpndllk lnselniewk qaisstvlkg vivqpqnft
 gliagvvsis
 961 talllllgff lwlkkrkqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt
 temvsnesvd
 1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi sspllqntvh
 idlsalnpel
 1081 vqavghvvig psslivhfne vigrghfgcv yhgtilldndg kkihcvksl
 nritdigevs
 1141 qfltegiimk dfshpnvls lgcrlrsegs plvvlpymkh gdlnrfirne
 thnptvkdli
 1201 gfglqvakgm kylaskkfvd rdlaarnclm dekftvkvad fglardmydk
 eyysvhnktg
 1261 aklpvkwmal eslqtqkftt ksdvwsfgvl lwelmtgap pypdvntfdi
 tvyllqgrrl
 1321 lqpeycpdp l yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrisaifs tfigehyvvh
 natyvnkvkv
 1381 apypsllsse DHKddevdtr pasfwets

102	PRT	Homo sapiens	HGF	QRKRNTiHEFKKSAKTTLiKIDFALKIK TKKVNIADQCANRCTRNGLPFTCKAFVFDK ARKQCLWFFFNMS 3GVKK FD LYE: NKDYIRNCIIGKGRSYXGTVSiTSGIKCQP WSSMIPHEHSFLPSSYRG KDL.QENYCRNP RGE:E:GGPwYCPTSrPE:VRYEiVCD iPQCSEiVlECFUCRGiESYRGLMDH TE3GKCQRWDHQTP iHREiKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRP WCYTLDPHTRWEYCAiEl TCADNTMNDTDVPL ETTEGIQGGEGYRGTVNTMNGIPCQRWDSG YPE-IEHDMTPENFKC KDLRENYCRNPDGS ESPWCFTTDPNIRVGYSQiPNCDSHGQDC YRGNGKNYMGNLSQT RSGLTCSMWKDNME DLHRHiFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPW CYTGNPLIPWDYCPiS RCEGDTTPTIVNL DHPVISCATKQLRWGIPTRTNIGvVfvIV SLRYRNKHICGGSUKESVV VLTARQCFP3RD lKOYEAVVLGiHDV'HGRGOEKCKQVLNVSQ LVYGPEGSDLVLMKLAR PAVLDOFV3TDLP NYGCTIPEKTSCSVYGWYTGILINYOGLLRV AHLyMGNEKCSQHHRG KVTlNE3ECAG AEKIGSGPCEGOYGGPLVCEQHkMRMvIGV' iVPGRGCAIPNRPGFV RV'AYYAKWIHKJi LTYKVPOS
-----	-----	--------------	-----	--

103	ДНК	Искусст- венная	> cMET часть ECB97 P114AR7P95 -C5v2	Ctgccggctccgaagaacttggtggtgagcc gtgttaccgaagatagc gcacgccigagclggacggcaccggaigcgg cgltcgatagctticlgg altcgclaisttgagiiictggglagcggig aggcaatsgiiclgacggigcc gggcioigaacgctcciacgatttgaccggt ctgaaaccgggcaccga gtaigiggigaacaiictgagcgitaagggc ggiagcatcagcccaccg ctgagcgcgatcttcacgactggtggiigc
104	ДНК	Искусст- венная	> cMET часть ECB15 P114AR7P94 -A3	Ctgccggcaecgaagaacctggttgcagcc gtgtgaecgaggatag cgcacgltigagciggaccgciccggaigca gcctstgacagcltcigga ttcgitacittgaaiiictgggtagcgggtga ggcgatcgticigacggtgccg ggctctgaacgcagciaigatttgacggggc tgaagccgggtactgagt acgiggitaacaicatgggcgitaagggigg iaaaatcagcccgccait gtccgcgcatcittaccacg
105	PRT	Искусст- венная	линкер	GGGGS
106	PRT	Искусст- венная	ECB91	mipapkniwsevtedsarfswddpwafyesf liqyqesekvgeaivftvpgse rsyditglkpgteytsiygvhnvykdnir gipIsaifttapapapapapLPAP KNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYF EFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILSVKGGISIS PPLSAIFTT
107	PRT	Искусст- венная	P53A1R5- 17v2	ipapkalvvsavtedsariswadphgfydsf iiqyqesakvgeaivitvpgsersy dltglkpgteytsiygvhnvykdnmrgip isaiftt

108	PRT	Искусст- венная	P54AR4- 83v22	papknlwsevtedsarlswwdpwafyesf iiqyqesekvgeaivltvpgsers vdlgtglkpgteyvtvsiygvhnvykdnir glplsaiftt
109	PRT	Искусст- венная	P54AR4- 83v23	papknlwsevtedsarlswwdphafyesf liqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirg iplsaiftt
110	PRT	Искусст- венная	P53A1R5- 17v22	papknlwsevtedsarlswwdphgfydsf iiqyqesekvgeaivl tvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirg iplsaiftt
111	PRT	Искусст- венная	P114AR7P94- A3v22	papknlwsrvtedsarlswwtapdaafdsf wiryfeflgsgeaivitvpgsersyd tgikpgteywnilgvkkgkispplsaift t
112	PRT	Искусст- венная	P114AR9P121- A6v2	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFD FWIRYFEFVSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGV KGGISPPPLSAIFTT
113	PRT	Искусст- венная	P114AR9P122- A7v2	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFD FWIRYFEFVSKGDA VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGV KGGISPPPLSAIFTT
114	PRT	Искусст- венная	P114AR7P95- C5v2	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFWiRYFEFLGSGEAI 7LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILSV KGGISPPPLSAIFTT
115	ДНК	Искусст- венная	ECB97	atgttgccagcgccgaagaacctggtagt tagcgagggttactgaggac

				agcgcgctctgagctgggacgatccgtg ggcgttctac.gagagcittct jatccagtatcaagagagcgagaaagtgcg gtgaagegattgtgctgac cglcccgggctccgagcgttcctacgacc tgaccggtttgaagccgggt accgagtataeggtgagcatctacgggtg tcacaatgtetataaggaca ctaatatccgcggctctgcctctgagcgcc attttcaccaccgcaccggc accggctccggctcctgccccgctgccgg ctccgaagaacttggtggtg agccgigtaccgaagatagcgacgcci gagctggacggcaccgga gcggcggtc.gatagcittctggattcgct attttgagtttctgggtagcggiga jgcaattgtictgacggtgccgggctcig aacgetcctacgatttgac.cg gtetgaaaccgggcaccgagtatgtggtg aacattctgagegttaaggg cggtagcatcagcccaccgctgagcgga tcttcacgactggtgglgac
116	ДНК	Искусст- венная	ЕСВ15	atgctgecagecc.ctaagaatctggtcg tgagcgaagtaaccgaggae agcgcccgcctgagctgggacgacccgtg ggcgttctatgagtccttcct gattcagtalcaagaaagcgaaaaagttg gcgaagcgatcgctcclgac cgtcccggglagcgagcgtcctacgatc lgaccggcclgaaaccggg acggagtacacggtgtccatttacgggtg tcacaatgtgtataaagaca ccaacatgcgtggccigccgctgtcggcg attttcaccaccgcgcigc gccagcgctgcaccggctccgcigccgg
				caccgaagaacctggttgt cagccgtgtgacc.gaggatagcgacgt ttgagctggaccgctccgga gcagcctttgacagcttc.tggattcggt actttgaatitctgggtagcggig aggcgatcgttctgacgglgccgggctcl gaacgcagctatgatttgacg ggcctgaagccgggtactgagtacgtggt taacatcatggcggttaagg gtggtaaaatcagcccgccattgtccgcg atctttaccacg
117	PRT	Искусст- венная	альбумин- связывающий домен	idewllkeakekaieelkkagitsdyfyd linkaktvegynalkdeilka

118	PRT	Искусственная	FCB18	mlpapknlvvsevtedsariswddpwaf yesfliqyqesekvgeaivliv pgsersyditgikpgteyvtvsiygvhnv ykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsariswtapd aafdsfwirydewvggeaivit vpgsersyditgikpgteyyvnilgvkg gsisvplsaifitapapapapapi aeakvianreldkygvsdyykniinnak tvegkcalidellaaip
119	PRT	Искусственная	ECB28	nrilpapknivvsevtedsarlswadph gfydsfliqyqesekvgealvltv pgsersyditgikpgteyivvsrygvhnv ykdtnmrgipisaifttapapapa papipapknlvsvrvtedsariswtapd aafdsfwirydewvggeaivit vpgsersyditgikpgteyyvnilgvkg gsisvplsaifttapapapapapi aeakvianreldkygvsdyykniinnak tvegkalldeilaalp

120	PRT	Искусственная	ECB38	mlpapknlvsevtedsariswddpwaf yesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydliglkpgteyvtvsiygvh ykdtnmrgipisaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsariswtapd aafdsfwiryfeflgsgaivltv pgsersydltgkpgteyvvnimgvkgg kispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnak tvegvkalldeilaalp
121	PRT	Искусственная	ECB39	mlpapknlvsevtedsariswadphgf ydsfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltgkpgteyvtvsiygvh ykdtnmrglplsaifttapapapa papipapknlvsvrvtedsariswtapd aafdsfwiryfeflgsgaivltv pgsersyditgkpgteyvvnirngvkg gkispplsaifttapapapapapi aeakvianreldkygvsdyykniinnak lvegvkalideiaaip
122	PRT	Искусственная	P53A1R5 -17 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWADPHGFY DSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGKLP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	Искусственная	P54AR4- 17 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTYDRDGY DSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGKLP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	Искусственная	P54AR4- 47 c Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNBDH FDSFLiQYQESEKVGEAINLTVPGSERS YDLTGKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNM RGLPLSAEFTT
125	PRT	Искусственная	P54AR4-	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPRGFY

			48 c Met	ESFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMR GLPLSAEFTT
126	PRT	Искусственная	P54AR4- 73 c Met	M L P A P K N L W S E V T E D S L RLSVV TW PYADLDSFLIQY QESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSiY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
127	PRT	Искусственная	54AR4- 74 c Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNBDH FDSFLiQYQESEKVGGEAINLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNM RGLPLSAEFTT
128	PRT	Искусственная	P54AR4- 81 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDYDLGVY FDSFLiQ YQ E S E K V G EAINLTVPG S E R S Y D L T G L KP G T E Y T V S I YGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
129	PRT	Искусственная	P54AR4- 83 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWDDPWAFY ESFLiQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
130	PRT	Искусственная	P54CR4- 31 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAF DSFUQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVM LPLSAEFTT
131	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFY ESFLIQYQESEKVGGEAiVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMR GLPLSAIFTT
132	PRT	Искусственная	P54CR4- 31v2 c Met	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWTAPDAAF DSFLIQYQESEKVGGEAiVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIY GVLGS WFEHDVMLPLSAI FIT
133	PRT	Искусственная	P54AR4-	MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTPYADL

			73v2 с Met	DSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIY GVH NVYKDTNMRGLPL SAEFTT
134	PRT	Искусственная	P53A1RS -17v2 с Met	mipapknivvsevtadsariswadpbgf ydsfliqqesekevgeaivitvpgser sydltglkpgteytsiygvhnvykdt mrglplsaifft
135	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v22 с Met	mipapknwsevtedsarfswddpwafy esfliqqesekevgeaivftvpgse rsydltglkpgteytsiygvhnvykdt nirgiplsaifft
136	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v23 с Met	rnlpapkriivsevtedsariswddph afyesniqqesekevgeaivitvpgser syditglkpgteytsiygvhnvykdt irgiplsaifft
137	PRT	Искусственная	P53A1R5 -17v22 с Met	mlpapknwsevtedsarlswadphgfy dsfliqqesekevgeaivI tvpgser sydltglkpgteytsiygvtnvykdt nirgiplsaifft
138	PRT	Искусственная	ECB1 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSIYGVHNHYKDTNMRG LPLSAI FTTGGGSGGGSGGGG SGGGGMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF D S F W i RYD EVVv'GG Eai VLTVP GSERSYDLTGLKPG TEYYVNi LGVKGGSI SVPLSAi FIT
139	PRT	Искусственная	ECB2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQSEKVGGEAiVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIYGVHNHYKDTNMR GLPLSAI FTTGGGSGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLWSRVTEDSARLSWTA PDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP SERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGGKIS PPLSAIFTT
140	PRT	Искусственная	ECB3 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQSEKVGGEAlVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYG VHNHYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGSGGGSGGGG SGGGGMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEaiVLTVPGSERSY DLTGLKPG TEYQIIGVKGGHISLPLSAIFTT

141	PRT	Искусственная	ECB4 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGEAIVLTVPCSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAI FTTGGGGSGGGSGGGSGGGSGMLPAP KNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFI RYDEFRLRSGEAIIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYWVTiLGVKGLVSTPLSAIFTT
142	PRT	Искусственная	ECB5 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSGMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSY DLTGLKPG TEYWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
143	PRT	Искусственная	ECB6 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSiYGVHNVYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSGMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSY DLTGLKPG TEYWQII GVKGGHi SLPLSAI FTT
144	PRT	Искусственная	ECB7 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSiYGVHNVYKDTNMRGLPLSAI FTTGGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSGMLPAPKNLWSRVTEDSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSY
				DLTGLKPG TEYWQII GVKGGHi SLPLSAI FTT
145	PRT	Искусственная	ECB15 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRY FEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWNIMGVKGGKISPPLSAI FTT
146	PRT	Искусственная	ECB27 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRY DEVWGGEAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYYVNILGVKGGISVPLSAIFTT
147	PRT	Искусственная	ECB60 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPK NLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYDLTGLK PCTEYWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
148	PRT	Искусственная	ECB37 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYD SFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNMRG LPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRY DEVWGGEAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYYVNILGVKGGISVPLSAIFTT

149	PRT	Искусственная	ECB94 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPCSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F W i RYF E F L GS G E AiVL'EVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIL GVKGGKIS PPLSAIFTT
150	PRT	Искусственная	ECB95 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYE SFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVYKDTNi RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL. WS RVTE
				D SAR LS W TAP D AAF D S F WlR YF E FVG S G EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNI LGKGGSI SPPLSAIFTT
151	PRT	Искусственная	ECB96 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSVDDPVVAF YESFLIQYQSESEKVGAEIVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNi RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFE FV'SKGDAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWNILGVKGGISIPPLSAIFTT
152	PRT	Искусственная	ECB97 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYES FLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LSVV TAP D AAF D S F WlRY F E F L GS G E AiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILS VKGGSISP PLSAIFTT
153	PRT	Искусственная	ECB106 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSVDDPHAFYE SFLIQYQSESEKVGAEIV'LTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSiYGVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSVVTAPDAAFDSFWIRYF EFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
154	PRT	Искусственная	ECB107 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYES FLIQYQ ESEKVGAEIVLTV'PGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYG VHNVYKDTNi RGLPLSAi FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F W i RYF E F VG S G EAiVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNiL

				GVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	Искусственная	ECB108 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYE SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPCSERSYDL TGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL 'WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYF EFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EY'WNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
156	PRT	Искусственная	ECB109 без Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYE SFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYGVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFE FLGSGE AIVLTv'PGSERSYDLTGLKPGTEYWNIL SVKGGSI SPPLSAI FTT
157	PRT	Искусственная	ECB118 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FUQYQ ESEKVGAEIVLTVPCSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYGVHNVYKDTNI RGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F WIRYF E F L GS G E AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILG VKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	Искусственная	ECB119 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FUQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYGVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL. WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F WIR YF E FVG S G EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIL

				GVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	Искусственная	ECB120 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WS RVTE D SAR LS W TAP D AAF D S F WI RYF E F VS KG D AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILG VKGGSiS PPLSAiFTT
160	PRT	Искусственная	ECB121 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDS FLiQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYG VHNVKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKNL WSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFE FLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILS VKGGSiSP PLSAiFTT
161	PRT	Искусственная	ECB91 без Met	ipapknlwsevtedsarlswwdpwafyes fliqqesekvgeaivltvpgsers ydlgtglkpgteytsiygvhnvykdnir glpIsaifttapapapapapLPAPK NLVVSrvTFDSARLSVVTAPDAAFDSEWi RYFER.GSGEaiyL.TVP GSERSYDLTGLKPGTEYWNiLSVKGGSiS PPLSAIFTT
162	PRT	Искусственная	ECB18 без Met	Ipapknlvsevtedsarlswwdpwafye sfliqqesekvgeaivltvp gsersydlgtglkpgteytsiygvhnvyk dtnmrglplsaifttapapapap aplpapknlsrvtedsarlswtapdaaf dsfwirydevvvvgeaivltv pgsersydlgtglkpgteyyvriilgvkgg sisvpisaifttapapapapapla

				eakvlanreldkygvsdyyniinnaktv egvkalldeilaalp
163	PRT	Искусственная	ECB28 без Met	IpapknivvsevTedsarlswadphgfyd sfliqyqesekvgeaivltvpg sersydlgtglkpgteytsiygvhnvykd tnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaaf dsfwirydevwggeaivltvp gsersydlgtglkpgteyyvnilgvkggsi svplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyynlinnaktve egvkalldeilaalp
164	PRT	Искусственная	ECB38 без Met	Ipapknlvsevtedsarlswwdpwafye sfliqyqesekvgeaivltvp gsersydlgtglkpgteytsiygvhnvyk dtmrglplsaifttapapapap aplmapknivsvrvtedsarlswtapdaaf dsfwiryfeflgsggeaivltvp gsersydlgtglkpgteyvvrimgvkggk ispplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyynlinnaktv egvkalldeilaalp
165	PRT	Искусственная	ECB39 без Met	lpapknlvsevtedsarlswadphgfy dsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydlgtglkpgteytsiygvhnvyk dtmrglplsaifttapapapapa plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaa fdsfwiryfeflgsggeaivltvpg sersydlgtglkpgteyvvnimgvkggki spplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyynlinnaktv egvkalldeilaalp
166	ДНК	Искусственная	ECB97 без Met	ttgccagcgccgaagaacctgtagtta gcgaggttactgaggacagc

				gcgcgtctgagctgggacgatccgtggg cgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaaagtcggt gaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctg accggtttgaagccgggtacc gagtatacggtagcatctacggtgttc acaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccatt ttcaccaccgcaccggcaccg gctccggctcctgccccgctgccggctc cgaagaacttgggtgtagcc gtgttaccgaagatagcgacgcctgag ctggacggcaccggatgcg gcgttcgatagtcttctggattcgctatt ttgagtttctgggtagcggtaggc aattgttctgacggtgccgggctctgaa cgctcctacgatttgaccggtct gaaaccgggcaccgagtatgtggtgaac attctgagcgttaagggcgggt agcatcagcccaccgctgagcgcatct tcacgactggtggttgc
167	ДНК	Искусственная	ECB15 без Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtga gcgaagtaaccgaggacag cgcccgctgagctgggacgacctgtg gcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttgg cgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgtcctacgatct gaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgt tcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcga ttttcaccaccgcgcctgcgc cagcgctgcaccggctccgctgccggc

				accgaagaacctggtgtca gccgtgtgaccgaggatagcgcacgttt gagctggaccgctccggatg cagcctttgacagcttctggattcgta ctttgaatttctgggtagcggtag gcgatcgttctgacggtgccgggctctg aacgcagctatgatttgacggg cctgaagccgggtactgagtacgtggtt aacatcatggcggttaagggtg gtaaaatcagcccgccattgtccgcgat ctttaccacg
168	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECB97; P54AR4- 83v22 без Met	ttgccagcgccaagaacctggtagtta gcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtggg cgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggt gaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctg accggtttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttc acaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccatt ttcaccacc
169	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECB15; P54AR4- 83v2 без Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtga gcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgaccgtgg gcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttgg cgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgtcctacgatct gaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgt tcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcga ttttcaccacc

170	PRT	Искусственная	ECB94 с C-концевым цистеином	MLPAPKN LVVSEVTEDSARLSWD D PWAFFYESFLIQY QESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAP APAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIR YFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVN ILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
171	PRT	Искусственная	ECB95 с C-концевым цистеином	MLPAPKN LVVSEVTEDSARLSWD D PWAFFYESFLIQY QESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTED SARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVN ILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
172	PRT	Искусственная	ECB96 с C-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPW AFYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSEFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
173	PRT	Искусственная	ECB97 с C-концевым цистеином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPW AFYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV

				VNILSVKGGISPPLSAIFTTC
174	PRT	Искусственная	ECB106 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGISPPLSAIFTTC
175	PRT	Искусственная	ECB107 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSEWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGISPPLSAIFTTC
176	PRT	Искусственная	ECB108 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILGVKGGISPPLSAIFTTC
177	PRT	Искусственная	ECB109 с С-концевым цистеином	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPH AFYESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAP APAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLS WTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILSVKGGISPPLSAIFTTC
178	PRT	Искусственная	ECB91 с С- концевым	mlpapknlwsevtedsarlswwdpwa fyesfliqyqesekvgeaivltvpgs
			цистеином	ersydlgtglkpgteytsiygvhny kdtnirglpIsaifttapapapapap LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDA AFDSEWIRYFEFLGSGEAEIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVK GGISPPLSAIFTTC

> SEQ ID NO: 179
PRT
Искусственная
Петля FG EGFR-связывающего домена FN3
HNVYKDTNX₉RGL;
где X₉ представляет собой M или I
> SEQ ID NO: 180
PRT
Искусственная
Петля FG EGFR-связывающего домена FN3
LGSYVFEHDVML (SEQ ID NO: 180),
> SEQ ID NO: 181
PRT
Искусственная
Петля BC EGFR-связывающего домена FN3
X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181); где
X₁ представляет собой A, T, G или D;
X₂ представляет собой A, D, Y или W;
X₃ представляет собой P, D или N;
X₄ представляет собой L или отсутствует;
X₅ представляет собой D, H, R, G, Y или W;
X₆ представляет собой G, D или A;
X₇ представляет собой A, F, G, H или D; и
X₈ представляет собой Y, F или L.
> SEQ ID NO: 182
PRT
Искусственная
EGFR-связывающий домен FN3
LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQSEKVGGEAINLTVP
GSESYDLTGKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

X₁ представляет собой A, T, G или D;
 X₂ представляет собой A, D, Y или W;
 X₃ представляет собой P, D или N;
 X₄ представляет собой L или отсутствует;
 X₅ представляет собой D, H, R, G, Y или W;
 X₆ представляет собой G, D или A;
 X₇ представляет собой A, F, G, H или D;
 X₈ представляет собой Y, F или L; и
 X₉ представляет собой M или I
 > SEQ ID NO: 183
 PRT
 Искусственная
 EGFR-связывающий домен FN3
 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFEDHVMPLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

где

X₁ представляет собой A, T, G или D;
 X₂ представляет собой A, D, Y или W;
 X₃ представляет собой P, D или N;
 X₄ представляет собой L или отсутствует;
 X₅ представляет собой D, H, R, G, Y или W;
 X₆ представляет собой G, D или A;
 X₇ представляет собой A, F, G, H или D; и
 X₈ представляет собой Y, F или L.
 > SEQ ID NO: 184

PRT

Искусственная

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

DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), где

X₁₀ представляет собой W, F или V;
 X₁₁ представляет собой D, F или L;
 X₁₂ представляет собой V, F или L;
 X₁₃ представляет собой V, L или T;
 X₁₄ представляет собой V, R, G, L, T или S;
 X₁₅ представляет собой G, S, A, T или K; и

X_{16} представляет собой E или D; и
 > SEQ ID NO: 185
 PRT
 Искусственная
 Тяж F и петля FG с-Met-связывающего домена FN3
 TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), где
 X_{17} представляет собой Y, W, I, V, G или A;
 X_{18} представляет собой N, T, Q или G;
 X_{19} представляет собой L, M, N или I;
 X_{20} представляет собой G или S;
 X_{21} представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;
 X_{22} представляет собой I, V или L; и
 X_{23} представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.
 > SEQ ID NO: 186
 PRT
 Искусственная
 с-Met-связывающий домен FN3
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
 AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID
 NO: 186),
 где
 X_{10} представляет собой W, F или V; и
 X_{11} представляет собой D, F или L;
 X_{12} представляет собой V, F или L;
 X_{13} представляет собой V, L или T;
 X_{14} представляет собой V, R, G, L, T или S;
 X_{15} представляет собой G, S, A, T или K;
 X_{16} представляет собой E или D;
 X_{17} представляет собой Y, W, I, V, G или A;
 X_{18} представляет собой N, T, Q или G;
 X_{19} представляет собой L, M, N или I;
 X_{20} представляет собой G или S;
 X_{21} представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;
 X_{22} представляет собой I, V или L; и
 X_{23} представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.
 > SEQ ID NO: 187

PRT

Искусственная

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

LPAPKNLVVSX₂₄VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVGEAIX₃₀LTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (SEQ ID NO:
187), где

X₂₄ представляет собой E, N или R;

X₂₅ представляет собой E или P;

X₂₆ представляет собой L или A;

X₂₇ представляет собой H или W;

X₂₈ представляет собой E или D;

X₂₉ представляет собой E или P;

X₃₀ представляет собой N или V;

X₃₁ представляет собой G или Y;

X₃₂ представляет собой M или I; и

X₃₃ представляет собой E или I;

> SEQ ID NO: 188

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

LPAPKNLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSEFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂L
TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPPLSAX₄₆FTT (SEQ ID NO:
188); где

X₃₄ представляет собой E, N или R;

X₃₅ представляет собой E или P;

X₃₆ представляет собой L или A;

X₃₇ представляет собой E или P;

X₃₈ представляет собой V или L;

X₃₉ представляет собой G или S;

X₄₀ представляет собой S или K;

X₄₁ представляет собой E или D;

X₄₂ представляет собой N или V;

X₄₃ представляет собой L или M;

X₄₄ представляет собой G или S;

X₄₅ представляет собой S или K; и

X₄₆ представляет собой E или I.

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

			метионином	THMRGLPLSAIFTT
198	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S39C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQECEKVGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
199	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K41C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESECVGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
200	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-V42C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKCGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
201	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-I46C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGEACVLTVPGE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
202	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L48C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGEAIVCTVPGE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
203	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T49C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGEAIVLCVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
204	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E54C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSC RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
205	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-R55C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSE CSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
206	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T6C с	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSE

			метионином	RSYDLCGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
207	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G61C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTCLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
208	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K63C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLCPGTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
209	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G65C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPCTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
210	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-N7C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
211	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S71C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVCIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTT
212	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L89C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPCSAIFTT
213	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S9C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPLCAIFTT
214	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2A91C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKD THMRGLPLSCIFTT
215	PRT	Искусственная	P54AR4-	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA

			83v2-I92C с метионином	FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSACFTT
216	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T94C с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFCT
217	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-cys с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTGGHHHHHC
218	PRT	Искусственная	ECB147 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVNVNIMSVKGGSPPLS AIFTTAPSPAPAPAPLAELANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
219	PRT	Искусственная	ECB147v1 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVNVNIMSVKGGSPPLS AIFTTAPSPAPAPAPLAELANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
220	PRT	Искусственная	ECB147v2 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA

				PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLCPGTEYVVNIMSVKGGISPPLS AIFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
221	PRT	Искусственная	ECB147v3 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLCPGTEYVVNIMSVKGGISPPLS AIFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
222	PRT	Искусственная	ECB147v4 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVNIMSVKGGISPPLS AIFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
223	PRT	Искусственная	ECB147v5 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLCPGTEYVVNIMSVKGGISPPLS AIFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD

				EILAALP
224	PRT	Искусственная	ECB147v6 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS AIFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
225	PRT	Искусственная	ECB147v7 с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVNIMSVKGGSPPLS AIFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANREL DKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLD EILAALP
226	PRT	Искусственная	ECB82-cys с метионином	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWA FYESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKD THMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPPLS AIFTTAPAPAPAPAPTIDEWLLKEAKE KAIEELKKAGITSYYFDLINKAKTVE GVNALKDEILKAGGHHHHHHC
227	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2-V8C без метионина	LPAPKNLCVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT

228	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S1C без метионина	LPAPKNLVVCEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
229	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E11C без метионина	LPAPKNLVVSCVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
230	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E14C без метионина	LPAPKNLVVSEVTCD SARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
231	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-D15C без метионина	LPAPKNLVVSEVTECSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
232	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S16C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDCARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
233	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S2C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLCWDDPWF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
234	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S3C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWF YECFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
235	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-Q34C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLICYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
236	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S38C без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQECEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT

			метионина	HMRGLPLSAIFTT
237	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K4C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESECVGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
238	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-V41C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKCGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
239	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-I45C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGACVLTVPGER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
240	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L47C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGCAIVCTVPGER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
241	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T48C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGCAIVLCVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
242	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-E53C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGCAIVLTVPGSCR SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
243	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-R54C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGCAIVLTVPGSEC SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
244	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-T59C без метионина	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGCAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
245	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G6C	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQESEKVGCAIVLTVPGSER

			без метионина	SYDLTCLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
246	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-K62C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
247	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-G64C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPCTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
248	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-N6C без метионина	LPAPKCLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
249	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S7C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVCIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTT
250	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-L88C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPCSAIFTT
251	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-S89C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLCAIFTT
252	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2A9°C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSCIFTT
253	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-I91C без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSACFTT
254	PRT	Искусственная	P54AR4-	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF

			83v2-T93C без метионина	YESFLIQYQSESEKVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFCT
255	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v2-cys без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQSESEKVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTGGHHHHHC
256	PRT	Искусственная	ECB147 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQSESEKVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMSVKGGISPPLSA IFTTAPSPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDDYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
257	PRT	Искусственная	ECB147v1 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQSESEKVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVVNIMSVKGGISPPLSA IFTTAPSPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDDYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
258	PRT	Искусственная	ECB147v2 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWF YESFLIQYQSESEKVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDL TGLCPGTEYVVNIMSVKGGISPPLSA IFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANRELD

				KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAAP
259	PRT	Искусственная	ECB147v3 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLCPGTEYVNVIMSVKGGSPPLSA IFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAAP
260	PRT	Искусственная	ECB147v4 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVNVIMSVKGGSPPLSA IFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAAP
261	PRT	Искусственная	ECB147v5 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDL TGLCPGTEYVNVIMSVKGGSPPLSA IFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAAP
262	PRT	Искусственная	ECB147v6 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSER SYDLTGLCPGTEYTVSIYGVHNVYKDT

				HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVNVIMSVKGGGISPPLSA IFTTAPAPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
263	PRT	Искусственная	ECB147v7 без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPCPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVNVIMSVKGGGISPPLSA IFTTAPCPAPAPAPLAEAKVLANRELD KYGVSDDYYKNLINNAKTVEGVKALLDE ILAALP
264	PRT	Искусственная	ECB82-cys без метионина	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAF YESFLIQYQESEKVGAEIIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDT HMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYVNVIMGVKGGKISPPLSA IFTTAPAPAPAPAPTIDEWLLKEAKEK AIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEG VNALKDEILKAGGHHHHHNC
265	PRT	Искусственная	Tencon-cys	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAA FDSFLIQYQESEKVGAEINLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGHRSN PLSAEFTTGGHHHHHNC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий по меньшей мере одну цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 53 и 88, где указанные остатки домена FN3 соответствуют аминокислотным положениям в SEQ ID NO: 27.

2. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий по меньшей мере одну цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 8, 10, 14, 15, 20, 45, 48, 54, 59 и 64, где указанные остатки домена FN3 соответствуют аминокислотным положениям в SEQ ID NO: 27.

3. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина, содержащий по меньшей мере одну цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 11, 16, 30, 34, 38, 40, 41, 47, 60, 62, 70, 83, 84 и 85, где указанные остатки домена FN3 соответствуют аминокислотным положениям в SEQ ID NO: 27.

4. Пептид по любому из пп.1-3, дополнительно содержащий фрагмент, увеличивающий период полужизни.

5. Пептид по п.4, в котором фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой альбумин-связывающую молекулу, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или, по меньшей мере, участок Fc-области иммуноглобулина.

6. Способ получения пептида домена FN3 с внедренными остатками цистеина по любому из пп.1-5, включающий:

(i) мутагенез нуклеотидной последовательности исходного домена FN3 путем замены одного или более нуклеотидных остатков на нуклеотидные остатки, кодирующие остаток аминокислоты цистеина, для кодирования домена FN3 с внедренными остатками цистеина;

(ii) экспрессию домена FN3 с внедренными остатками цистеина и

(iii) извлечение домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

7. Способ по п.6, где этап мутагенеза включает выполнение сайт-направленного мутагенеза.

8. Способ по п.7, включающий экспрессию домена FN3 с внедренными остатками цистеина в E.coli.

9. Способ по п.7, дополнительно включающий после этапа извлечения реагирование домена FN3 с внедренными остатками цистеина с химическим реагентом, реагирующим с тиольной группой, с созданием химически конъюгированного домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий после этапа реагирования измерение связывания EGFR с химически конъюгированным доменом FN3 с внедренными остатками цистеина.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий после этапа реагирования измерение ингибирования роста клеток опухолевой линии со сверхэкспрессией EGFR после добавления химически конъюгированного домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

12. Способ по п.10, дополнительно включающий после этапа реагирования измерение связывания c-Met с химически конъюгированным доменом FN3 с внедренными остатками цистеина.

13. Способ по п.10, дополнительно включающий после этапа реагирования измерение ингибирования роста клеток опухолевой линии со сверхэкспрессией c-Met после добавления химически конъюгированного домена FN3 с внедренными остатками цистеина.

14. Способ по п.10, в котором реагент, реагирующий с тиольными группами, содержит малеимидный фрагмент.

15. Способ по п.14, в котором реагент, реагирующий с тиольными группами, содержит малеимидный фрагмент, который выбирают из группы, состоящей из NEM, MMAE и MMAF.

16. Способ по п.15, в котором химически конъюгированный домен FN3 с внедренными остатками цистеина имеет значение IC_{50} для роста клеток от около $1,7 \times 10^{-10}$ М до около $1,3 \times 10^{-9}$ М при измерении в клетках H1573 со сверхэкспрессией EGFR.

17. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 242, 248 и 250.

18. Выделенная биспецифическая молекула FN3 с внедренными остатками цистеина, содержащая первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, где первый домен FN3 представляет собой домен FN3 с внедренными остатками цистеина по любому из пп.1-5, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met.

19. Выделенная биспецифическая молекула FN3 с внедренными остатками цистеина по п.18, в которой второй домен FN3 содержит цистеиновую замену в положении, которое выбирают из группы, состоящей из остатков 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 30, 34, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 53, 54, 59, 60, 62, 64, 70, 88, 89, 90, 91 и 93 второго домена FN3.

20. Выделенная биспецифическая молекула FN3 с внедренными остатками цистеина по п.19, содержащая аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 219-226 и 257-264.

21. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п.19, причем молекула химически конъюгирована с реагентом, реагирующим с тиольными группами.

22. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п.21, причем реагент, реагирующий с тиольными группами, представляет собой малеимидный фрагмент.

23. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п.22, в которой малеимидный фрагмент выбирают из группы, состоящей из NEM, ПЭГ24-малеимида, флуоресцеин-малеимида, MMAE и MMAF.

24. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п.23, в которой первый домен FN3 ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC_{50} от около $0,9 \times 10^{-9}$ М до около $2,3 \times 10^{-9}$ М при измерении в клетках NCI-H292 с применением 50 нг/мл человеческого EGF, а второй домен FN3 ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением IC_{50} от около 4×10^{-10} М до около $1,3 \times 10^{-9}$ М при измерении в клетках NCI-H292 с применением 100 нг/мл человеческого HGF.

25. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п.24, имеющая значение IC_{50} для роста клеток, которое выбирают из группы, состоящей из:

(i) от около $5,0 \times 10^{-11}$ М до около $5,8 \times 10^{-10}$ М при измерении в клетках H1573 со сверхэкспрессией EGFR и

(ii) от около $7,8 \times 10^{-12}$ М до около $1,1 \times 10^{-9}$ М при измерении в клетках A731 со сверхэкспрессией EGFR.

26. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п.25, дополнительно содержащая фрагмент, увеличивающий период полужизни.

27. Выделенная биспецифическая молекула с внедренными остатками цистеина по п.26, в которой фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой альбумин-связывающую молекулу, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или, по меньшей мере, участок Fc-области иммуноглобулина.

28. Способ получения выделенной биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина

по любому из пп.18-27, включающий:

(i) мутагенез нуклеотидной последовательности исходной биспецифической молекулы путем замены одного или более нуклеотидных остатков на нуклеотидные остатки, кодирующие остаток цистеина, для кодирования биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина;

(ii) экспрессию биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина и

(iii) извлечение биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

29. Способ по п.28, в котором этап мутагенеза включает выполнение сайт-направленного мутагенеза.

30. Способ по п.29, включающий экспрессию биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина в *E.coli*.

31. Способ по п.29, дополнительно включающий после этапа извлечения реагирование биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина с химическим реагентом, реагирующим с тиольными группами, с созданием химически конъюгированной биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

32. Способ по п.31, дополнительно включающий этап, который выбирают из группы, состоящей из:

(i) измерения связывания с EGFR химически конъюгированной биспецифической молекулой с внедренными остатками цистеина;

(ii) измерения ингибирования стимулированного EGF фосфорилирования EGFR в клеточной линии химически конъюгированной биспецифической молекулой с внедренными остатками цистеина;

(iii) измерения ингибирования стимулированного HGF фосфорилирования c-Met в клеточной линии химически конъюгированной биспецифической молекулой с внедренными остатками цистеина и

(iv) измерения ингибирования роста клеток опухолевой линии со сверхэкспрессией EGFR после добавления химически конъюгированной биспецифической молекулы с внедренными остатками цистеина.

33. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.1, дополнительно включающий метионин на N-конце пептида.

34. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.33, где указанный пептид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 212.

35. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.2, где указанный пептид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244 и SEQ ID NO: 247.

36. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.2, дополнительно включающий метионин на N-конце пептида.

37. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.36, где указанный пептид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 209.

38. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.3, где указанный пептид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246 и SEQ ID NO: 249.

39. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.3, дополнительно включающий метионин на N-конце пептида.

40. Выделенный пептид домена фибронектина типа III (FN3) с внедренными остатками цистеина по п.39, где указанный пептид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 211.

```

SEQ ID NO:
18 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
19 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWYD-RDGYDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
20 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
21 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWDDP-RGFYESFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
22 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWTP-YADLDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
23 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
24 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWYDLGDHFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
25 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
27 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
29 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWTP-YADLDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
107 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
108 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
109 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
110 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
*****
18 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT (94)
19 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
20 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
21 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
22 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
23 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
24 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
25 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
27 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAIFTT
29 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT
107 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAIFTT
108 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGIPLSAIFTT
109 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGIPLSAIFTT
110 LKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGIPLSAIFTT
*****
*****

```

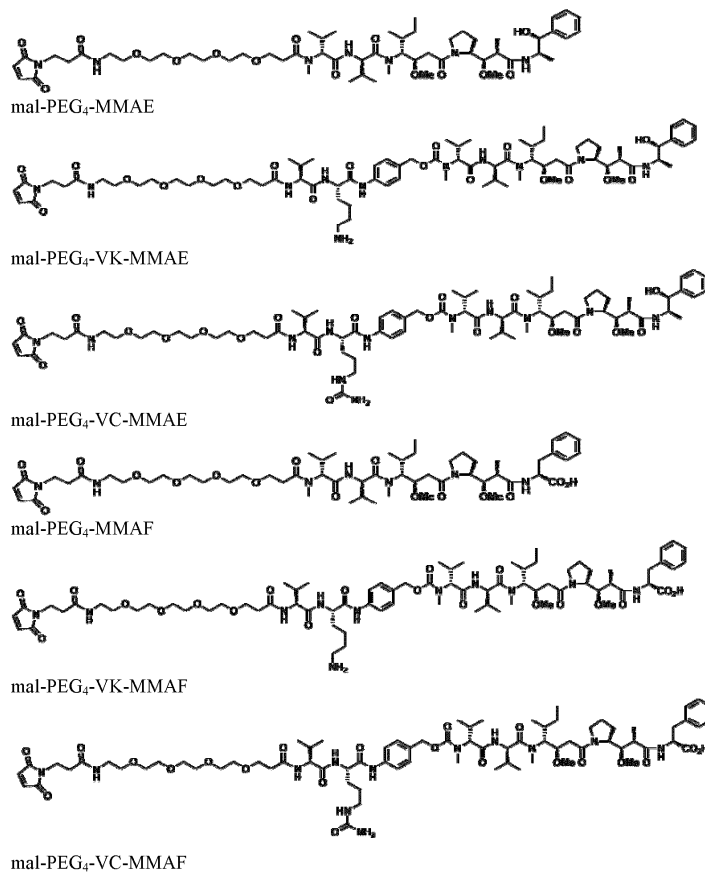
Фиг. 1А

```

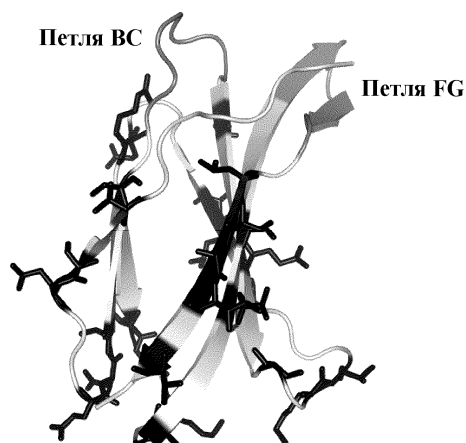
SEQ ID NO:
26 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWTAP-DAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
28 LPAPKQLVSEVTEDSLRLSWTAP-DAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
*****
26 LKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLPISAEFTT (94)
28 LKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLPISAIFTT
*****
*****

```

Фиг. 1В



Фиг. 2



Фиг. 3

		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	AIVLTV	PGSER	SYDLTG (60)
TCL14	(31)	FXIXYXEXXX	GE	AIVLTV	PGSER	SYDLTG (60)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTVSIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT	(89)
TCL14	(61)	LKPGTEYXVXIX	GVKGGXXS	PLSAIFTT		(89)

Фиг. 4

SEQ ID	NO:		
32		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
33		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
34		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
35		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
36		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
37		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
38		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
39		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
40		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
41		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
42		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
43		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
44		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
45		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
46		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
47		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
48		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
49		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
111		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
112		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
113		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW
114		LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW

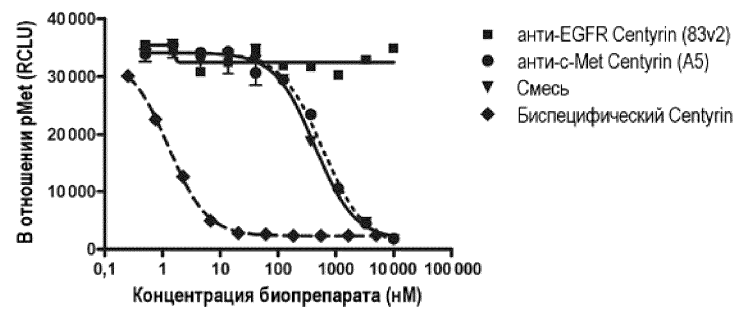
Фиг. 5A

SEQ ID
NO:

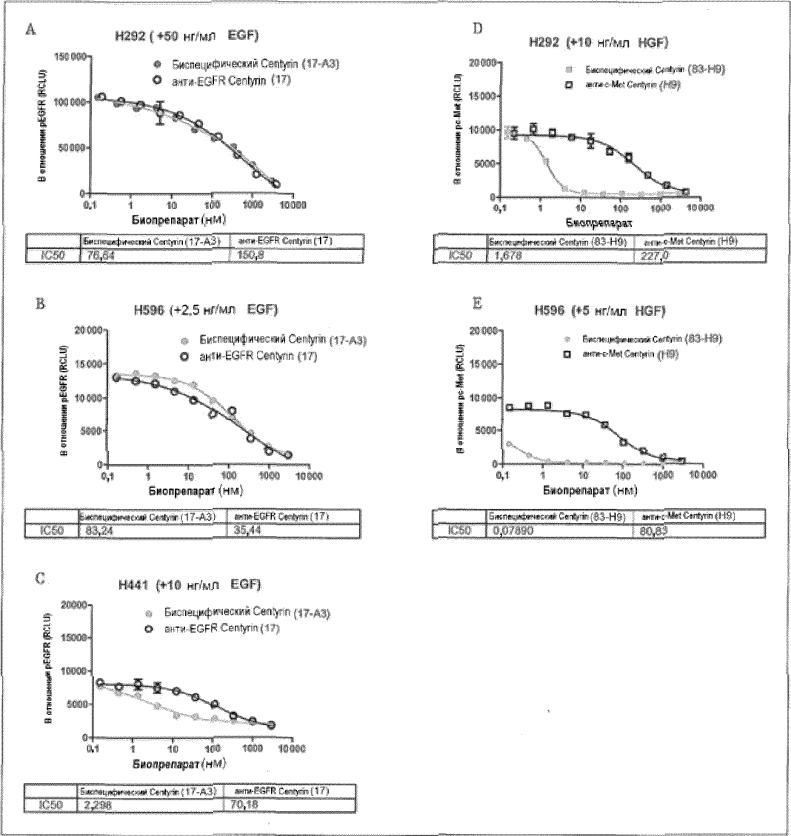
LKPGTEYYVNILGVKGGISVPLSAIFTT
LKPGTEYWVTILGVKGLVSTPLSAIFTT
LKPGTEYIVNIMGVKGGSISHPLSAIFTT
LKPGTEYVNILGVKGGLSVPLSAIFTT
LKPGTEYVVQILGVKGGYISPLSAIFTT
LKPGTEYVVQIMGVKGTVSPPLSAIFTT
LKPGTEYVVGINGVKGGYISPLSAIFTT
LKPGTEYGVTINGVKGRVSTPLSAIFTT
LKPGTEYVQIIGVKGGHISPLSAIFTT
LKPGTEYVNVIMGVKGKISPLSAIFTT
LKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
LKPGTEYVVQILGVKGGISVPLSAIFTT
LKPGTEYVNVIMGVKGGSISPLSAIFTT
LKPGTEYVVQILGVKGGYISPLSAIFTT
LKPGTEYVVQIMGVKGTVSPPLSAIFTT
LKPGTEYVNVIMGVKGGSISPLSAIFTT
LKPGTEYVNVIMGVKGGSISPLSAIFTT
LKPGTEYVNVIMGVKGGSISPLSAIFTT
LKPGTEYVNILGVKGGISPLSAIFTT
LKPGTEYVNILGVKGGKISPLSAIFTT
LKPGTEYVVNILGVKGGISPLSAIFTT
LKPGTEYVNILGVKGGISPLSAIFTT
LKPGTEYVNILSVKGGISPLSAIFTT
***** * * .**** : * *****

(89)

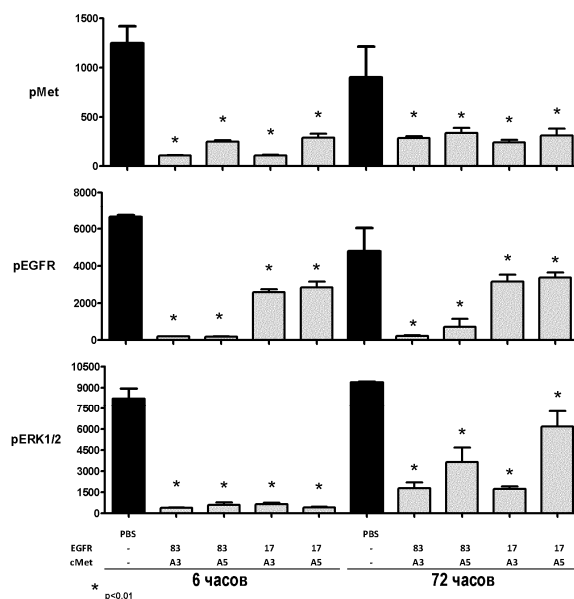
Фиг. 5В



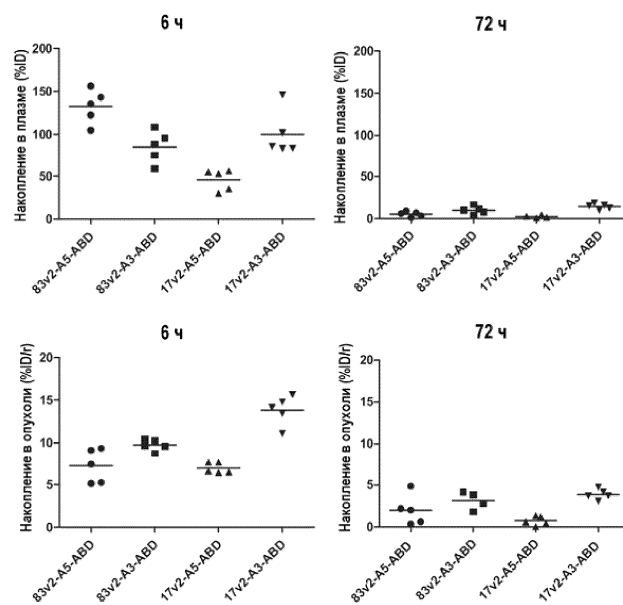
Фиг. 6



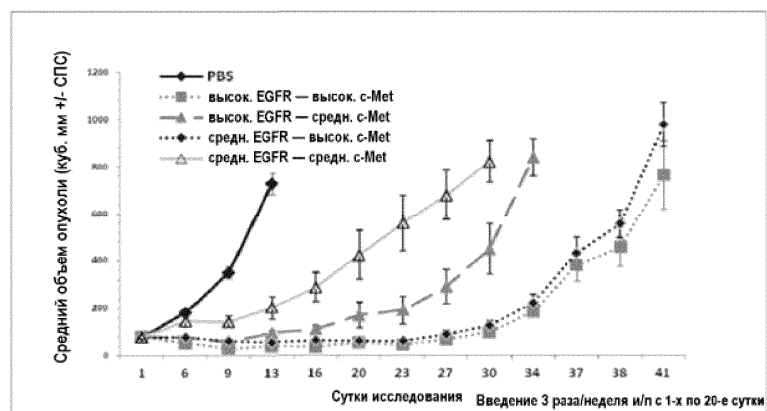
Фиг. 7



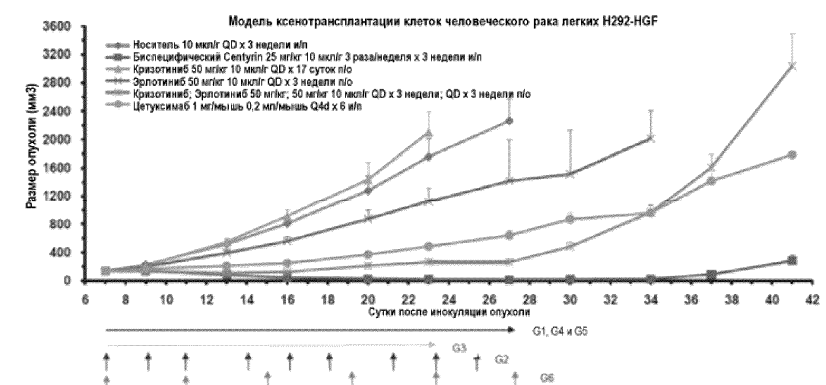
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2