

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090841** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

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

(22) Дата подачи заявки
2013.11.21

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

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

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

(33) US

(62) 201590998; 2013.11.21

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

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

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

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

A2

202090841

202090841

A2

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

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1 или HER1) представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 170 кДа, кодируемый протоонкогеном *c-erbB1*. EGFR относится к семейству человеческих рецепторов эпидермальных факторов роста (HER), которые представляют собой рецепторные тирозинкиназы (RTK), включающие HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). EGFR-сигнализация запускается связыванием с лигандом, за которым следует конформационное изменение, гомодимеризация или гетеродимеризация рецептора с другими членами семейства ErbB и трансаутофосфорилирование рецептора (Ferguson *et al.*, *Annu Rev Biophys*, 37: 353-73, 2008), в результате чего запускаются каскады передачи сигналов, которые в конечном счете влияют на широкий спектр клеточных функций, включая пролиферацию и выживаемость клеток. Увеличение экспрессии или киназной активности EGFR соотносят с рядом разновидностей рака у человека, что делает EGFR привлекательной мишенью для терапевтического воздействия (Mendelsohn *et al.*, *Oncogene* 19: 6550-6565, 2000; Grünwald *et al.*, *J Natl Cancer Inst* 95: 851-67, 2003; Mendelsohn *et al.*, *Semin Oncol* 33: 369-85, 2006). Как увеличение количества копий гена EGFR, так и увеличение экспрессии белка связывают с благоприятными ответами на ингибитор тирозинкиназы EGFR, IRESSA™ (гефитиниб) при немелкоклеточном раке легких (Hirsch *et al.*, *Ann Oncol* 18:752-60, 2007).

EGFR-терапия включает использование как малых молекул, так и антител к EGFR, которые одобрены для лечения колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи и немелкоклеточного рака легких (NSCLC) (Baselga and Arteaga, J

Clin Oncol 23:2445-2459 (2005; Gill *et al.*, J Biol Chem, 259:7755-7760, 1984; Goldstein *et al.*, Clin Cancer Res, 1:1311-1318; 1995; Prewett *et al.*, Clin Cancer Res, 4:2957-2966, 1998).

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

c-Met кодирует тирозинкиназный рецептор. Впервые его обнаружили как протоонкоген в 1984 г., после того как обнаружили, что воздействие канцерогена приводило к появлению конститутивно активного слитного белка TPR-MET (Cooper *et al.*, Nature 311:29-33, 1984). Активация c-Met посредством его лиганда, фактора роста гепатоцитов (HGF), вызывала стимуляцию большого числа клеточных процессов, включая рост, подвижность, вовлечение в злокачественный процесс, метастазирование, эпителиально-мезенхимальное превращение, ангиогенез/заживление ран и регенерацию тканей (Christensen *et al.*, Cancer Lett 225:1-26, 2005; Peters and Adjei, Nat Rev Clin Oncol 9:314-26, 2012). c-Met синтезируется в виде одноцепочечного белка, который протеолитически расщепляется на альфа-субъединицу массой 50 кДа и бета-субъединицу массой 140 кДа, соединенные дисульфидной связью (Ma *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003). c-Met структурно аналогичен другим мембранным рецепторам, таким как Ron and. Точная стехиометрия связывания HGF:c-Met неизвестна, но по существу считается, что две молекулы HGF связываются с двумя молекулами c-Met, что приводит к димеризации рецептора и аутофосфорилированию по тирозиновым остаткам в положениях 1230, 1234 и 1235 (Stamos *et*

al., The EMBO Journal 23: 2325-2335, 2004). Также возможно независимое от лиганда аутофосфорилирование c-Met из-за амплификации гена, мутации или сверхэкспрессии рецептора.

c-Met часто является амплифицированным, мутированным или сверхэкспрессированным при многих типах рака, включая рак желудка, легких, толстой кишки, молочной железы, мочевого пузыря, головы и шеи, яичников, простаты, щитовидной железы, поджелудочной железы и рак ЦНС. Миссенс-мутации, как правило, локализованные в киназном домене, часто обнаруживают при наследственных папиллярных почечных карциномах (PRCC) и в 13% случаев спорадических PRCC (Schmidt *et al.*, Oncogene 18: 2343-2350, 1999). Мутации c-Met, локализованные в семафориновом или околочелюстном доменах c-Met, часто обнаруживают при раке желудка, головы и шеи, печени, яичников, NSCLC и раке поджелудочной железы (Ma *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003; Sakakura *et al.*, Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299-305). При раке мозга, раке толстой кишки, раке желудка и раке легких определяется амплификация c-Met, часто коррелируя с прогрессированием заболевания (Ma *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003). До 4% и 20% случаев немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака желудка соответственно характеризовались амплификацией c-Met (Sakakura *et al.*, Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299-305; Sierra and Tsao, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 3:S21-35, 2011). При раке легких, даже в отсутствие амплификации гена, часто наблюдают сверхэкспрессию c-Met (Ichimura *et al.*, Jpn J Cancer Res, 87:1063-9, 1996). Более того, почти половина клинических образцов легочных аденокарцином показывала высокие уровни c-Met и HGF, оба из которых коррелируют с повышенной скоростью роста опухоли, метастазированием и плохим прогнозом (Sierra and Tsao, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 3:S21-35, 2011; Siegfried *et al.*, Ann Thorac Surg 66: 1915-8, 1998).

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

известного лиганда, HGF (Turke *et al.*, *Cancer Cell*, 17:77-88, 2010), что указывает на наличие компенсаторного пути для EGFR через c-Met. Амплификацию c-Met впервые обнаружили в культивируемых клетках, которые стали резистентны к gefитинибу, ингибитору киназы EGFR, и показывали улучшенную выживаемость через путь Her3 (Engelman *et al.*, *Science*, 316:1039-43, 2007). Это дополнительно подтверждали клиническими образцами, где у девяти из 43 пациентов с приобретенной резистентностью к эрлотинибу или gefитинибу проявилась амплификация c-Met в сравнении лишь с двумя из 62 пациентов без лечения. Четверо из девяти получавших лечение пациентов также приобрели активирующую EGFR мутацию T790M, что демонстрирует параллельные обуславливающие резистентность пути (Beat *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:20932-7, 2007).

Отдельные роли как EGFR, так и c-Met при раке хорошо известны, что делает данные мишени привлекательными для комбинированной терапии. Оба рецептора генерируют сигнал через одни и те же антиапоптозные и обеспечивающие выживаемость пути (ERK и АКТ); таким образом, одновременное ингибирование данной пары может ограничить потенциал активации компенсаторных путей, таким образом повышая общую эффективность. Комбинированные виды терапии, ориентированные на EGFR и 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 анти-EGFR/c-Met молекулы описаны, например, в международной патентной публикации № WO2008/127710, патентной публикации США № US2009/0042906, международной патентной публикации № WO2009/111691, международной патентной публикации № WO2009/126834, международной патентной публикации № WO2010/039248, международной патентной публикации № WO2010/115551.

Современные подходы с использованием низкомолекулярных и

высокомолекулярных терапевтических средств, антагонистов к сигнальным путям EGFR и/или c-Met, могут быть недостаточно оптимальны из-за возможного недостатка специфичности, потенциальной побочной активности и ограничивающей дозу токсичности, которая может проявляться при использовании низкомолекулярных ингибиторов. Типичные двухвалентные антитела могут приводить к кластеризации мембраносвязанных рецепторов и нежелательной активации расположенных ниже сигнальных путей. Одновалентные антитела (с одной детерминантой) отличаются существенной сложностью и затратны в производстве.

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

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложена выделенная биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met.

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

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

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

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

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met.

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

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

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

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Фиг. 8. Ксенотрансплантаты опухоли H292-HGF имплантировали бежевым мышам SCID. Когда опухоли достигали среднего объема приблизительно 80 мм³, мышам три раза в неделю вводили биспецифические EGFR/c-Met молекулы (25 мг/кг) или носитель PBS. Все биспецифические молекулы уменьшали рост опухоли, причем ингибирование роста опухоли (TGI) зависело от аффинности молекул к c-Met и EGFR (высокая EGFR - высокая c-Met обозначает p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ECB38); высокая EGFR - средняя c-Met обозначает p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ECB18); средняя EGFR - высокая c-Met обозначает p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3 (ECB39); средняя EGFR - средняя c-Met обозначает p53A1R5-17-p114AR5P74-A5 (ECB28)).

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

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

названию белка, например 3-й домен FN3 тенасцина (TN3) или 10-й домен FN3 фибронектина (FN10).

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

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

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

Применяемый в настоящем документе термин «специфически связывается» или «специфическое связывание» относится к способности домена FN3 настоящего изобретения связываться с заданным антигеном с константой диссоциации (K_D) приблизительно $1 \times 10^{-6}M$ или менее, например приблизительно $1 \times 10^{-7}M$ или менее, приблизительно $1 \times 10^{-8}M$ или менее, приблизительно $1 \times 10^{-9}M$ или менее, приблизительно $1 \times 10^{-10}M$ или менее, приблизительно $1 \times 10^{-11}M$ или менее, приблизительно $1 \times 10^{-12}M$ или менее или приблизительно $1 \times 10^{-13}M$ или менее. Как правило, домен FN3 настоящего изобретения связывается с заданным антигеном (т.е. EGFR или c-Met) с K_D , которая по меньшей мере в десять раз меньше его K_D для неспецифического антигена (например, BSA или казеин), как измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, оборудования Proteon (BioRad). Таким образом, биспецифическая молекула настоящего изобретения, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, специфически связывается как с EGFR, так и с c-Met с аффинностью связывания (K_D) по меньшей мере $1 \times 10^{-6} M$ или менее, как для EGFR, так и для

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

Применяемый в настоящем документе термин «библиотека» относится к группе вариантов. Библиотека может состоять из вариантов полипептида или полинуклеотида.

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

Применяемый в настоящем документе термин «рецептор эпидермального фактора роста» или «EGFR» относится к человеческому EGFR (также известному как HER-1 или Erb-B1) (Ullrich *et al.*, Nature 309:418-425, 1984) с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 73 и по номеру доступа NP_005219 в GenBank, а также вариантами природного происхождения. Такие варианты включают хорошо известный EGFRvIII и другие варианты альтернативного сплайсинга (например, определенный под номером P00533-1 в SwissProt (дикий тип, идентичный SEA ID NO: 73 и NP_005219), P00533-2 (F404L/L405S), P00533-3 (628-705: CTGPGLEGCP...GEAPNQALLR→PGNESLKAML...SVIITASSCH и 706-1210 удаленные), P00533-4 (C628S и 629-1210 удаленные), варианты Q98, R266, K521, I674, G962 и P988 (Livingston *et al.*, NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478), T790M, L858R/T790M и del (E746, A750).

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

Применяемый в настоящем документе термин «эпидермальный

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

Применяемый в настоящем документе термин «рецептор фактора роста гепатоцитов» или «с-Met» относится к с-Met человека с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101 или по номеру доступа в GenBank NP_001120972, и его вариантами природного происхождения.

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

Применяемые в настоящем документе на взаимозаменяемой основе термины «блокирует связывание» или «ингибирует связывания» относятся к способности доменов FN3 настоящего изобретения биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, блокировать или ингибировать связывание лиганда EGFR, например EGF, с EGFR и/или HGF с с-Met, и включают как частичное, так и полное блокирование/ингибирование. Блокирование/ингибирование лиганда EGFR, например EGF, с EGFR и/или HGF с с-Met, посредством домена FN3 или биспецифической молекулы настоящего изобретения, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, частично или полностью снижает нормальный уровень сигнализации EGFR и/или сигнализации с-Met по сравнению со связыванием лиганда EGFR с EGFR и/или связыванием HGF с с-Met без блокирования или ингибирования. Домен FN3 или биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, «блокирует связывание» лиганда EGFR, например EGF, с EGFR и/или HGF с с-Met, когда ингибирование составляет по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Ингибирование связывания можно измерить при помощи хорошо известных методов, например измеряя ингибирование связывания биотинилированного EGF на экспрессирующих EGFR клетках A431, которые подвергали

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

Применяемый в настоящем документе термин «сигнализация EGFR» обозначает передачу сигнала, индуцированного связыванием лиганда EGFR с EGFR, что ведет к аутофосфорилированию по меньшей мере одного тирозинового остатка в EGFR. Пример лиганда EGFR представляет собой EGF.

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

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

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

Применяемые в настоящем документе на взаимозаменяемой основе термины «сверхэкспрессия», «сверхэкспрессируемый» и «сверхэкспрессирующий» относятся к раковой или злокачественной клетке, которая имеет на поверхности повышенные до определенной степени уровни EGFR и/или c-Met, по сравнению с нормальной клеткой из ткани того же типа. Такая гиперэкспрессия может быть

вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию EGFR и/или c-Met можно измерить, используя хорошо известные анализы, например ИФА, иммунофлуоресценцию, проточную цитометрию или радиоиммунный анализ на живых или лизированных клетках. Альтернативно, или в качестве дополнения, уровни молекул нуклеиновых кислот, кодирующих EGFR и/или c-Met, можно измерить в клетке, например, используя флуоресцентную гибридизацию *in situ*, Саузерн-блоттинг или ПЦР. Сверхэкспрессия EGFR и/или c-Met означает, что уровень EGFR и/или c-Met на поверхности клетки по меньшей мере в 1,5 раза выше уровня нормальной клетки.

Применяемый в настоящем документе термин «Tenson» обозначает синтетический домен фибронектина типа III (FN3) с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 и описанной в патентной публикации США № US2010/0216708.

Применяемый в настоящем документе термин «раковая клетка» или «опухолевая клетка» обозначает раковую, предраковую или преобразованную клетку *in vivo*, *ex vivo* и в культуре клеток, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения, которые не обязательно затрагивают получение нового генетического материала. Хотя преобразование может вызвать инфицирование преобразующим вирусом и встраивание новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощение экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутирование эндогенного гена. Преобразование/рак проявляется, например, в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркеров, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли или ее подавлении в подходящих животных-хозяевах, таких как бестимусные мыши и т.п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

Термин «вектор» обозначает полинуклеотид, способный к воспроизведению в биологической системе или который можно

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

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

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

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

Применяемый в настоящем документе термин «биспецифическая EGFR/c-Met молекула» или «биспецифическая EGFR/c-Met молекула, содержащая домены FN3» обозначает молекулу, содержащую домен FN3, связывающийся с EGFR, и отдельный домен FN3, связывающийся с c-Met, которые связаны ковалентно или напрямую, или посредством линкера. Пример биспецифической молекулы, связывающейся с EGFR/c-Met, содержит первый домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающийся с c-Met.

Применяемый в настоящем документе термин «валентный» относится к наличию в молекуле установленного числа сайтов связывания, специфичных для антигена. Таким образом, термины

«одновалентный», «двухвалентный», «четырёхвалентный» и «шестивалентный» относятся к наличию в молекуле одного, двух, четырех и шести сайтов связывания соответственно, специфичных для антигена.

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

Композиции настоящего изобретения

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

Моноспецифические молекулы, связывающиеся с EGFR

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

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

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR.

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

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

Связывание лиганда, например EGF, с EGFR, стимулирует димеризацию рецептора, аутофосфорилирование, активацию внутреннего цитоплазматического тирозинкиназного домена рецептора и инициирование множества сигнальных путей передачи и транзактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла и деления. Ингибирование сигнализации EGFR может приводить к ингибированию одного или

более расположенных ниже сигнальных путей EGFR, и, следовательно, нейтрализация EGFR может оказывать различные эффекты, включая ингибирование пролиферации и дифференцировки клеток, ангиогенез, подвижность клеток и метастазирование.

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

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC₅₀ 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 использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC₅₀ от приблизительно $1,8 \times 10^{-8}$ М до приблизительно $2,5 \times 10^{-6}$ М при измерении в клетках A431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF. Такие примеры доменов FN3 представляют собой домены с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем

документе, домен FN3 настоящего изобретения связывает человеческий EGFR с константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 1×10^{-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), известными специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 настоящего изобретения связывает человеческий EGFR с K_D от приблизительно 2×10^{-10} до приблизительно 1×10^{-8} М. Аффинность домена FN3 к EGFR можно определить экспериментально с помощью любого подходящего способа (см., например, Berzofsky, et al., *Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); и описанные в настоящем документе способы). Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре «домен FN3 - антиген» может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например, K_D , K_{on} , K_{off}) предпочтительно производят с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

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

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

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

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX₉RGL (SEQ

ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), где X₉ представляет собой M или I; и

петлю BC, содержащую последовательность 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.

Домены FN3 настоящего изобретения, которые специфически связывают EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, как описано в настоящем документе, могут содержать в качестве структурного элемента петлю FG, которая содержит последовательность HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), где X₉ представляет собой M или I. Такие домены FN3 также могут 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 $2,5 \times 10^{-6}$ M или со значением IC₅₀ от приблизительно $1,8 \times 10^{-8}$ M до приблизительно $2,5 \times 10^{-6}$ M при измерении в клетках A431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

Домены FN3 настоящего изобретения, которые специфически связывают EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, как описано в настоящем документе, дополнительно содержат последовательность

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182) или последовательность

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGLGSYVFEHDMVLPLSAEFTT (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.

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

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

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

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

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

Аминокислотные остатки, участвующие в связывании домена

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

Моноспецифические молекулы, связывающиеся с c-Met

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

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

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

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (с-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с с-Met.

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

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

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

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

Сигнализацию с-Met можно измерять различными хорошо известными способами, например путем измерения аутофосфорилирования рецептора по меньшей мере одного из тирозиновых остатков Y1230, Y1234, Y1235 или Y1349 и/или фосфорилирования природных или синтетических субстратов. Фосфорилирование можно определять, например, при помощи антитела, специфичного к фосфотирозину, способом ИФА или вестерн-блоттингом. Можно применять анализы на тирозинкиназную активность (Panek *et al.*, *J Pharmacol Exp Thera* 283:1433-44, 1997; Batley *et al.*, *Life Sci* 62:143-50, 1998) и анализы, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по остатку с-Met в положении 1349 со значением IC₅₀ 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 некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении Y1349 со значением IC₅₀ от приблизительно 4×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-6} М при измерении

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

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домен FN3 настоящего изобретения связывает человеческий c-Met с константой диссоциации (K_D), которая равна или меньше 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 способа Kineха, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 настоящего изобретения связывается с человеческим c-Met с K_D от приблизительно 3×10^{-10} М до приблизительно 5×10^{-8} М. Аффинность домена FN3 к c-Met можно определить экспериментально с использованием любого подходящего метода. (см., например, Berzofsky, et al., *Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); и описанные в настоящем документе способы.) Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре «домен FN3 - антиген» может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например, K_D , K_{on} , K_{off}) предпочтительно производят с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

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

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

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

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 или L.

Домены FN3 настоящего изобретения, которые специфически связываются с с-Met и ингибируют аутофосфорилирование с-Met, как описано в настоящем документе, дополнительно содержат последовательность

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID
NO: 186),

где

X₁₀ представляет собой W, F или V; и

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 или L.

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

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с с-Met и блокирует связывание HGF с с-Met, причем домен FN3 выделен из библиотеки, разработанной на основе Tencon с последовательностью SEQ ID NO: 1.

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

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

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

Выделение доменов FN3, связывающихся с EGFR или c-Met, из библиотеки, основанной на последовательности Tenson

Tenson (SEQ ID NO: 1) представляет собой домен фибронектина типа III (FN3) неприродного происхождения, разработанный на основе консенсусной последовательности пятнадцати доменов FN3 человеческого тенастина-С (Jacobs *et al.*, Protein Engineering, Design and Selection, 25:107-117, 2012; патентная публикация США № 2010/0216708). В кристаллической структуре соединения Tenson выявляются шесть открытых на поверхности петель, соединяющих семь бета-тяжей, характерных для доменов FN3, где бета-тяжи обозначены как 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 № 6,673,901). Данные петли или выбранные остатки в пределах каждой петли можно рандомизировать с конструированием библиотеки доменов фибронектина типа III (FN3), которые можно использовать для выбора новых молекул, связывающихся с EGFR или c-Met. В таблице 1 представлены положения и последовательности всех петель и бета-тяжей в соединении Tenson (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, библиотека, сконструированная на основе последовательности Tenson, может иметь рандомизированную петлю FG или рандомизированные петли BC и FG, как например, описанные ниже библиотеки TCL1 или TCL2. Петля BC Tenson состоит из 7 аминокислот; таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tenson с диверсификацией по петле BC можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Петля FC в Tenson состоит из 7 аминокислот; таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tenson с диверсификацией по петле FC можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

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

Библиотека, разработанная на основе последовательности Tenson, также может иметь альтернативные рандомизированные поверхности, образованные сбоку от домена FN3 и содержащие два или более бета-тяжа и по меньшей мере одну петлю. Одна такая альтернативная поверхность образована аминокислотами в бета-тяжах C и F и в петлях CD и FG (поверхность C-CD-F-FG). Разработка библиотеки, основанной на альтернативной поверхности C-CD-F-FG в Tenson, показанной на Фиг. 1, и подробное описание приводится в патентной публикации США № US2013/0226834. Библиотеки, разработанные на основе последовательности Tenson, также включают библиотеки на основе вариантов Tenson, таких как варианты Tenson, имеющие замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1), причем варианты демонстрируют повышенную температурную стабильность. Примеры вариантов Tenson описаны в патентной публикации США № 2011/0274623 и включают Tenson27 (SEQ ID NO: 99), имеющий замены E11R, L17A, N46V и E86I относительно Tenson последовательности SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

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

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

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

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

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

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR или *c-Met*, можно получить, используя любой домен FN3 в качестве шаблона для генерации библиотеки и поиска в библиотеке молекул, специфически связывающихся с EGFR или *c-Met*, с использованием предложенных способов. Примеры подходящих для использования доменов FN3 включают 3-й домен FN3 тенасцина-С (TN3) (SEQ ID NO: 75), Fibcon (SEQ ID NO: 76) и 10-й домен FN3 фибронектина (FN10) (SEQ ID NO: 77). Применяют стандартные методики клонирования и экспрессии для клонирования библиотек в вектор или синтеза кассет библиотеки с двухцепочечной кДНК, чтобы экспрессировать библиотеки или транслировать их *in vitro*. Например, можно использовать рибосомный дисплей (Hanes and Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937-4942, 1997), мРНК-дисплей (Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12297-12302, 1997) или другие бесклеточные системы (патент США

№ 5,643,768). Библиотеки вариантов домена FN3 можно экспрессировать как слитные белки, отображающиеся на поверхности, например, любого подходящего бактериофага. Хорошо известны способы отображения слитных полипептидов на поверхности бактериофага (патентная публикация США № 2011/0118144; международная патентная публикация № WO2009/085462; патент США № 6,969,108; патент США № 6,172,197; патент США № 5,223,409; патент США № 6,582,915; патент США № 6,472,147).

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

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен FN3, который специфически связывается с EGFR и блокирует связывание EGF с EGFR, который содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137, причем

дополнительно содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1).

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен FN3, который специфически связывается с с-Met и блокирует связывание HGF с с-Met, который содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49, 111-114, причем дополнительно содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1).

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

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

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

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

В настоящем изобретении также предложен выделенный домен FN3, который специфически связывается с с-Met и блокирует связывание HGF с с-Met, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49, 111-114

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

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

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, домены FN3 настоящего изобретения, которые связываются EGFR или c-Met, показывают стабильность, повышенную по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более по сравнению с тем же доменом до конструирования, что измеряется по повышению ТМ.

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

восстановители (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитротиобензол, а также гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные моющие средства, кислоты (например, соляную кислоту (HCl), уксусную кислоту (CH₃COOH), галогензамещенные уксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды) и направленные денатурирующие вещества. Количественное определение степени денатурации может быть основано на потере функционального свойства, такого как способность связываться с молекулой-мишенью, или на физико-химических свойствах, таких как склонность к агрегации, открытие доступа к ранее недоступным растворителю остаткам, или на разрушении или образовании дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с EGFR или c-Met, показывает стабильность, повышенную по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более в сравнении с тем же каркасом до конструирования, что измеряется путем применения гидрохлорида гуанидиния в качестве химического денатурирующего вещества. Повышение стабильности можно измерять в зависимости от снижения флуоресценции триптофана при обработке повышающимися концентрациями гидрохлорида гуанидиния с использованием хорошо известных способов.

Домены FN3 настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, можно создать в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, как средство повышения валентности и, таким образом, авидности к связыванию молекулы-мишени или для создания би- или мультиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более различные молекулы-мишени. Димеры и мультимеры можно создать путем связывания моноспецифических, би- или мультиспецифических белковых каркасов, например, путем включения аминокислотного линкера, например линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают (GS)₂, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 224), (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) и A(EAAAK)₅AAA (SEQ ID NO: 84). Димеры и мультимеры могут соединяться друг с другом в направлении от N-конца к C-концу. Применение встречающихся в естественных условиях, а также искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell *et al.*, *J Biol Chem* 264, 5260-5268, 1989; Alfthan *et al.*, *Protein Eng.* 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996; патент США № 5,856,456).

Биспецифические молекулы, связывающие EGFR и c-Met

Биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, могут оказать благоприятный эффект в плане специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами EGFR и иметь улучшенное проникание в ткани по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе антител. Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на неожиданном открытии того, что биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, обеспечивают существенно повышенный синергический ингибиторный эффект по сравнению со смесью доменов FN3, связывающихся с EGFR и с c-Met. Молекулы можно настроить на конкретную аффинность в отношении как EGFR, так и c-Met для максимального повышения проникновения в опухоль и задержания в ней. Биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, обеспечивают более эффективное ингибирование сигнальных путей EGFR и/или c-Met и более эффективное ингибирование роста опухоли, чем цетуксимаб (Erbix®).

В настоящем изобретении также предложена выделенная биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста

гепатоцитов (HGF) с с-Met.

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

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

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

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

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

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

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

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

Второй домен FN3 биспецифической EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения может блокировать связывание HGF с c-Met со значением IC₅₀ от приблизительно 2×10^{-10} М до приблизительно 6×10^{-8} М в анализе, определяющем ингибирование связывания биотинилированного HGF со слитным белком c-Met-Fc в присутствии второго домена FN3. Второй домен FN3 биспецифической EGFR/c-Met молекулы может блокировать связывание HGF с c-Met по меньшей мере на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению со связыванием HGF с c-Met в отсутствие второго домена FN3 при использовании одинаковых условий анализа.

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

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

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

EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением IC_{50} , которое по меньшей мере приблизительно в 100 раз меньше, например, по меньшей мере в 500, 1000, 5000 или 10 000 раз меньше по сравнению с значением IC_{50} для смеси двух моноспецифических доменов FN3, что указывает на по меньшей мере 100-кратно более высокую эффективность биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, по сравнению со смесью двух моноспецифических доменов FN3. Примеры биспецифических EGFR/c-Met молекул, содержащих домены FN3, могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением IC_{50} приблизительно 5×10^{-9} М или менее. Фосфорилирование ERK можно измерять с использованием стандартных способов и способов, описанных в настоящем документе.

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

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

83v2 (SEQ ID NO: 27).

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

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

В настоящем изобретении также предложена биспецифическая

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

первый домен FN3 содержит

петлю FG, содержащую последовательность 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), 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; 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; и

X₁₆ представляет собой E или D; и

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

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 или L.

В некоторых других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула содержит первый домен FN3, связывающийся с EGFR, который содержит последовательность:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182) или последовательность

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEDHVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

где в SEQ ID NO: 182 и 183:

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 некоторых других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула содержит домен FN3, связывающийся с c-Met, который содержит последовательность

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),

где

X₁₀ представляет собой W, F или V; и

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 или L.

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

Биспецифические EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, имеют некоторые структурные особенности, связанные с их функциональными характеристиками, такими как ингибирование аутофосфорилирования EGFR, например петли FG первого домена FN3, связывающейся с EGFR, которая содержит последовательность HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180), где X₉ представляет собой M или I.

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

ингибируют индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением IC₅₀ менее чем приблизительно 8×10^{-7} M при измерении в клетках H292 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF;

ингибируют индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением IC₅₀ менее чем приблизительно $8,4 \times 10^{-7}$ M при измерении в клетках NCI-H441 с использованием 100 нг/мл человеческого HGF;

ингибируют индуцированную HGF пролиферацию клеток NCI-H292 со значением IC₅₀ менее чем приблизительно $9,5 \times 10^{-6}$ M, причем пролиферацию клеток индуцируют 10% FBS с добавлением 7,5 нг

HGF;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV HNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182), где

X₁ представляет собой D;

X_2 представляет собой D;
 X_3 представляет собой P;
 X_4 отсутствует;
 X_5 представляет собой H или W;
 X_6 представляет собой A;
 X_7 представляет собой F;
 X_8 представляет собой Y; и
 X_9 представляет собой M или I; и
 домен FN3, связывающийся с c-Met, с последовательностью
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
 AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃ PLSAEFTT (SEQ
 ID NO: 186),

где

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

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

Биспецифические молекулы настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать замены в одном или более положениях остатков в первом домене FN3 и/или втором домене FN3, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tenson (SEQ ID NO: 1), как описано выше, и замену в положении 29. Примеры замен представляют собой замены E11N,

E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y, E86I и D29E (нумерация соответствует SEQ ID NO: 1). Специалисту в данной области будет понятно, что в качестве замен можно использовать другие аминокислоты, например аминокислоты из семейства аминокислот, имеющих родственные боковые цепи, как описано ниже. Полученные варианты можно протестировать на их стабильность и связывание с EGFR и/или с-Met с использованием способов, описанных в настоящем документе.

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

LPAPKNLVVSX₂₄VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVGAEIIX₃₀LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (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:

LPAPKNLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPPLSAX₄₆FTT (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 некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, содержит первый домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и второй домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

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

В настоящем изобретении также предложена биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met, причем первый домен FN3 и второй домен FN3 выделены из библиотеки, разработанной на основе последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

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

настоящем документе, можно получить путем ковалентного соединения домена FN3, связывающегося с EGFR, и домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с с-Met, с использованием хорошо известных способов. Домены FN3 можно соединить посредством линкера, например линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают (GS)₂, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 224), (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). Применение встречающихся в естественных условиях, а также искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell *et al.*, *J Biol Chem* 264, 5260-5268, 1989; Alfthan *et al.*, *Protein Eng.* 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996; патент США № 5,856,456). Биспецифические EGFR/с-Met молекулы настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, можно присоединить С-концом первого домена FN3 к N-концу второго домена FN3 или С-концом второго домена FN3 к N-концу первого домена FN3. Любой домен FN3, связывающийся с EGFR, можно ковалентно соединять с доменом FN3, связывающимся с с-Met. Примеры доменов FN3, связывающихся с EGFR, представляют собой домены, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 или 194-211, и примеры доменов FN3, связывающихся с с-Met, представляют собой домены, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-49, 111-114 или 212-223. Домены FN3, связывающиеся с EGFR, соединенные с биспецифической молекулой, могут дополнительно содержать инициатор-метионин (Met) на своем N-конце.

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

избирательность и эффективность в отношении EGFR и c-Met. Примеры модификаций представляют собой, например, консервативные замены, приводящие к получению вариантов с характеристиками, которые аналогичны характеристикам исходной молекулы. Консервативными являются замены, проводимые внутри семейства аминокислот с родственной структурой боковых цепей. Генетически кодируемые аминокислоты можно разделить на четыре семейства: (1) кислотные (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин); (3) неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); и (4) незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин). Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда объединяют в одну группу ароматических аминокислот. Альтернативно набор аминокислот можно разделить на следующие группы: (1) кислые (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин); (3) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), причем серин и треонин можно необязательно объединить в отдельную группу алифатических гидроксильных аминокислот; (4) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); (5) амидные (аспарагин, глутамин); и (6) серосодержащие (цистеин и метионин) (Stryer (ed.), *Biochemistry*, 2nd ed., WH Freeman and Co., 1981). Возможно введение в биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, неконсервативных замен, т.е. замен аминокислотных остатков на другие классы аминокислот для улучшения свойств биспецифических молекул. Чтобы быстро определить возможность получения функционального гомолога в результате изменения аминокислотной последовательности полипептида или его фрагмента, можно оценить способность модифицированного полипептида или фрагмента вызывать отклик аналогично немодифицированному полипептиду или фрагменту с использованием анализов, описанных в настоящем документе. Пептиды, полипептиды или белки с более чем одной заменой также можно легко протестировать аналогичным образом.

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

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

В настоящем изобретении также предложена биспецифическая молекула, содержащая домены FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met, причем молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-179 или 190-193.

Фрагменты, увеличивающие период полужизни

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, или моноспецифические домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с EGFR или c-Met, как описано в настоящем документе, могут содержать другие субъединицы, присоединенные, например, посредством ковалентной связи. В одном аспекте настоящего изобретения биспецифические молекулы настоящего изобретения, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, дополнительно содержат фрагмент, увеличивающий период полужизни. Примеры фрагментов, увеличивающих период полужизни, представляют собой альбумин, варианты альбумина, альбумин-связывающие белки и/или домены, трансферрин и их фрагменты и аналоги, а также Fc-области. Пример альбумин-связывающего домена представлен в SEQ ID NO: 117, и пример варианта альбумина представлен в SEQ ID NO: 189.

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

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

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

Моноспецифические и биспецифические молекулы настоящего

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

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева

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

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

В настоящем изобретении также предложен выделенный

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

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

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

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

Полинуклеотиды настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну некодирующую последовательность, такую как промоторная или энхансерная последовательность, интрон, сигнал полиаденилирования, цис-последовательность, облегчающую связывание с RepA, и т.п. Полинуклеотидные последовательности также могут содержать дополнительные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты, которые кодируют, например, маркерную последовательность или последовательность тега, такую как гистидиновый тег или HA-тег, для облегчения очистки или определения белка, сигнальную последовательность, партнер для слитного белка, такой как RepA, Fc или белок покрытия бактериофага, такой как рIX или рIII.

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

вирусные векторы, бакуловирусные экспрессирующие векторы, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, подходящие для введения полинуклеотидов настоящего изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение каким-либо образом. Такие векторы могут представлять собой векторы экспрессии, содержащие элементы нуклеотидной последовательности, которые могут контролировать, регулировать, вызывать или допускать экспрессию полипептидов, кодируемых таким вектором. Такие элементы могут содержать сайты связывания энхансера транскрипции, сайты инициации РНК-полимеразы, сайты связывания рибосом и другие сайты, способствующие экспрессии закодированных полипептидов в заданной экспрессирующей системе. Такие экспрессирующие системы могут представлять собой клеточные или бесклеточные системы, хорошо известные в данной области.

В настоящем изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор настоящего изобретения. Моноспецифический домен FN3, связывающийся с EGFR или с-Met, или биспецифическую молекулу настоящего изобретения, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, можно необязательно получить с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно в данной области. См., например, Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Выбранная для экспрессии клетка-хозяин может происходить от млекопитающего, или ее можно выбрать из клеток COS-1, COS-7, НЕК293, ВНК21, СНО, ВSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых производных,

иммортиализованных или преобразованных клеток для указанных клеток. Альтернативно клетку-хозяина можно выбрать из видов или организмов, неспособных к гликозилированию полипептидов, например прокариотической клетки или организма, такого как BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3) и любого из природных или сконструированных штаммов *E. coli*, *Klebsiella* или *Pseudomonas*.

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

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

Использование биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, и доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с EGFR или с-Met

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с с-Met, описанные в настоящем документе, можно использовать для

диагностики, мониторинга, модуляции, лечения, ослабления, профилактики развития или снижения симптомов заболевания человека или конкретных патологий клеток, тканей, органов, текучих сред или по существу хозяина. Способы настоящего изобретения можно использовать для лечения любого животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Один аспект изобретения представляет собой способ ингибирования роста или пролиферации клеток, экспрессирующих EGFR и/или c-Met, включающий контактирование клеток с выделенной биспецифической молекулой, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменом FN3, связывающимся с EGFR, или доменом FN3 настоящего изобретения, связывающимся с c-Met.

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

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

Биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, можно использовать для лечения любого заболевания или расстройства, характеризующегося аномальной активацией или

продукцией EGFR, с-Met, EGF или иного лиганда EGFR или HGF, или расстройства, связанного с экспрессией EGFR или с-Met, которые могут быть связаны или не связаны со злокачественными образованиями или раком, причем аномальная активация и/или продукция EGFR, с-Met, EGF или иного лиганда EGFR или HGF происходит в клетках или тканях субъекта с заболеванием или расстройством или субъекта, предрасположенного к заболеванию или расстройству. Биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с с-Met, можно использовать для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Раковые заболевания, поддающиеся лечению биспецифическими молекулами настоящего изобретения, включают раковые заболевания со сверхэкспрессией EGFR и/или с-Met, раковые заболевания с повышенной активностью и/или уровнем экспрессии EGFR (например, с активирующей EGFR мутацией, амплификацией гена EGFR или опосредованной лигандом активацией EGFR) и с повышенной активностью и/или уровнем экспрессии с-Met (например, с активирующей с-Met мутацией, амплификацией гена с-Met или опосредованной лигандом активацией с-Met).

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

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

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

Примеры видов рака, поддающихся лечению посредством биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/с-Met, домена FN3, связывающегося с EGFR, или домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с с-Met, включают виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), легочную аденокарциному, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, тестикулярный рак, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени или спорадическую или наследственную папиллярную почечную карциному (PRCC).

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

можно использовать для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды рака, поддающиеся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с c-Met, включают виды, связанные со сверхэкспрессией c-Met. Примеры видов рака, поддающихся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, включают виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, тестикулярный рак, рак желудка и рак тимуса.

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR и блокирующие связывание EGF с EGFR, можно использовать для лечения опухолей, включая раковые и доброкачественные опухоли. Виды рака, поддающиеся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, включают виды, связанные со сверхэкспрессией EGFR, или их варианты. Примеры видов рака, поддающихся лечению посредством доменов FN3 настоящего изобретения, включают виды рака эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, тестикулярный рак, рак желудка и рак тимуса.

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

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

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

Для определения того, имеет ли субъект резистентность,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

метастазирования раковых клеток в другие места в организме.

Введение/фармацевтические композиции

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, включающие биспецифическую молекулу, содержащую домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домен FN3, связывающийся с EGFR, или домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с c-Met, и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество домена или молекулы в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителям, адъювантам, эксципиентам или носителю, вместе с которыми вводится активное соединение. Такой носитель может быть жидким, таким как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно использовать 0,4% соляной раствор и 0,3% раствор глицина. Указанные растворы стерильны и по существу не содержат твердых примесей. Стерилизацию проводят с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как агенты, необходимые для контроля и изменения pH, стабилизаторы, загустители, увлажнители и красители и т.п. Концентрация молекул настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно по меньшей мере приблизительно 1% и до 15 или 20% вес., и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т.п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Подходящие носители и составы, включая

другие белки человека, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing, стр. 691-1092, см. особенно стр. 958-989.

Способ введения для терапевтического применения биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменов FN3, связывающихся с EGFR, или доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с c-Met, может представлять собой любой подходящий способ, доставляющий агент к хозяину, такой как парентеральное введение, например внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное или подкожное, легочное; трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), введение с использованием состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, частицы; и введение содержимого в шприце, имплантируемом устройстве, осмотическом насосе, кассете, микронасосе; или другие способы, известные опытным практикам и специалистам в данной области. Специфическое введение в область можно обеспечить, например, путем доставки в сустав, бронхи, брюшную полость, внутрь капсулы, хрящ, полость, клетку, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, простату, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

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

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3,

связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно вводить пациенту любым подходящим способом, например парентерально, путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсным методом, внутримышечно, или подкожно, или интраперитонеально. Внутривенную инфузию можно проводить в течение всего 15 минут, но чаще – в течение 30 минут, 60 минут, 90 минут или даже 2 или 3 часов. Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, также можно вводить непосредственно в область заболевания (например, в саму опухоль). Доза, вводимая пациенту с раком, достаточна для того, чтобы облегчить или по меньшей мере частично затормозить подвергаемое лечению заболевание («терапевтически эффективное количество»), и может иногда составлять от 0,1 до 10 мг/кг веса тела, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Можно обеспечивать фиксированную разовую дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может зависеть от площади поверхности тела пациента, например 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Для лечения рака обычно вводят от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить 10, 12, 20 или более доз. Введение биспецифических молекул, содержащих домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, доменов FN3, связывающихся с EGFR, или доменов FN3 настоящего изобретения, связывающихся с c-Met, можно повторять через сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или больший срок. Также возможны повторные курсы лечения в виде хронического применения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе.

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

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

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

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

Биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3 настоящего изобретения, связывающиеся с c-Met, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом одновременно, последовательно или отдельно. Второй терапевтический агент может представлять собой

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ПРИМЕР 1. Создание библиотек Tencon

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

Tencon:

Lpapknlvvsevtedsrlrlswtapdaafdsfliqqyqesekvgeainltvpgsersydl
tglkpgt eytvsiygvkghrsnplsaftt (SEQ ID NO 1):

Создание библиотеки TCL1

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

промотора Tac, кодовую последовательность библиотеки Tencon, кодовую последовательность RepA, cis-элемент и ori-элемент. При экспрессии в системе транскрипции/трансляции *in vitro* формируется комплекс слитного белка Tencon-RepA, связанный в *cis* с ДНК, которая его кодирует. Затем комплексы, связывающиеся с молекулой-мишенью, выделяют и амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), как описано ниже.

Создание библиотеки TCL1 для использования с *cis*-дисплеем достигается путем последовательных циклов ПЦР с получением конечных линейных двухцепочечных молекул ДНК из двух половин; 5'-фрагмент содержит промотор и последовательности Tencon, тогда как 3'-фрагмент содержит ген *repA* и элементы *cis* и *ori*. Данные половины соединяют рестриктазным фрагментом с получением единого конструкта. Библиотека TCL1 была разработана для включения случайных аминокислот только в петлю FG в Tencon, KGGHRSN (SEQ ID NO: 86). При создании данной библиотеки использовали NNS-кодоны, что позволило встраивать в петлю FG все 20 аминокислот и один стоп-кодон. Библиотека TCL1 содержит шесть отдельных подбиблиотек, каждая из которых имеет разную рандомизированную длину петли FG, от 7 до 12 остатков для дополнительного увеличения разнообразия. Конфигурация библиотек на основе Tencon представлена в таблице 2.

Таблица 2

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

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

**KGGHRSN: SEQ ID NO: 86

X обозначает вырожденные аминокислоты, кодированные NNS-кодонами.

обозначает «разработанное распределение аминокислот», описанное в тексте.

Для создания библиотеки TCL1 выполняли последовательные циклы ПЦР для присоединения промотора Tac, введения вырожденных элементов в петлю FG и введения необходимых рестрикционных сайтов для конечной сборки. Во-первых, в две стадии сформировали последовательность ДНК, содержащую промоторную последовательность и последовательность 5'-фрагмента петли FG Tenson. В качестве матрицы для ПЦР использовали ДНК, соответствующую полной последовательности гена Tenson, с праймерами POP2220 (SEQ ID NO: 2) и TC5'toFG (SEQ ID NO: 3). Полученный при данной реакции продукт ПЦР использовали в качестве матрицы для следующего цикла ПЦР-амплификации с праймерами 130mer (SEQ ID NO: 4) и Tc5'toFG для завершения присоединения последовательности 5'-фрагмента и промоторной последовательности к Tenson. Затем диверсифицировали петлю FG путем амплификации ДНК-продукта, полученного на первой стадии, с прямым праймером POP2222 (SEQ ID NO: 5) и обратными праймерами TCF7 (SEQ ID NO: 6), TCF8 (SEQ ID NO: 7), TCF9 (SEQ ID NO: 8), TCF10 (SEQ ID NO: 9), TCF11 (SEQ ID N NO: 10) или TCF12 (SEQ ID NO: 11), содержащими вырожденные нуклеотиды. Выполнили по меньшей мере по восемь ПЦР-реакций в объеме 100 мкл для каждой подбиблиотеки, чтобы минимизировать число циклов ПЦР и максимально увеличить разнообразие библиотеки. По меньшей мере 5 мкг данного ПЦР-продукта очистили из геля и использовали на следующей стадии с праймерами POP2222 (SEQ ID NO: 5) и POP2234 (SEQ ID NO: 12), выполнив в результате прикрепление 6xHis-тега и рестрикционного сайта NotI к 3'-концу последовательности Tenson. Данную реакцию ПЦР проводили с использованием всего пятнадцати циклов ПЦР и по меньшей мере 500 нг ДНК-матрицы. Полученный ПЦР-продукт очистили из геля, расщепили рестрикционным ферментом NotI и очистили на колонке

Qiagen.

3'-фрагмент библиотеки представляет собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая рестрикционный сайт PspOMI, кодирующую область *repA* и элементы *cis* и *ori*. ПЦР проводили с использованием плазмиды (pCR4Blunt) (Invitrogen), содержащей данный ДНК-фрагмент, с праймерами M13 Forward (прямой) и M13 Reverse (обратный). Полученные ПЦР-продукты расщепляли PspOMI в течение ночи и очищали из геля. Для лигирования 5'-части библиотечной ДНК с 3'-фрагментом ДНК, содержащим ген *repA*, 2 пмоль 5'-фрагмента ДНК лигировали с эквимольным количеством 3'-фрагмента *repA* ДНК в присутствии ферментов NotI и PspOMI и лигазы T4. После лигирования в течение ночи при 37°C небольшую часть лигированной ДНК прогоняли через гель для проверки эффективности лигирования. Лигированный библиотечный продукт разделили на двенадцать ПЦР-амплификаций и провели ПЦР в 12 циклов с парой праймеров POP2250 (SEQ ID NO: 13) и DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Выход ДНК для каждой подбиблиотеки в библиотеке TCL1 составлял 32-34 мкг.

Для оценки качества библиотеки небольшую часть рабочей библиотеки амплифицировали с праймерами Tcon5new2 (SEQ ID NO: 15) и Tcon6 (SEQ ID NO: 16) и клонировали в модифицированном векторе pET с использованием безлигазного клонирования. Плазмидную ДНК трансформировали в компетентные клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) и 96 случайно выбранных колоний секвенировали с использованием праймера к промотору T7. Дублирующиеся последовательности не были обнаружены. В целом 70-85% клонов содержали полный промотор и кодирующую последовательность Tenson без мутации сдвига рамки считывания. Доля функционального секвенирования, с исключением клонов со стоп-кодонами, составила от 59% до 80%.

Создание библиотеки TCL2

Была создана библиотека TCL2, в которой в Tenson были рандомизированы как петля BC, так и петля FG, а распределение аминокислот в каждом положении строго контролировалось. В таблице 3 представлено распределение аминокислот в желаемых

положениях петель в библиотеке TCL2. Разработанное распределение аминокислот преследовало две цели. Во-первых, библиотека была ориентирована на остатки, которые по прогнозу являются структурно значимыми для сворачивания и стабильности Tenson на основании анализа кристаллической структуры Tenson и/или гомологического моделирования. Например, положение 29 предназначалось только для набора гидрофобных аминокислот, поскольку данный остаток погружен в гидрофильную сердцевину свернутого Tenson. Вторым уровнем разработки была ориентация на распределение аминокислот на остатки, которые предпочтительно обнаруживаются в тяжелой цепи HCDR3 антител, для эффективного создания соединений с высокой аффинностью связывания (Birtalan *et al.*, *J Mol Biol* 377:1518-28, 2008; Olson *et al.*, *Protein Sci* 16:476-84, 2007). Таким образом, «разработанное распределение» из таблицы 3 обозначает следующее распределение: 6% аланина, 6% аргинина, 3,9% аспарагина, 7,5% аспарагиновой кислоты, 2,5% глутаминовой кислоты, 1,5% глутамина, 15% глицина, 2,3% гистидина, 2,5% изолейцина, 5% лейцина, 1,5% лизина, 2,5% фенилаланина, 4% пролина, 10% серина, 4,5% треонина, 4% триптофана, 17,3% тирозина и 4% валина. В данном распределении отсутствуют метионин, цистеин и стоп-кодона.

Таблица 3

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

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

*нумерация остатков основана на последовательности Tencon SEQ ID NO: 1

5'-фрагмент библиотеки TCL2 содержал промотор и кодирующую область Tencon (SEQ ID NO: 1), которую 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 рестрикционный сайт BsaI для лигирования с *RepA*.

3'-фрагмент библиотеки представлял собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая 6xHis-тег, кодирующую область *repA* и *cis*-элемент. ДНК получили в ПЦР-реакции с использованием имеющейся ДНК-матрицы (выше) и праймеров LS1008 (SEQ ID NO: 17) и DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Для сборки готовой библиотеки TCL2 общее количество 1 мкг расщепленного рестриктазой BsaI 5'-фрагмента библиотечной ДНК Tencon лигировали с 3,5 мкг 3'-фрагмента, полученного путем рестрикционного расщепления тем же ферментом. После лигирования в течение ночи ДНК очищали на колонке Qiagen и проводили количественную оценку ДНК путем измерения поглощения при длине волны 260 нм. Лигированный библиотечный продукт амплифицировали ПЦР в 12 циклов с парой праймеров POP2250 (SEQ ID NO: 13) и DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Всего выполнили 72 реакции, в каждой из которых в качестве матрицы использовали 50 нг лигированных ДНК-продуктов. Общий выход рабочей библиотеки ДНК TCL2 составил приблизительно 100 мкг. Небольшую часть рабочей библиотеки подвергли субклонированию и секвенированию, как описано выше применительно к библиотеке TCL1. Дублирующие последовательности не были обнаружены. Приблизительно 80% последовательностей содержали полный промотор и кодирующую последовательность 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 домена FN3. Альтернативные поверхности, находящиеся с двух «сторон» доменов FN3 и имеющие другие формы, чем поверхности, образованные за счет одних петель, образованы с одной стороны домена FN3 двумя антипараллельными бета-тяжами, С и F бета-тяжами и петлями CD и FG, и в настоящем документе именуется поверхностью С-CD-F-FG.

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

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

Скрининг библиотеки

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

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

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

через 16 часов путем центрифугирования и замораживали при -20°C . Лизирование клеток проводили путем инкубации каждого стутка в 0,6 мл лизирующего буфера BugBuster® HT (Novagen EMD Biosciences) со встряхиванием при комнатной температуре в течение 45 минут.

Выбор доменов FN3, связывающихся с EGFR на клетках

Для оценки способности разных доменов FN3 связываться с EGFR в более физиологическом контексте, измеряли их способность связываться с клетками A431. Клетки A431 (Американская коллекция типовых культур, № по каталогу CRL-1555) обладают сверхэкспрессией EGFR $\sim 2 \times 10^6$ рецепторов на клетку. Клетки высевали по 5000 на лунку на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 . Лизаты экспрессирующих домены FN3 бактерий 1000-кратно разбавляли в буфере для окрашивания при FACS (Becton Dickinson) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в трех повторах. Лизаты убирали и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл на лунку. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку конъюгированных антител к пентагистидину anti-penta His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза 150 мкл на лунку буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с использованием сканера Asimen eX3. Бактериальные лизаты, содержащие домены FN3, отбирали посредством скрининга по их способности связываться с клетками A431 (1320 неочищенных бактериальных лизатов по библиотекам TCL1 и TCL2) и выявили 516 позитивных клонов, у которых связывание ≥ 10 -кратно превосходило фоновый сигнал. Для связывания отобрали посредством скрининга 300 лизатов из библиотеки TCL14, получив 58 уникальных последовательностей доменов FN3, связывающихся с EGFR.

Выбор доменов FN3, ингибирующих связывание EGF с EGFR на

клетках

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

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

Экспрессия и очистка идентифицированных доменов FN3, связывающихся с EGFR

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

Анализ методом эксклюзионной хроматографии

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

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

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

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

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR

Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR, тестировали на их способность ингибировать стимулированное EGF фосфорилирование EGFR в клетках A431 в единственной концентрации. Фосфорилирование EGFR отслеживали с помощью набора EGFR phospho(Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Клетки высевали по 20 000 на лунку на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл/лунка (Gibco), содержащую GlutaMAX™, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco), и давали им прикрепиться на ночь при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в течение ночи в условиях голодания в 100 мкл на лунку среды без FBS при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Затем клетки обрабатывали по 100 мкл/лунку предварительно нагретой (37°C) средой без питательных веществ, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR, в концентрации 2 мкМ в течение 1 часа при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Контрольные клетки обрабатывали только средой без питательных веществ. Клетки стимулировали путем добавления и осторожного перемешивания 100 мкл на лунку подогретой (37°C) среды без питательных веществ, содержащей 100 нг/мл рекомбинантного человеческого EGF (R&D Systems, № по каталогу 236-EG) с конечной концентрацией 50 нг/мл EGF, а также 1 мкМ домена FN3, связывающегося с EGFR, и инкубирования при 37°C, 5% CO₂ в течение 15 минут. Один набор контрольных лунок оставили без стимуляции в качестве отрицательного контроля. Среду полностью удаляли и клетки лизировали при помощи 100 мкл на лунку лизирующего буфера Complete Lysis Buffer (Meso Scale Discovery) в течение 10 минут при комнатной температуре при встряхивании, как описано в инструкциях производителя. Планшеты для анализа, предназначенные для измерения EGFR, фосфорилированного по тирозиновому остатку 1173 (Meso Scale

Discovery), блокировали прилагаемым блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1,5-2 часов. Затем планшеты промывали 4 раза, используя 200 мкл на лунку 1-кратного Tris Wash Buffer (Meso Scale Discovery). Аликвоты клеточных лизатов (30 мкл на лунку) переносили в планшеты для анализа, которые закрывали пленкой для герметизации планшетов (VWR), и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа. Планшеты для анализа промывали 4 раза, по 200 мкл на лунку Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли по 25 мкл ледяного раствора антител для определения (Meso Scale Discovery), стараясь избежать появления пузырей. Планшеты инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа, затем промывали 4 раза по 200 мкл на лунку Tris Wash Buffer. Сигналы определяли путем добавления по 150 мкл на лунку буфера считывания (Meso Scale Discovery) и считывали на приборе SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с использованием заданных производителем по умолчанию параметров для данного анализа. Процентное ингибирование стимулированного EGF контрольного сигнала вычисляли для каждого домена FN3, связывающегося с EGFR.

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

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

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

Крупномасштабная экспрессия, очистка и удаление эндотоксина

Домены FN3, представленные в таблице 4, подвергли крупномасштабной экспрессии, чтобы получить больше материала для подробного определения характеристик. Культивируемую в течение ночи культуру, содержащую каждый из вариантов доменов FN3, связывающихся с EGFR, инокулировали в 0,8 л бульонной питательной среды Terrific с добавлением 100 мкг/мл ампициллина с разбавлением 1/80 ночной культуры свежей средой и инкубировали при встряхивании при 37°C. Когда была достигнута оптическая плотность ~ 1,2-1,5 при длине волны 600 нм, культуру индуцировали путем добавления IPTG с конечной концентрацией 1 мМ и температуру снижали до 30°C. Через 4 часа клетки собирали путем центрифугирования и стусток клеток хранили при -80°C столько, сколько необходимо.

Для лизирования клеток оттаявший стусток повторно суспендировали в растворе 1X BugBuster® с добавлением 25 Е/мл Benzonase® (Sigma-Aldrich) и 1 тыс. Е/мл rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) в соотношении 5 мл BugBuster® на грамм стустка. Лизирование проводили в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным встряхиванием, затем центрифугировали

при 56 000 x g в течение 50 минут при 4°C. Супернатант отбирали и фильтровали через фильтр 0,2 мкм, после чего наносили на 5-мл колонку HisTrap FF, доведенную предварительно до равновесного состояния при помощи буфера А (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) с использованием хроматографической системы GE Healthcare ÄKTAexplorer 100s. Колонку промывали буфером А объемом 20 объемов колонки и дополнительно промывали 16% буфером В (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ NaCl, 250 мМ имидазола), 6 объемов колонки. Домены FN3 элюировали 50% буфером В, 10 объемов колонки, и затем градиентом 50-100% буфера В, 6 объемов колонки. Фракции, содержащие белок домена FN3, объединяли, концентрировали в концентраторе Millipore 10K MWC0 и фильтровали, после чего наносили на колонку HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare), доведенную до равновесия PBS. Выбирали пик мономерного белка, элюирующийся из эксклюзионной колонки.

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

удаления оставшихся эндотоксинов.

Определение аффинности доменов FN3, связывающихся с EGFR, с EGFR-Fc (аффинность к EGFR-Fc)

Аффинность связывания выбранных доменов FN3, связывающихся с EGFR, с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR дополнительно характеризовали методами поверхностного плазмонного резонанса использованием прибора Proteon (BioRad). Схема анализа (подготовка чипа, захват EGFR-Fc) была аналогична описанной выше схеме применительно к анализу скорости диссоциации. Выбранные домены FN3, связывающиеся с EGFR, тестировали в концентрации 1 мкМ в серии 3-кратных разбавлений в горизонтальной ориентации. Для отслеживания исходной стабильности также вводили образец буфера. Фазу диссоциации для всех концентраций каждого домена FN3, связывающегося с EGFR, отслеживали при скорости потока 100 мкл/мин в течение 30 минут (для доменов с $k_{off} \sim 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ в соответствии с данными скринингового исследования скорости диссоциации) или 1 часа (для доменов с $k_{off} \sim 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее). Из ответных данных вычитали два набора данных фона: 1) сигналы между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между доменом FN3, связывающимся с EGFR, и поверхностью с иммобилизованными IgG; 2) сигналы буферных каналов для коррекции сдвига базовой линии из-за диссоциации захваченных комплексов EGFR-Fc со временем. Обработанные данные связывания для всех концентраций и каждого домена FN3 глобально аппроксимировали простой 1:1 моделью связывания Ленгмюра для получения кинетических констант (k_{on} , k_{off}) и константы аффинности (K_D). В таблице 5 представлены кинетические константы для каждого из конструктов с аффинностью от 200 пМ до 9,6 нМ.

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

Клетки A431 высевали по 5000 на лунку на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давая им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR, (от 1,5 нМ до 30

мкМ) добавляли к клеткам (в объеме 50 мкл) в течение 1 часа при комнатной температуре в трех повторах. Супернатант убирали и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл на лунку. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку конъюгированных антител к пентагистидину anti-penta His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза 150 мкл на лунку буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с использованием сканера Acumen eX3. Построили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой «доза – ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений EC₅₀. В таблице 5 представлены значения EC₅₀ для каждого из конструкторов в диапазоне от 2,2 нМ до >20 мкМ.

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

Клетки A431 высевали по 5000 на лунку на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, давая им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR, (от 1,5 нМ до 30 мкМ) добавляли к клеткам (50 мкл на лунку) в течение 1 часа при комнатной температуре в трех повторах. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по каталогу E-3477) добавляли в каждую лунку с конечной концентрацией 30 нг/мл и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл на лунку. Клетки инкубировали с 50 мкл на лунку конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (Invitrogen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза 150 мкл на лунку буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам

			EC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	IC 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	> 20 000	55	179	1150	>3073

воздействием доменов FN3, связывающихся с EGFR. Клетки высевали по 500 на лунку (NCI-H292) или по 1000 на лунку (NCI-H322) на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (Nunc), в объем 100 мкл на лунку среды RPMI (Gibco), содержащей GlutaMAX™ и 10 мМ HEPES, с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco), давали клеткам прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки обрабатывали 5 мкл на лунку фосфатно-буферным соляным раствором (PBS), содержащим разные концентрации доменов FN3, связывающихся с EGFR. Контрольные клетки обрабатывали 5 мкл на лунку только PBS или 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты в PBS. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 120 часов. Жизнеспособные клетки определяли путем добавления 75 мкл на лунку реагента CellTiter-Glo® (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 2 минут и инкубацией в темноте при комнатной температуре в течение дополнительных 10 минут. Планшеты сканировали на сканере для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices) в режиме люминесценции с временем регистрации 0,5 секунды на лунку в сравнении с пустой средой. Построили график зависимости процента роста обработанных PBS клеток от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения IC₅₀ определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой «доза -

ответ» с переменным наклоном с использованием GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). В таблице 5 представлены значения IC₅₀ в диапазоне от 5,9 нМ до 1,15 мкМ и от 9,2 нМ до >3,1 мкМ при использовании клеток NCI-H292 и NCI-H322 соответственно. В таблице 5 представлена сводная информация по биологическим свойствам доменов FN3, связывающихся с EGFR, для каждого анализа.

ПРИМЕР 4. Инженерная модификация доменов FN3, связывающихся с EGFR

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

Таблица 6

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

ПРИМЕР 5. Выбор доменов фибронектина типа III (FN3), связывающихся с c-Met и ингибирующих связывание HGF

Пэннинг на человеческом c-Met

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

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

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

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

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

Скрининг доменов FN3, ингибирующих связывание HGF с с-Met

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

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

Высокопроизводительная экспрессия и очистка доменов FN3

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

Определение IC₅₀ для ингибирования связывания HGF с c-Met

Выбранные домены FN3 дополнительно охарактеризовали в анализе на конкуренцию с HGF. Построили кривые «доза - ответ» для очищенных доменов FN3 с использованием описанного выше анализа (начальная концентрация 5 мкМ). Вычислили значения процентного ингибирования. Построили график зависимости % ингибирования от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определили значения IC₅₀ путем аппроксимации данных сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4.

В цикле 5 идентифицировали 35 уникальных последовательностей, показывающих активность при разбавлении 1:10 со значением IC₅₀ в диапазоне от 0,5 до 1500 нМ. В цикле 7 получили 39 уникальных последовательностей с активностью при разбавлении 1:100 и значениями IC₅₀ в диапазоне от 0,16 до 2,9 нМ. В цикле 9 идентифицировали 66 уникальных последовательностей, где удачными считались варианты, проявлявшие активность при разбавлении 1:1000. В цикле 9 (таблица 8) наблюдали значения IC₅₀ всего 0,2 нМ.

Определение аффинности доменов FN3, связывающихся с c-Met,

с с-Met-Fc (аффинность к с-Met-Fc)

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

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

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

Таблица 7

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

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

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

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

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

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

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

Клетки NCI-H441 (№ по каталогу НТВ-174, Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния) высевали по 20 000 на лунку на покрытые поли-D-лизином черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, штат Калифорния) и давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Очищенные домены FN3 (50 мкл на лунку; 0-1000 нМ) добавляли к клеткам на 1 час при 4°C в двух повторах. Удаляли супернатанты и клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл на лунку, BD Biosciences, № по каталогу 554657). Клетки инкубировали с биотинилированными антителами к HIS (с разбавлением 1:160 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл на лунку, R&D Systems, № по каталогу BAF050) в течение 30 минут при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл на лунку), после чего инкубировали с конъюгированными антителами против мышей IgG1-Alexa 488 (с разбавлением 1:80 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл на лунку, Life Technologies, № по каталогу A21121) в течение 30 минут при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл на лунку) и оставляли в буфере для окрашивания при FACS (50 мкл на лунку). Определяли полную флуоресценцию на сканере Acumen eX3. Построили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad

Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений EC_{50} . Выявили, что домены FN3 показывают диапазон активностей связывания со значениями EC_{50} от 1,4 нМ до 22,0 нМ, как представлено в таблице 8.

Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования c-Met

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

на лунку) наносили на планшеты для анализа и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа. Затем планшеты для анализа четырехкратно промывали Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли ледяной раствор антител для определения (25 мкл на лунку, Meso Scale Discovery) на 1 час при комнатной температуре со встряхиванием. Планшеты снова четырехкратно промывали Tris Wash Buffer. Сигналы определяли путем добавления буфера считывания 150 (150 мкл на лунку, Meso Scale Discovery) и считывания на приборе SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с использованием заданных производителем по умолчанию параметров для данного анализа. Построили график зависимости сигнала электрохемилюминесценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определили значения IC₅₀ путем аппроксимации данных сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. Выявили, что домены FN3 ингибировали фосфорилирование c-Met со значениями IC₅₀ в диапазоне от 4,6 нМ до 1415 нМ, как представлено в таблице 8.

Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток

Ингибирование c-Met-зависимого роста клеток оценивали путем измерения жизнеспособности клеток U87-MG (Американская коллекция типовых культур, № по каталогу HTB-14) после воздействия доменов FN3, связывающихся с c-Met. Клетки высевали по 8000 на лунку на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл на лунку с добавлением 10% FBS и давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Через двадцать четыре часа среду отсасывали и к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI.

Таблица 8

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

Через двадцать четыре часа после бессывороточной среды клетки обрабатывали бессывороточной средой, содержащей домены FN3, связывающиеся с с-Met (30 мкл/лунка). Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂, в течение 72 часов. Жизнеспособные клетки определяли путем добавления 100 мкл на лунку реагента CellTiter-Glo® reagent (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 10 минут. Планшеты сканировали на сканере для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices), настроенном на режим люминесценции с временем считывания 0,5 секунды на лунку. Построили график зависимости исходных единиц люминесценции (RLU) от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения IC₅₀ определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой «доза - ответ» с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. В таблице 8 представлены значения IC₅₀ в диапазоне от 1 нМ до >1000 нМ.

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

Термостабильность доменов FN3, связывающихся с с-Met

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

Таблица 9

Клон		Термостабильность (T _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 7. Получение и определение характеристик биспецифических EGFR/c-Met молекул

Получение биспецифических EGFR/c-Met молекул

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

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

Таблица 10

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

Таблица 11

Линкер	SEQ ID NO:	Длина линкера в аминокислотах	Структура
GS	78	2	Неупорядоченная
GGGGS	105	5	Неупорядоченная
(GGGGS) ₂	224	10	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 (EAAAК) ₅ AAA	84	29	α -спиральная

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

используемыми по отдельности, что указывает на авидность

Клетки NCI-H292 высевали на 96-луночные планшеты в среду RPMI, содержащую 10% FBS. Через 24 часа среду заменяли на бессывороточную RPMI. Через 24 часа после бессывороточной среды клетки обрабатывали различными концентрациями доменов FN3: моноспецифического к EGFR домена FN3 с высокой авидностью (P54AR4-83v2), моноспецифического к c-Met домена FN3 с низкой авидностью (P114AR5P74-A5), смеси двух моноспецифических EGFR и к c-Met доменов FN3 или биспецифических EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3 с низкой авидностью к c-Met, соединенный с доменом FN3 с высокой авидностью к EGFR (ECB1). Клетки обрабатывали в течение 1 ч моноспецифическими или биспецифическими молекулами и затем стимулировали EGF, HGF или комбинацией EGF и HGF в течение 15 минут при 37°C, 5% CO₂. Клетки лизировали лизирующим буфером MSD и оценивали сигнализацию в клетках с использованием соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

Домен FN3 с низкой авидностью к c-Met ингибировал фосфорилирование c-Met со значением IC₅₀=610 нМ (Фиг. 4). Как и ожидалось, домен FN3, связывающийся с EGFR, не был способен ингибировать фосфорилирование c-Met, а смесь моноспецифических молекул выглядела идентично одному домену FN3, связывающемуся с c-Met. Однако биспецифическая EGFR/c-Met молекула ингибировала фосфорилирование c-Met со значением IC₅₀=1 нМ (Фиг. 4), т.е. с улучшением эффективности более чем на 2 порядка относительно одной моноспецифической c-Met молекулы.

Потенциал биспецифической EGFR/c-Met молекулы в отношении увеличения ингибирования фосфорилирования c-Met и/или EGFR посредством эффекта авидности оценивали на множестве типов клеток с разными плотностями и соотношениями c-Met и EGFR (Фиг. 5). Клетки NCI-H292, NCI-H441 или NCI-H596 высевали на 96-луночные планшеты в среду RPMI, содержащую 10% FBS. Через 24 часа среду заменяли на бессывороточную RPMI. Через 24 часа после бессывороточной среды клетки обрабатывали разными

концентрациями моноспецифического домена FN3, связывающегося с EGFR, моноспецифического домена FN3, связывающегося с c-Met, или биспецифической EGFR/c-Met молекулы (ЕСВ5, состоит из P53A1R5-17v2 и P114AR7P94-A3). Клетки обрабатывали в течение 1 ч моноспецифическими или биспецифическими молекулами и затем стимулировали EGF, HGF или комбинацией EGF и HGF в течение 15 минут при 37°C, 5% CO₂. Клетки лизировали лизирующим буфером MSD и оценивали сигнализацию в клетках с использованием соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

На Фиг. 5 (А-С) показано ингибирование EGFR с помощью моноспецифического домена FN3, связывающегося с EGFR, в сравнении с биспецифической EGFR/c-Met молекулой в трех разных клеточных линиях. Для оценки avidности в анализе на фосфорилирование EGFR сравнили домен FN3, связывающийся с EGFR со средней аффинностью (1,9 нМ) (P53A1R5-17v2) с биспецифической EGFR/c-Met молекулой, содержащей тот же домен FN3, связывающийся с EGFR, соединенный с доменом FN3, связывающимся с c-Met с высокой аффинностью (0,4 нМ) (P114AR7P94-A3). В клетках H292 и H596 ингибирование фосфорилирования EGFR моноспецифическими и биспецифическими молекулами было сопоставимым (Фиг. 5А и 5В), вероятно, вследствие того, что данные клеточные линии имели высокое соотношение рецепторов EGFR к c-Met. Для проверки данной теории оценили ингибирование фосфорилирования EGFR в клетках NCI-H441, содержащих больше рецепторов c-Met, чем EGFR. Обработка клеток NCI-H441 биспецифической EGFR/c-Met молекулой снижала значение IC₅₀ для ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с EGFR, в 30 раз (Фиг. 5С).

Потенциал увеличения эффективности в случае биспецифической EGFR/c-Met молекулы оценивали в анализе фосфорилирования c-Met с использованием молекулы с высокой аффинностью к EGFR (0,26 нМ) и средней аффинностью к c-Met (10,1 нМ). Как в клетках NCI-H292, так и в клетках NCI-H596

ингибирование фосфорилирования с-Met биспецифической молекулой было увеличено по сравнению с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с с-Met, в 134 и 1012 раз соответственно (Фиг. 3D и 3E).

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

Таблица 12

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

Таблица 13

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

Опухолевые ксенотрансплантаты *in vivo*: PK/PD

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

Genescoroeia). После инфицирования экспрессирующие HGF-клетки выбирали, используя 4 мкг/мл пурамицина (Invitrogen). Человеческий белок HGF определяли в кондиционированной среде объединенных клеток с использованием планшетов для анализа производства MesoScale Discovery.

Мышей линии SCID Beige подкожно инокулировали клетками NCI-H292, экспрессирующими человеческий HGF ($2,0 \times 10^6$ клеток в Cultrex (Trevigen) в объеме 200 мкл), в дорзальную часть бока каждого животного. Измерение опухоли проводили дважды в неделю, пока объем опухоли не составил 150-250 мм³. Затем мышам вводили и/п одну дозу биспецифических EGFR/c-Met молекул (соединенных с альбумин-связывающим доменом для увеличения периода полужизни) или носитель PBS. Через 6 ч или 72 ч после введения опухоли извлекали и немедленно замораживали в жидком азоте. Собирали образцы крови из сердца, помещая в 3,8% цитрат с ингибиторами протеаз. Сразу после сбора образцы крови центрифугировали и полученную плазму переносили в пробирки для образцов и хранили при -80°C . Опухоли взвешивали, разрезали на мелкие части и лизировали в пробирках Lysing Matrix A (LMA), содержащих буфер RIPA с ингибиторами протеаз/фосфатаз HALT (Pierce), 50 мМ фторида натрия (Sigma), 2 мМ активированного ортованадата натрия (Sigma) и 1 мМ PMSF (MesoScale Discovery). Лизаты извлекали из матрицы LMA и центрифугировали для удаления нерастворимого белка. Растворимый белок опухоли количественно определяли в анализе на BCA и разбавляли до эквивалентного содержания белка лизирующим буфером для опухоли. Фосфорилированные c-Met, EGFR и ERK измеряли при помощи планшета для анализа MesoScale Discovery (в соответствии с протоколом производителя и приведенным выше описанием).

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

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

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

Исследования эффективности биспецифических EGFR/c-Met молекул в отношении опухоли

Мышей линии SCID Beige подкожно инокулировали клетками

NCI-H292, экспрессирующими человеческий HGF ($2,0 \times 10^6$ клеток в Cultrex (Trevigen), 200 мкл), в дорзальную часть бока каждого животного. Через неделю после имплантации мышей делили на группы с эквивалентными объемами опухолей (средний объем опухоли = $77,9 \pm 1,7$ 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 разными аффинностями к c-Met и EGFR. На Фиг. 8 показан благоприятный эффект ингибирования как c-Met, так и EGFR, поскольку наблюдали задержку роста опухоли у мышей, получавших домен FN3, связывающийся с EGFR с высокой аффинностью, по сравнению с доменом FN3, связывающимся с EGFR со средней аффинностью, когда домен FN3, связывающийся с c-Met, имел среднюю аффинность (незаштрихованные и заштрихованные треугольники, P54AR4-83v2-P114AR5P74-A5 в сравнении с P53A1R5-17v2-P114AR5P74-A5). Кроме того, данные показывают важность наличия домена FN3, связывающегося с c-Met с высокой аффинностью, поскольку биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR со средней или высокой аффинностью, но домен FN3, связывающийся с c-Met с высокой аффинностью, показали наибольшую эффективность (пунктирные серые и черные линии, P54AR4-83v2-P114AR7P94-A3 и P53A1R5-17v2-P114AR7P94-A3).

Эффективность биспецифической молекулы и других ингибиторов EGFR и c-Met

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

Клетки H292-HGF культивировали *in vitro* в среде RPMI1640 с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (10% об./об.) и L-глутамин (2 мМ) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO₂. Клетки

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

Таблица 14

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

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

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

Для развития опухоли мышей подкожно инокулировали в область правого бока опухолевыми клетками H292-HGF (2×10^6) в 0,1 мл PBS с Cultrex (1:1). Лечение начинали, когда средний размер опухоли достигал 139 мм³. Введение тестируемого образца и количества животных в каждой экспериментальной группе представлены в следующей таблице схемы эксперимента. Дату инокуляции опухолевыми клетками обозначали как сутки 0. В таблице 14 приведены экспериментальные группы.

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

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

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

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

пальпации ($62,5 \text{ мм}^3$). 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 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 спустя две недели наблюдения после введения конечной дозы.

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

Таблица 15

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

Средний размер опухоли у группы, получавшей носитель (группа 1), достиг 1758 мм^3 на 23-и сутки после инокуляции опухоли. Лечение биспецифической EGFR/c-Met молекулой в дозе 25 мг/кг (группа 2) приводило к полной регрессии опухоли (CR) у

всех мышей, которая была устойчива при >3 последовательных измерениях опухоли (среднее значение объема опухоли 23 мм³, значение Т/С=1%, $p=0,004$ в сравнении с группой, получавшей носитель, на 23-и сутки).

Лечение кризотинибом в виде единственного агента в дозе 50 мг/кг (группа 3) не показало противоопухолевой активности; средний размер опухоли составил 2102 мм³ на 23-и сутки (значение Т/С=120%, $p=0,944$ по сравнению с группой, получавшей носитель).

Лечение эрлотинибом в качестве единственного агента в дозе 50 мг/кг (группа 4) показало небольшую противоопухолевую активность, но существенных отличий от группы, получавшей носитель, не было выявлено; средний размер опухоли составил 1122 мм³ на 23-и сутки (значение Т/С=64%, $p=0,429$ по сравнению с группой, получавшей носитель) с замедлением на 4 суток роста опухоли при 1000 мм³ по сравнению с группой, получавшей носитель.

Комбинация кризотиниба (50 мг/кг, группа 5) и эрлотиниба (50 мг/кг, группа 5) показала существенную противоопухолевую активность; средний размер опухоли составил 265 мм³ на 23-и сутки (Т/С=15%; $p=0,008$) с замедлением на 17 суток роста опухоли при 1000 мм³ по сравнению с группой, получавшей носитель.

Цетуксимаб в дозе 1 мг/мышь в качестве единственного агента (группа 6) показал существенную противоопухолевую активность; средний размер опухоли составил 485 мм³ на 23-и сутки (Т/С=28%; $p=0,018$) с замедлением на 17 суток роста опухоли при 1000 мм³ по сравнению с группой, получавшей носитель. На Фиг. 9 и в таблице 16 представлена противоопухолевая активность различных терапевтических средств.

Таблица 16

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

Носитель	1758±259	--	--	--
биспецифическая EGFR/c-Met молекула (25 мг/кг)	23±7	1	--	0,004
Кризотиниб (50 мг/кг)	2102±298	120	-1	0,944
Эрлотиниб (50 мг/кг)	1122±202	64	4	0,429
Кризотиниб+Эрлотиниб (50 мг/кг+50 мг/кг)	265±40	15	17	0,008
Цетуксимаб (1 мг/мышь)	485±61	28	17	0,018

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

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

Пример 8. Период полужизни биспецифических EGFR/c-Met

молекул

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

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

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

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

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

Таблица 17

Молекула	KD (EGFR, нМ)	KD (c-Met, нМ)	Ингибирование pMet в клетках H441 (IC50, нМ)	Ингибирование pEGFR в клетках H292 (IC50, нМ)	H292-HGF Ингибирование пролиферации в индуцированных HGF клетках H292 (IC50, нМ)
ЕСВ15	0,2	2,6	н/д	4,2	23
ЕСВ94	1	4,3	53,8	5,1	29,6
ЕСВ95	1,1	6,2	178,8	13,6	383,4
ЕСВ96	1,6	22,1	835,4	24,7	9480
ЕСВ97	1,3	1,7	24,2	16,6	31,0
ЕСВ106	16,7	5,1	53,3	367,4	484,5
ЕСВ107	16,9	9	29,9	812,3	2637
ЕСВ108	15,3	25,5	126,2	814,4	11 372
ЕСВ109	17,3	2,1	26	432	573,6
ЕСВ168	0,4	0,32			3,1
ЕСВ158*	0,9	0,58			10,8

*ЕСВ158 представляет собой молекулу ЕСВ168, конъюгированную с вариантом человеческого сывороточного альбумина С34S посредством линкера (GGGS)₂, последовательность SEQ ID NO: 224

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

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

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

Таблица 18

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

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

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

Таблица 19

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

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

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

Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток оценивали на стандартной прикрепленной культуре, как описано в примерах 3 и 6, или в условиях слабого прикрепления. Для оценки выживаемости в условиях слабого прикрепления клетки высевали на 96-луночные планшеты со сверхнизким прикреплением (Corning Costar) в 50 мкл на лунку среды RPMI (Invitrogen), содержащей GlutaMAX и 25 мМ Hepes, с добавлением 1 мМ пирувата натрия (Gibco), 0,1 мМ NEAA (Gibco) и 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco), после чего давали им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Клетки обрабатывали различными концентрациями антител (конечная концентрация 0,035–700 нМ), а также HGF (7,5 нг/мл, R&D Systems № по каталогу 294-HGN), затем инкубировали при 37°C, 5% CO₂, в течение 72 часов. Некоторые лунки оставляли без обработки HGF или антителами в качестве контролей. Жизнеспособные клетки определяли с использованием реагента CellTiter-Glo® (Promega) и данные анализировали, как описано выше в разделе «Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток (анализ роста клеток NCI-H292 и NCI-H322)» в примере 3, за исключением того что лизаты переносили в непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (PerkinElmer), перед регистрацией люминесценции.

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

значение $IC_{50} < 5$ мМ.

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

Таблица 20

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

WT: дикий тип

AMP: амплифицированный

Del: делеция

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

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

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

21	PRT	Искусственная	P54AR4-48 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	Искусственная	P54AR4-37 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	Искусственная	54AR4-74 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Искусственная	P54AR4-81 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQE SEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHN VYKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Искусственная	P54AR4-83 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Искусственная	P54CR4-31 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSY VFEHDVMLPLSAEFTT
27	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	Искусственная	P54CR4-31v2 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSY VFEHDVMLPLSAIFTT

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

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

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

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

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

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

55	PRT	Искусственная	ECB6	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
56	PRT	Искусственная	ECB7	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
57	PRT	Искусственная	ECB15	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNIMGVKGKISPPLSAIFTT
58	PRT	Искусственная	ECB27	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVWGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGISVPLSAIFTT

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

63	PRT	Искусственная	ECB96	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSSISPPLSAIFTT
64	PRT	Искусственная	ECB97	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILSVKGGSSISPPLSAIFTT
65	PRT	Искусственная	ECB106	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
66	PRT	Искусственная	ECB107	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGEAIIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSSISPPLSAIFTT

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

71	PRT	Искусственная	ECB120	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSSPPLSAIFTT
72	PRT	Искусственная	ECB121	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLWSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYWNILSVKGGSSPPLSAIFTT

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

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

721 gafgtvykgl wipegekvki pvaikelrea tspkankeil deayvmasvd nphvcrligi
 781 cltstvqlit qlmpfgclld yvrehkdniq sqyllnwcvq iakgmnyled rrlvhrdlaa
 841 rnlvktqgh vkitdfglak llgaekeyh aeggkvpikw malesilhri ythqsdvwsy
 901 gvtvwelmtf gskpydgipa seissilekg erlpqppict idvymimvkc wmidadsrpk
 961 freliiefsk mardpqrylv iggdermhlp sptdsnfyra lmdeedmddv vdadeylipq
 1021 qgffsspsts rtpllsslsa tsnnstvaci drnglqscpi kedsflqrys sdptgalted
 1081 siddtflpvp eyinqsvpkr pagsvqnpvy hnqplnpaps rdphyqdphs tavgnpeyln
 1141 tvqptcvnst fdspahwaqk gshqisldnp dyqqdffpke akpngifkgs taenaeylr
 1201 apqssefiga

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

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

1 mgamtqllag vflaflalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf nhvyniklpv
 61 gsqcsvdles asgekdlapp sepsesfgeh tvdgenqivf thriniprra cgcaaapdvk
 121 ellsrleele nlvsslreqc tagagcclqp atgrldtrpf csgrgnfste ggcvccepww
 181 kgpncsepec pgnchlrgrc idgqcicddg ftgedcsqla cpsdcndqgk cvngvcicfe
 241 gyagadcsre icpvpcseeh gtcvdglcvc hdgfagddcn kplclnncyn rgrcvenecv
 301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq
 361 cvcdegfagv dcsekrcpad chnrgrcvdg rceddgftg adcgelkcpn gcsghgrcvn
 421 gqcvcdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsmcsc pndchqhgrc
 481 vngmcvcddg ytgedcrdrq cprdcsnrgl cvdgqcvced gftgpdcael scpndchggg
 541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgg grcvdgqvcic hegftgldeg qhscpsdcnn

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

88	PRT	Искусственная	P54AR4-17 петля BC	TYDRDGYD
89	PRT	Искусственная	P54AR4-47 петля BC	WDPFSFYD
90	PRT	Искусственная	P54AR4-48 петля BC	DDPRGFYE
91	PRT	Искусственная	P54AR4-73 петля BC	TWPYADLD
92	PRT	Искусственная	P54AR4-74 петля BC	GYNGDHFD

93	PRT	Искусственная	P54AR4-81 Петля BC	DYDLGVYD
94	PRT	Искусственная	P54AR4-83 Петля BC	DDPWDFYE
95	PRT	Искусственная	FG loops of EGFR	HNZYKDTNMRGL
96	PRT	Искусственная	FG loops of EGFR	LGSYVFEHDVM

97	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB97; P54AR4- 83v22	Atggttgccagcgccgaagaacctggttagttagcgaggttactgaggac agcgcgctctgagctgggacgatccgtgggcttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgctcctacgacctgaccggttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacgggtttcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccacc
98	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB15; P54AR4- 83v2	Atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgagga cagcgcccgcctgagctgggacgaccgctgggcttctatgagtctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgg gtacggagtacacggtgtccatttacgggtttcacaatgtgtataaagac accaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
99	PRT	Искусственная	tencon 27	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	Искусственная	библиотека TCL14	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXXGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

> SEQ ID NO: 101

PRT

Homo sapiens

c-Met

1 mkapavlapg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvmk yqlpnftaet piqnvilheh

61 hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanlsgg vwkdinmal
121 vvdtyyddql iscgsvnrgt cqrhvfphnh tadiqsevhc ifspqieeps qcpdcvvsal
181 gakvlssvkd rfinffvgnt inssyfpdhp lhsisvrrlk etkdgfmflt dqsyidvlpe
241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtriir fcsinsglhs ymemplecil
301 tekrrkrstk kevfnilqaa yvskpgaqla rqigaslndd ilfgvfaqsk pdsaepmdrs
361 amcafpikyv ndffnkivnk nnvrclqhfy gpnhehcfnr tllrnssgce arrdeyrtef
421 ttalqrvdlf mgqfsevlit sistfikgdl tianlgtseg rfmqvvsrs gpstphvnfl
481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvitgkki tkiplnglgc rhfqscsqcl sappfvqcgw
541 chdkcvrsee clsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf rrrnkfdlkk
601 trvllgnesc tltlsestmn tlkctvgpam nkhnmsiii snghgttqys tfsyvdpvit
661 sispkygpma ggtlltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk svnsilecy tpaqtistef
721 avklkidlan retsifsyre dpivyehpt ksfristwke plnivsflfc fasggstitg
781 vgknlnsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsenseicct tpslqqlnlq lpkktkaffm
841 ldgilskyfd liyvhnvfk pfekpvmism gnenvleikg ndidpeavkg evlkgvgnksc
901 enihlhseav lctvpndllk lnsehniewk qaisstvlgk vivqpdqnft gliagvvsis
961 talllllgff lwlkkkrqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt temvsnesvd
1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi sspllqntvh idlsalnpel
1081 vqavqhvzig psslivhfne vigrghfgcv yhgtilldndg kkihcaavksl nritdigevs
1141 qfltegiimk dfshpnvls lgciclrsegs plvvlpymkh gdlnfirne thnptvkdli
1201 gfglqvakgm kylaskkfvh rdlaarnclm dekftvkvad fgldarmydk eyysvhnktg
1261 aklpvkmal eslqtqkftt ksdvwsfgvl lwelmtgap pypdvntfdi tvyllqgrrl
1321 lqpeycpdp l yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrifaifs tfigehyv hv natyvvnkcv
1381 apypslsse dnaddevdtr pasfwets

102	PRT	Homo sapiens	HGF	<p>QRKRNTIIEFKKSAKTTLIKIDPALKIK</p> <p>TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMS</p> <p>SGVKKEFGHEFDLYE</p> <p>NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSrTKSGLKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG</p> <p>KDLQENYCRNP</p> <p>RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDH</p> <p>TESGKICQRWDHQTP</p> <p>HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIK</p> <p>TCADNTMNDTDVPL</p> <p>ETTECIQGQGEGRGTVNTWVNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKC</p> <p>KDLRENYCRNPDGS</p> <p>ESPWCFTTDPNIRVGYSQIPNCDSHGQDCYRGNKKNYMGNLSQT</p> <p>RSGLTCSMWDKNME</p> <p>DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPIS</p> <p>RCEGDTTPTIVNL</p> <p>DHPVISCATKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGLIKESW</p> <p>VLTAARQCFPSRD</p> <p>LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLAR</p> <p>PAVLDDFVSTDLP</p> <p>NYGCTIPEKTSCSVYGWYTGGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRG</p> <p>KVTLNESEICAG</p> <p>AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKKRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFV</p> <p>RVAYYAKWIHKII</p> <p>LTYKVPQS</p>
-----	-----	--------------	-----	---

103	ДНК	Искусственная	> с-МЕТ-часть ECB97 P114AR7P95-C5v2	Ctgccggctccgaagaacttgggtggtgagccgtgttaccgaagatagc gcacgcctgagctggacggcaccggatgctggcggttcgatagcttctgg attcgctatcttggagtttctgggtagcggtagaggcaattgttctgacggtgcc gggctctgaacgctcctacgatttgaccggtctgaaaccgggcaccga gtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggtagcatcagcccaccg ctgagcgcgatcttcacgactgggtggttc
104	ДНК	Искусственная	> с-МЕТ-часть ECB15 P114AR7P94-A3	Ctgccggcaccgaagaacctggttgtcagccgtgtgaccgaggatag cgcacgtttgagctggaccgctccggatgcagccttgacagcttctgga ttcgttactttgaatttctgggtagcggtagaggcagatcgttctgacggtgccg ggctctgaacgcagctatgatcttgaccggcctgaagccgggtactgagt acgtggttaacatcatgggcgttaaggggtgtaaaatcagcccgcatt gtccgcgatctttaccag
105	PRT	Искусственная	Линкер	GGGGS
106	PRT	Искусственная	ECB91	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdtnirglpIsaifttapapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTV PGSERSYDLTGKPGTEYWNILSVKGGISIPPLSAIFTT
107	PRT	Искусственная	P53A1R5-I7v2	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt
108	PRT	Искусственная	P54AR4-83v22	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt

109	PRT	Искусственная	P54AR4-83v23	Ipapknlwsevtedsarlswwdphafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglplsaiftt
110	PRT	Искусственная	P53A1R5-I7v22	Ipapknlwsevtedsarlswwdphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglplsaiftt
111	PRT	Искусственная	P114AR7P94- A3v22	Ipapknlwsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersyd Itglkpgteywnilgvkkggkispplsaiftt
112	PRT	Искусственная	P114AR9P121- A6v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGISISPPLSAIFTT
113	PRT	Искусственная	P114AR9P122- A7v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGISISPPLSAIFTT
114	PRT	Искусственная	P114AR7P95-C5v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGISISPPLSAIFTT
115	ДНК	Искусственная	ECB97	atggtgccagcgccgaagaacctggttagttagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtggcgcttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttccctacgacctgaccggtttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacggtggtcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccatcttaccaccgcaccggc accggctccggctcctgccccgctgcccggctccgaagaacttgggtggtg agccgtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccgga tgccggttcgatagcttctggattcgctatctttagtcttctgggtagcgggtga ggcaattggtctgacggtgcccggctctgaacgctcctacgatttgaccg gtctgaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcggttaaggg cggtagcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc

116	ДНК	Искусственная	ЕСВ15	<p>atgctgccagcccctaagaatctggctcgtgagcgaagtaaccgaggac agcgcccgctgagctgggacgaccgctggcgcttctatgagctcttct gattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgac cgtcccgggtagcgcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccggg tacggagtacacgggtgtccatttacgggtgtcacaatgtgtataaagaca ccaacatgctggcctgccgctgtcggcgatcttcaccaccgcgctgc gccagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgt cagccgtgtgaccgaggatagcgcacgcttgagctggaccgctccgga tgcagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggg aggcgatcgttctgacgggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacg ggcctgaagccgggtactgagtagctgggtaacatcatggcgcttaagg gtggtaaaatcagcccgcattgtccgcgatctttaccacg</p>
117	PRT	Искусственная	Альбумин- связывающий домен	<p>tidewllkeakekaieelkkagitsdydflinkaktvegvnalkdeilka</p>
118	PRT	Искусственная	ЕСВ18	<p>mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltgkpgteyvtvsygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydltgkpgteyyvnilgvkgsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyknlinnaktvegkalldeilaalp</p>

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

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

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

139	PRT	Искусственная	ECB2 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAF SFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWNIMGVKGKISPPLSAIFTT
140	PRT	Искусственная	ECB3 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGMLPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWQIIGVKGGHISLPLSAI FTT
141	PRT	Искусственная	ECB4 без Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGMLPAPKNLWSRVTEDESARLSWTAPDAAF DSFFIRYDEFLLRSGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWVTILGVKGLVSTPLSAIFTT

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

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

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

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

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

161	PRT	Искусственная	ECB91 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnirglpIsaifftapapapapLPAPK NLVVSrvTedsARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGsISPPLSAIFTT
162	PRT	Искусственная	ECB18 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltv gsersydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltv pgsersydlgtglkpgteyyvnilgvkggssivplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
163	PRT	Искусственная	ECB28 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpg sersydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltv gsersydlgtglkpgteyyvnilgvkggssivplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
164	PRT	Искусственная	ECB38 без Met	Ipapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltv gsersydlgtglkpgteyvtvsygvhnvykdnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltv gsersydlgtglkpgteyyvnmimgvkggkispplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp

165	PRT	Искусственная	ECB39 без Met	<p>Ipapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltg1kpgteytvsygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpg sersydltg1kpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp</p>
166	ДНК	Искусственная	ECB97 без Met	<p>ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc gcgcgctctgagctgggacgatccgtgggcttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggttgaagccgggtacc gagtatacggtagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccatcttaccaccgcaccggcaccg gctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtggtgagcc gtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccggatgcg gcgttcgatagcttctggattcgctatcttgagtttctgggtagcggtgaggc aattggtctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggtct gaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgtaagggcggt agcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc</p>

167	ДНК	Искусственная	ECB15 без Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgccccctgagctgggacgaccctggtggttctatgagcttttctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgctgcg cagcgctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgta gccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccggatg cagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggtag gcatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacggg cctgaagccgggtactgagtacgtggttaacatcatgggcgttaagggtg gtaaaatcagcccgcattgtccgcatctttaccacg
168	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB97; P54AR4-83v2 Без Met	ttgccagcgcgaagaacctggtagttagcaggttactgaggacagc gcgctctgagctgggacgatccgtgggcttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccacc
169	ДНК	Искусственная	> EGFR-часть ECB15; P54AR4-83v2 Без Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgccccctgagctgggacgaccctggtggttctatgagcttttctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc

170	PRT	Искусственная	ECB94 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGKI SPPLSAI FTTC
171	PRT	Искусственная	ECB95 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAI FTTC
172	PRT	Искусственная	ECB96 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGGSI SPPLSAI FTTC
173	PRT	Искусственная	ECB97 с С- концевым цистеином	MLPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNI RGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGGSI PPLSAI FTTC

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

178	PRT	Искусственная	ЕСВ91 с С- концевым цистеином	mlpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqygesekvgeaivltvpgse rsydltgkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglpIsaifttapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTV PGSERSYDLTGKPGTEYWNILSVKGSISPPLSAIFTTC
-----	-----	---------------	-------------------------------------	--

> SEQ ID NO: 179

PRT

Искусственная

Петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR
HNVYKDTNX₉RGL;

где X₉ представляет собой M или I

> SEQ ID NO: 180

PRT

Искусственная

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

> SEQ ID NO: 181

PRT

Искусственная

Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR
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

Домен FN3, связывающийся с EGFR

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGAINLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

где

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

> SEQ ID NO: 183

PRT

Искусственная

Домен FN3, связывающийся с EGFR

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVLSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

где

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

> SEQ ID NO: 184

PRT

Искусственная

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

DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), где

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

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

> SEQ ID NO: 185

PRT

Искусственная

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

TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), причем

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 или L.

> SEQ ID NO: 186

PRT

Искусственная

Домен FN3, связывающийся с c-Met

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
 AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID
 NO: 186),

где

X₁₀ представляет собой W, F или V; и
 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 или L.

> SEQ ID NO: 187

PRT

Искусственная

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

LPAPKNLVVSX₂₄VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVG E AIX₃₀LTV
PGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (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, связывающийся с c-Met, биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающиеся с EGFR/c-Met

LPAPKNLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂
LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV V NIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPPLSAX₄₆FTT (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.

> SEQ ID NO: 189

HSA-вариант C34S

DAHKSEVAHRFKDLGEEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
 AENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVLRPEVD
 VMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDE
 LRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH
 GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV
 ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
 FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK
 CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVP
 KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD
 DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

> SEQ ID NO: 190

ECB168

MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVG EAIVLTVPGSERSYD
 LTGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDTNIRGLPLSAI FT TAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTEDS
 ARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILSVKGGSI
 SPPLSAIFTT

> SEQ ID NO: 191

ECB168 без Met

LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVG EAIVLTVPGSERSYDL
 TGLKPGTEYTVS IYGVHNVYKDTNIRGLPLSAI FT TAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTEDSA
 RLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYV VNILSVKGGSI
 PPLSAIFTT

> 192

ЕСВ без имени, последняя в списке 17v2-C5v2

mLpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapaapapapap
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP
 GTEYVVNILSVKGGISISPPLSAIFTT

> 193

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

Lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapaapapapap
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP
 GTEYVVNILSVKGGISISPPLSAIFTT

> SEQ ID NO: 194

83v2 D22A

Lpapknlvvsevtedsarlswadpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 195

> 83v2 D23A

Lpapknlvvsevtedsarlswadpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 196

> 83v2 P24A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdawafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 197

> 83v2 W25A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpaafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
 tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 198

> 83v2 F27A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwaaesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 199

> 83v2 Y28A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafaesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 200

> 83v2 H75A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsygvnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 201

> 83v2 N76A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsygvhavykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 202

> 83v2 V77a

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsygvhnaykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 203

> 83v2 Y78A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsygvhnvakdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 204

> 83v2 K79A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsygvhnvyadtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 205

> 83v2 D80A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydl

tglkpgteyvtvsiygvhnvykatnmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 206

> 83v2 M83A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 207

> 83v2 R84A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 208

> 83v2 G85A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 209

> 83v2 L86A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 210

> 83v2 T81A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdanmrglplsaiftt

> SEQ ID NO: 211

> 83v2 N82A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvtvsiygvhnvykdtamrglplsaiftt

SEQ ID NO: 212

> K78S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggSispplsaiftt

SEQ ID NO: 213

> G40S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflSsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 214

> L39S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfefSgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 215

> V68S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 216

> N70S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvsimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 217

> P81S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkisSpplsaiftt

SEQ ID NO: 218

> F36S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirySeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 219

> W32S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfSiryfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 220

> M72S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnISgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 221

> R34S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiSyfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 222

> F38S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeSlgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkispplsaiftt

SEQ ID NO: 223

> I79S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydl
tglkpgteyvvnimgvkggkSspplsaiftt

SEQ ID NO: 224

PRT

Искусственная

Линкер

GGGSGGGGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, где домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:18-29, 107-110, 122-137 или 194-211.

2. Выделенный домен FN3 по п.1, причем домен FN3

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

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

c) связывается с человеческим EGFR с константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 1×10^{-8} М, причем K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса; или

d) связывается с человеческим EGFR с K_D от приблизительно 2×10^{-10} М до приблизительно 1×10^{-8} М, причем K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса.

3. Выделенный домен FN3 по п. 1 или 2, причем домен FN3 связывается с EGFR при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам D23, F27, Y28, V77 и G85 последовательности P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27).

4. Выделенный домен FN3 по любому из пп.1-3, причем домен FN3 содержит

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

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

5. Выделенный домен FN3 по п.4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183.

6. Выделенный домен FN3 по любому из пп.1-5, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 или 194-211.

7. Выделенный домен FN3 по п.6, причем домен FN3 содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tenson (SEQ ID NO: 1).

8. Выделенный домен FN3 по п.7, причем домен FN3 содержит одну или более замен, соответствующих заменам L17A, N46V и E86I в аминокислотной последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

9. Выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3 по п.1.

10. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.9.

11. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.10.

12. Способ получения домена FN3, который специфически связывается с EGFR, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина по п.11 в условиях, способствующих экспрессии домена FN3, который специфически связывается с EGFR, и очистку домена FN3.

13. 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, где домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32-49, 111-114 или 212-223.

14. Домен FN3 по п.13, причем домен FN3

a) 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 использованием 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF;

b) ингибирует индуцированное HGF фосфорилирование с-Met по тирозиновому остатку с-Met в положении 1349 со значением IC_{50} от

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

с) связывается с человеческим с-Met с K_D менее чем приблизительно 5×10^{-8} М, причем K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса; или

d) связывается с человеческим с-Met с K_D от приблизительно 3×10^{-10} М до приблизительно 5×10^{-8} М, причем K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса.

15. Домен FN3 по п.13 или 14, причем домен FN3 связывается с с-Met при помощи одного или более аминокислотных остатков, соответствующих остаткам R34, F38, M72 и I79 в P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

16. Домен FN3 по любому из пп.13-15, причем домен FN3 содержит

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

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

17. Домен FN3 по п.16, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186.

18. Домен FN3 по любому из пп.13-17, причем домен FN3 содержит последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 32-49, 111-114 или 212-223.

19. Домен FN3 по п.18, причем домен FN3 содержит замены в одном или более положениях остатков, соответствующих положениям 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 аминокислотной последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

20. Домен FN3 по п.19, причем домен FN3 содержит одну или более замен, соответствующих заменам L17A, N46V и E86I в аминокислотной последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

21. Домен FN3 по любому из пп.13-20, причем домен FN3 выделяют из библиотеки, разработанной на основе последовательности Tenson SEQ ID NO: 1.

22. Выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3 по п.13.

23. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.22.

24. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.23.

25. Способ получения домена FN3, специфически связывающегося с с-Met, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина по п.24 в условиях, способствующих экспрессии домена FN3, специфически связывающегося с с-Met, и очистку домена FN3, специфически связывающегося с с-Met.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая домен FN3 по п.1 или 13 и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Способ лечения субъекта, больного раком, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.26 нуждающемуся в лечении пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

28. Способ по п.27, в котором субъект резистентен или имеет приобретенную резистентность к лечению эрлотинибом, гефитинибом, афатинибом, CO-1686, AZD9192 или цетуксимабом.

29. Способ по п.27, в котором рак представляет собой рак эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), легочную аденокарциному, мелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, тестикулярный рак, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоклеточную карциному (HCC) или спорадическую или наследственную папиллярную почечную карциному (PRCC).

30. Способ по п.27, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

31. Способ по п.30, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент или целенаправленное противораковое средство.

32. Способ по п.31, в котором второй терапевтический агент представляет собой цисплатин, винбластин, тирозинкиназный ингибитор EGFR, с-Met, HER2, HER3, HER4 или VEGFR, эрлотиниб,

гефитиниб или афатиниб.

33. Способ по п.30, в котором второй терапевтический агент и биспецифическую молекулу вводят одновременно или последовательно.

34. Применение выделенного домена FN3, содержащего молекулу по любому из пп. 1-8 или 13-21 для лечения рака.

35. Применение по п. 34, где рак представляет собой рак эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), легочную аденокарциному, мелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, рак анального канала, рак простаты, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, рак глотки, рак носа, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак ротовой полости, рак языка, рак пищевода, вагинальный рак, рак шейки матки, рак селезенки, тестикулярный рак, рак желудка, рак тимуса, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак печени, гепатоклеточную карциному (HCC) или спорадическую или наследственную папиллярную почечную карциному (PRCC).

ФИГ. 1А

SEQ ID

NO:

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

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

ФИГ. 1В

SEQ ID
NO:

```
26      LPAPKNLVSEVTEDSLRLS WTAP-DAAFD SFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG      (60)
28      LPAPKNLVSEVTEDSARLS WTAP-DAAFD SFLIQQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
***** ** ***** ***** **

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

ФИГ. 2

		A	AB	B	BC	
TENCON27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (30)
TCL14	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (30)
		C	CD	D	DE	E
TENCON27	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVP	GSER	SYDLTG (60)
TCL14	(31)	FXIXYEX	XXXXGE	AIVLTVP	GSERSYDLTG	(60)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTVSIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT	(89)
TCL14	(61)	LKPGTEY	XVXIXGV	KGGX	XSXPLSAIFTT	(89)

ФИГ. 3

SEQ ID

NO:

32	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG	(60)
33	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFFIRYDEFLLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
34	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
35	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
36	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
37	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
38	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
39	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTD	
40	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
41	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
42	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
43	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
44	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
45	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
46	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
47	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
48	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
49	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
111	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
112	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
113	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTG	
114	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF	DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG	
	*****	*** * . * :*****	

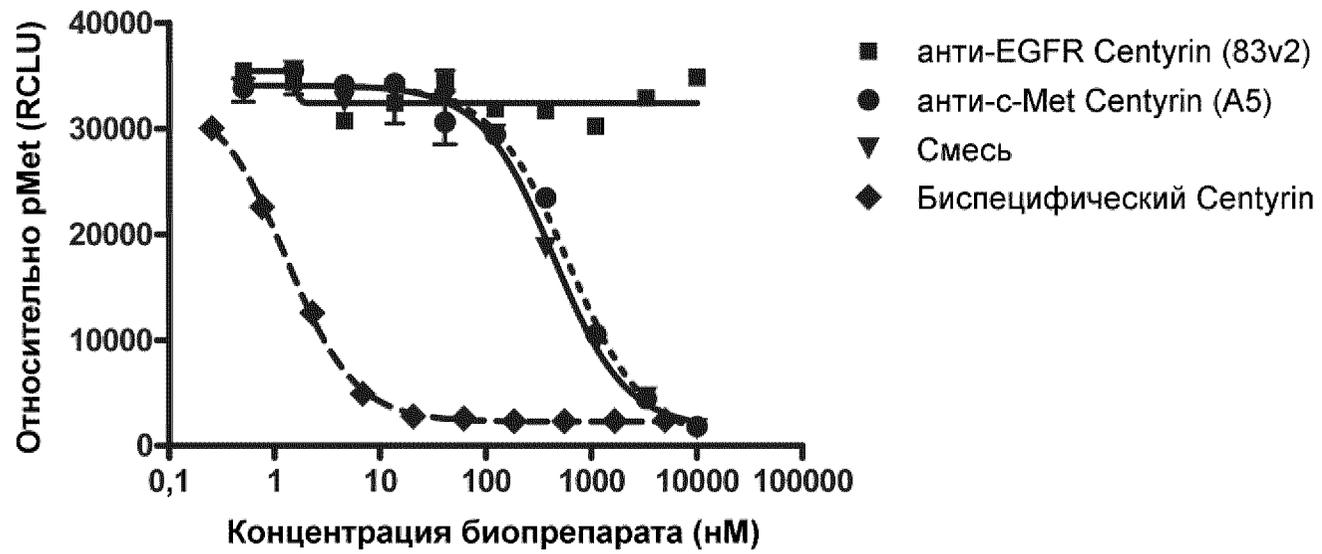
ФИГ. 3 (продолжение)

SEQ ID
NO:

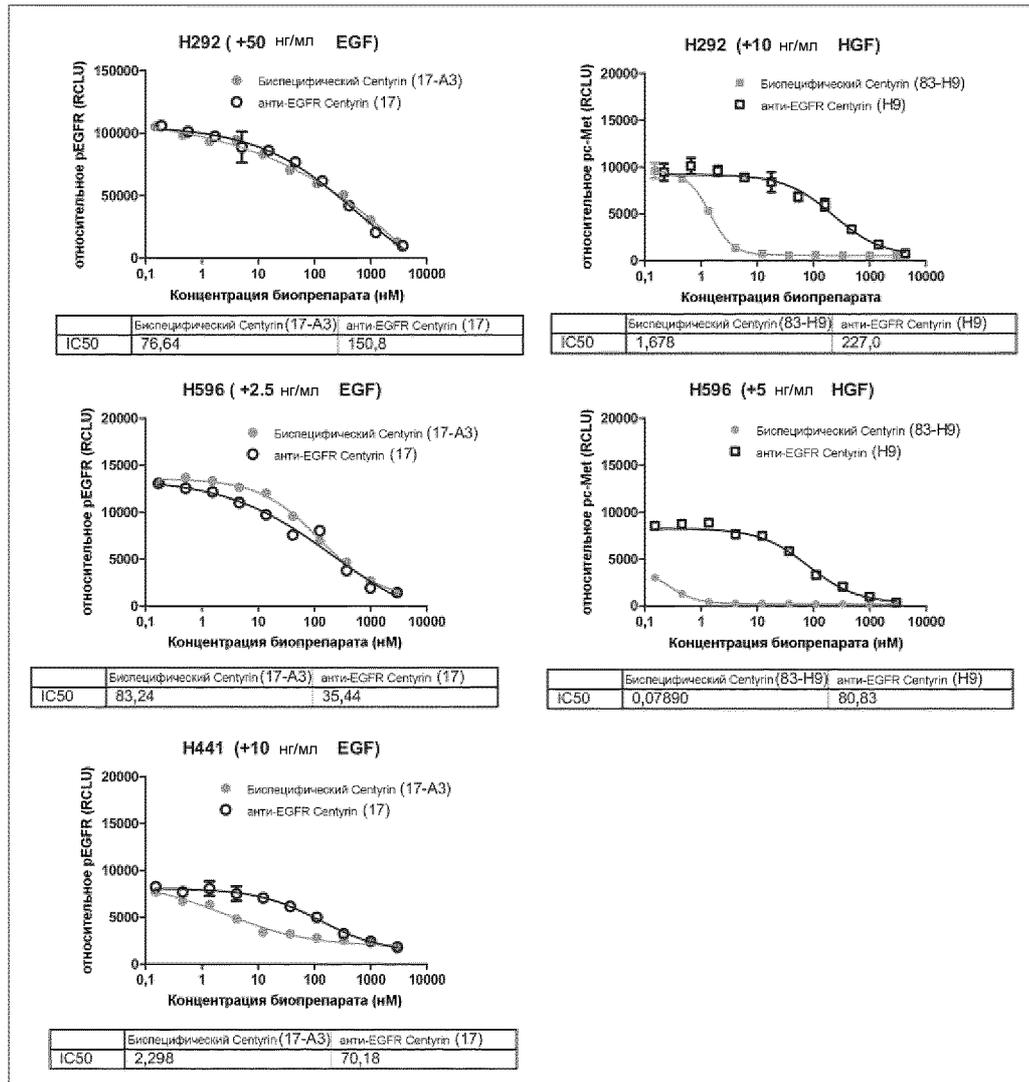
```
32      LKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
33      LKPGTEYWVTILGVKGLVSTPLSAIFTT
34      LKPGTEYIVNIMGVKGGSISHPLSAIFTT
35      LKPGTEYVVNILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36      LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37      LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38      LKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39      LKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40      LKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41      LKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
42      LKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
43      LKPGTEYVVQILGVKGGSISVPLSAIFTT
44      LKPGTEYVVNIMGVKGGSISYPLSAIFTT
45      LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46      LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
47      LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
48      LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
49      LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
111     LKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
112     LKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
113     LKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
114     LKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
***** * * .***** :* *****
```

(89)

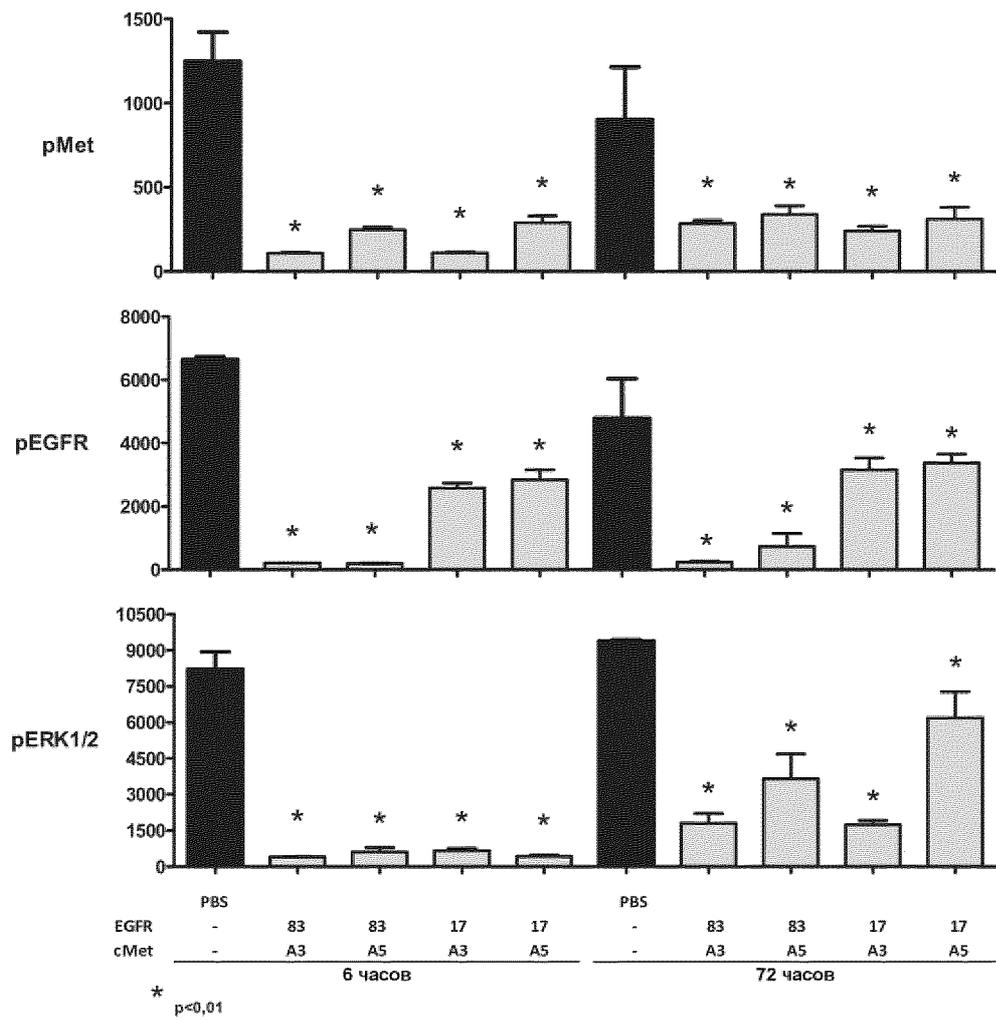
ФИГ. 4



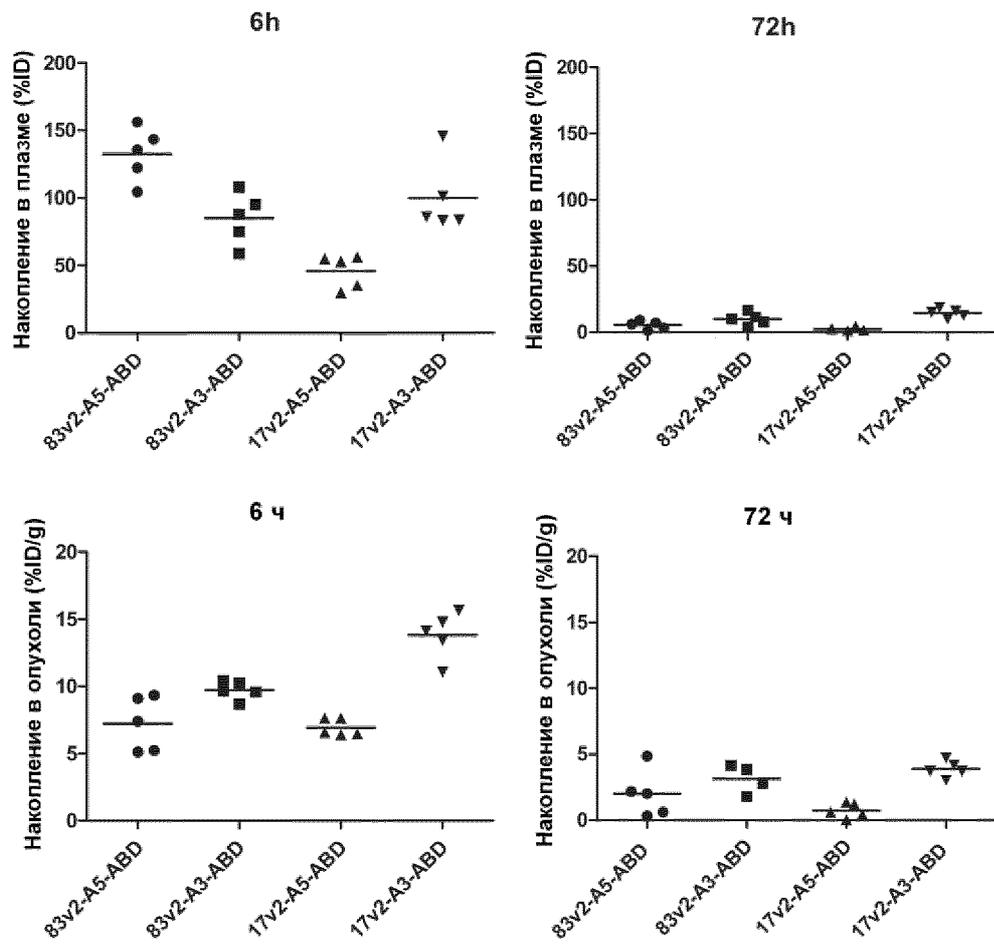
ФИГ. 5



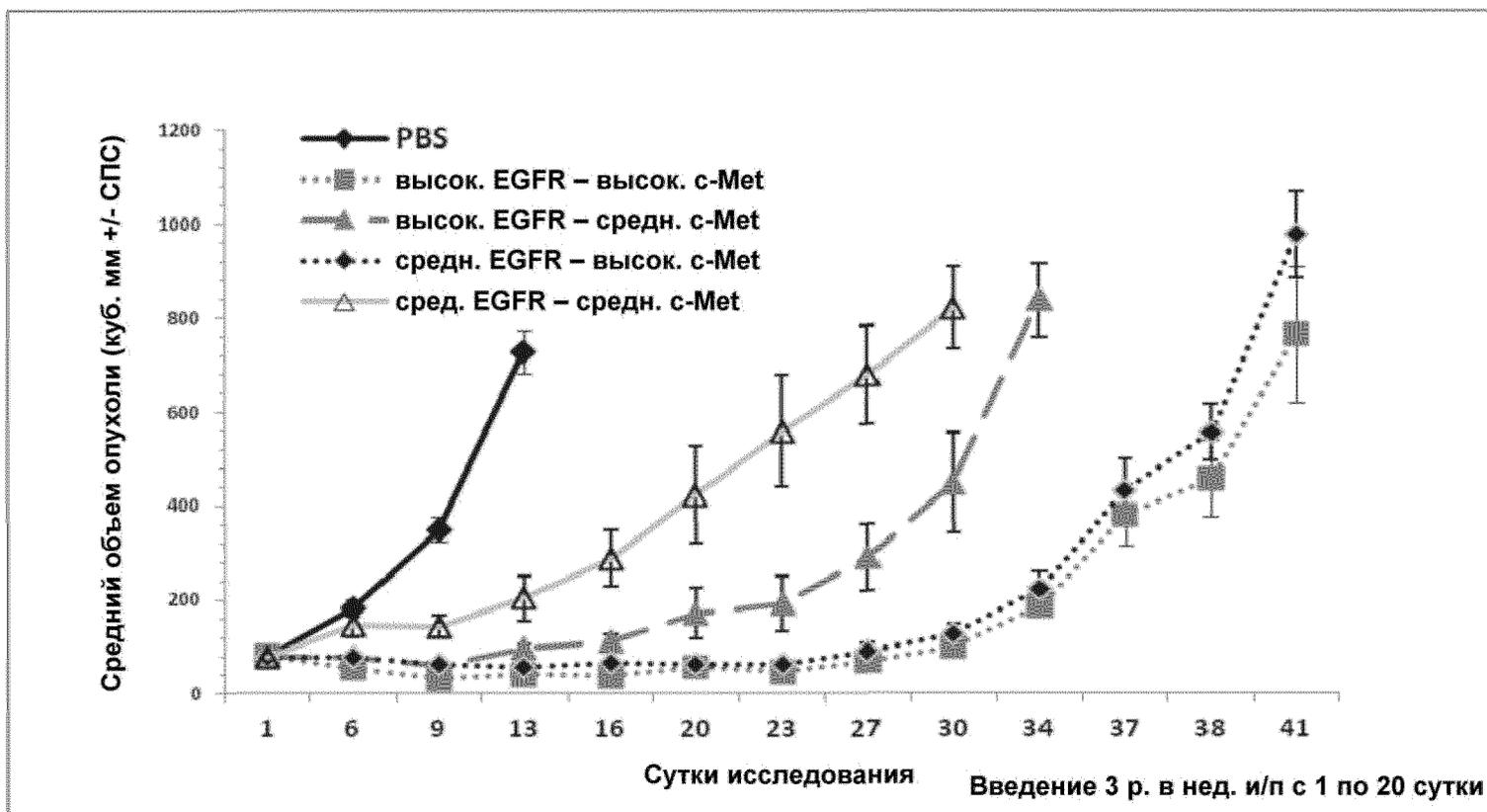
ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

